

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



**POLYMERNÍ ČÁSTICE PRO CÍLENOU TERAPII A  
ZVÝŠENÍ BIODOSTUPNOSTI**

**Polymeric particles for targeted and  
enhanced bioavailability**

Diplomová práce

Hradec Králové 2022

Daniela Kozáčková

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

Dne 13. 5. 2022 v Hradci Králové

.....

**Daniela Kozáčková**

Děkuji svému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Děkuji konzultantce Mgr. Barboře Boltnarové za trpělivost, ochotu a pomoc při realizaci experimentální části práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu po celou dobu studia.

# OBSAH

OBSAH.....	4
ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT.....	7
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE .....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Nealkoholická steatohepatitida (NASH).....	9
2.2 Játra a imunitní buňky .....	10
2.3 Léčebné strategie NASH.....	12
2.4 Nanočástice pro jaterní targeting .....	13
2.4.1 Polymerní nanočástice jako nosiče léčiv pro léčbu NASH .....	16
2.5 Metody přípravy nanočástic .....	19
2.5.1 Emulzní odpařovací metoda – ESE .....	19
2.5.2 Nanoprecipitační metoda – NPM .....	20
2.6 Použité účinné látky .....	21
2.6.1 Kurkumin.....	21
2.6.1.1 Nanočástice jako nosiče kurkuminu.....	22
2.6.2 Dexametazon .....	24
2.6.2.1 Nanočástice jako nosiče dexametazonu .....	25
2.6.3 Dexametazon acetát .....	26
2.6.3.1 Nanočástice jako nosiče dexametazon acetátu.....	27
2.7 Biokompatibilní a biodegradovatelné polymery .....	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1 Použité suroviny.....	31
3.2 Použité přístroje .....	31
3.3 Použité metody.....	32
3.3.1 Příprava nanočástic – metoda nanoprecipitace .....	32
3.3.2 Příprava nanočástic – emulzní odpařovací metoda.....	33
3.3.3 Měření velikosti, PDI a zeta-potenciálu .....	33
3.3.4 Centrifugace.....	34
3.3.5 Uchovávání vzorku .....	34
3.3.6 Stanovení enkapsulační efektivity pomocí spektrofotometrie.....	34
3.3.7 Stanovení enkapsulační efektivity pomocí HPLC .....	36

3.3.8	Mikroskopie .....	39
3.3.9	Proces čištění .....	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
4.1	Výsledky měření s použitím kurkuminu .....	42
4.1.1	Vliv různých surfaktantů .....	42
4.1.2	Použití různých polymerů, porovnání NPM a ESE .....	44
4.2	Výsledky měření s použitím dexametazonu .....	46
4.2.1	Vliv organické fáze a vstupní koncentrace dexametazonu .....	46
4.2.2	Vliv vstupní koncentrace dexametazonu .....	47
4.2.3	Výběr vhodné org. a vodné fáze, porovnání dvou polymerů.....	50
4.3	Výsledky měření s použitím dexametazon acetátu .....	53
4.3.1	ESE metoda, výběr org. fáze, porovnání dvou polymerů.....	53
4.3.2	NPM metoda, výběr org. fáze, porovnání dvou polymerů .....	55
4.3.3	Porovnání metod přípravy, vliv polymeru.....	59
4.3.4	Čištěné vzorky .....	63
4.4	Výsledky mikroskopie – dexametazon acetát .....	66
5	ZÁVĚR.....	72
6	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ .....	74
7	SEZNAM ZKRATEK .....	77
8	SEZNAM LITERATURY.....	79
9	PŘÍLOHY .....	87
9.1	Příloha 1 .....	87
9.2	Příloha 2 .....	87
9.3	Příloha 3 .....	87
9.4	Příloha 4 .....	87
9.5	Příloha 5 .....	88
9.6	Příloha 6 .....	88
9.7	Příloha 7 .....	88
9.8	Příloha 8 .....	88
9.9	Příloha 9 .....	88
9.10	Příloha 10 .....	89
9.11	Příloha 11 .....	89

## ABSTRAKT

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Farmaceutické technologie  
**Školitel:** PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.  
**Konzultant:** Mgr. Barbora Boltnarová  
**Posluchač:** Daniela Kozáčková  
**Název diplomové práce:** Polymerní částice pro cílenou terapii a zvýšení biodostupnosti

Nanočástice připravené z biodegradovatelných a biokompatibilních polymerů jsou využitelné pro cílenou terapii zánětlivých onemocnění a zvýšení biodostupnosti ve vodě špatně rozpustných protizánětlivých léčiv. Cílená distribuce zprostředkovaná především fyzikálně-chemickými vlastnostmi nanočástic může omezit nežádoucí a vedlejší účinky enkapsulovaných léčiv. Ideální vlastnosti nanočástic pro pasivní targeting do buněk mononukleárního fagocytického systému (MPS) jsou velikost v rozmezí 100-300 nm, hydrofobní charakter a negativní povrchový náboj.

Byly připraveny polymerní nanočástice matricového typu, u nichž se hodnotila velikost, index polydisperzity, zeta potenciál a enkapsulační efektivita. Enkapsulována byla 3 protizánětlivě působící léčiva, která mají rozdílnou rozpustnost ve vodě – kurkumin, dexametazon a dexametazon acetát. Matrice nanočástic byla tvořena kopolymerem PLGA, využity byly 3 druhy PLGA s různými poměry kyseliny mléčné a glykolové. Nanočástice byly připraveny s využitím 2 metod – emulzní odpařovací metoda a metoda nanoprecipitace. Zkoumalo se ideální složení organické fáze a druh a koncentrace surfaktantu, který zajistí stabilitu nanoemulze.

Výsledky ukazují, že nejdůležitější vliv na vlastnosti nanočástic má typ polymeru a enkapsulované léčivo. Metoda přípravy se nezdá být rozhodující. Byly připraveny nanočástice s optimálními vlastnostmi pro cílení do MPS. Ideální organickou fází pro emulzní odpařovací metodu je ethylacetát:aceton (1:9), pro nanoprecipitační metodu aceton a u obou metod 0,5% roztok Pluronic® F-127 jako vodná fáze.

**Klíčová slova:** Pasivní targeting, nanočástice, kurkumin, dexametazon, dexametazon acetát, PLGA polymer, emulzní odpařovací metoda, nanoprecipitační metoda.

## ABSTRACT

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of:** Pharmaceutical Technology

**Mentor:** PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

**Consultant:** Mgr. Barbora Boltarová

**Student:** Daniela Kozáčková

**Title of thesis:** Polymeric particles for targeted and enhanced bioavailability

Nanoparticles prepared from biodegradable and biocompatible polymers are useful for targeted therapy of inflammatory diseases and increase the bioavailability of poorly water-soluble anti-inflammatory drugs. Targeted distribution is mainly mediated by the physico-chemical properties of nanoparticles. This can reduce unwanted side effects of encapsulated drug. The ideal properties of nanoparticles for passive targeting to cells of the mononuclear phagocytic system (MPS) are size in the range of 100 nm to 300 nm, hydrophobic character and negative surface charge.

Matrix-type polymeric nanoparticles were prepared. Prepared nanoparticles were evaluated for size, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency of the drug. Three anti-inflammatory substances with different water solubility – a dexamethasone, a dexamethasone acetate and a curcumin were encapsulated. The matrix of nanoparticles was made of PLGA copolymer, three types of PLGA with different lactide:glycolide ratio were used. Nanoparticles were prepared using two methods – emulsification solvent evaporation method and nanoprecipitation. A suitable composition of the organic phase, a type and concentration of surfactant ensuring the stability of the nanoemulsion was investigated.

The results suggest that the polymer type has the greatest influence on the properties of the nanoparticles and drug encapsulation. The method of preparation does not seem to be critical. Prepared nanoparticles possessed optimal properties for MPS targeting. The ideal conditions for emulsion method are ethyl acetate:acetone (1:9), for the nanoprecipitation method are the best acetone and surfactant is 0,5% Pluronic F<sup>®</sup>-127 as aqueous phase.

**Keywords:** Passive targeting, nanoparticles, curcumin, dexamethasone, dexamethasone acetate, PLGA polymer, emulsification solvent evaporation method, nanoprecipitation

# 1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

V posledních letech se zvyšuje zájem o použití nanotechnologií pro dodání léčiv a rozvoj farmaceutických přípravků. Nanočástice mohou nabídnout významné výhody oproti konvenčním systémům pro podávání léčiv, jako je vysoký obsah léčiva, ochrana léčiva před enzymatickou degradací, stabilita a specificita, schopnost kontrolované biodistribuce a řízeného uvolňování, snížení toxicity a další. Osud léčiva v organismu je pak ovlivněn vlastnostmi nosiče a řídí se pravidly partikokinetiky.

Komplikovaným onemocněním projevujícím se chronickými zánětlivými procesy v játrech je nealkoholická steatohepatitida (NASH), která může progredovat přes fibrózu a cirhózu jaterní tkáně až v karcinom jater. NASH vzniká na podkladě obezity a inzulínové rezistence. V ranném stádiu NASH hrají klíčovou úlohu v rozvoji zánětu makrofágy, které produkují prozánětlivé cytokiny, což vede k prohloubení zánětu.

Polymerní nanočástice matricového typu připravené z biodegradovatelných a biokompatibilních polymerů s enkapsulovaným protizánětlivým léčivem umožňují cílené podávání léčiva k místu zánětu a omezují tak systémové nežádoucí a vedlejší účinky látky.

Prostřednictvím buněk mononukleárně fagocytického systému (MPS) jako jsou např. Kupfferovy buňky, rezidenční jaterní makrofágy, lze dosáhnout zacílení léčiva do zánětlivé tkáně. V případě buněk MPS se nabízí využití pasivního targetingu, který využívá fyzikálně-chemických vlastností nosiče. Nejzásadnějšími parametry, které ovlivňují osud intravenózně podané nanoformulace, jsou velikost částic, hydrofilita, tvar a povrchový náboj nanočástic.

Cílem této práce bylo připravit nanočástice založené na poly(mléčné-koglykolové kyselině) se třemi potenciálními léčivy lišícími se svou rozpustností ve vodě a biodostupností. Práce je zaměřená na hledání vhodné metody přípravy nanočástic a optimalizaci podmínek s cílem dosažení optimálních parametrů vzniklých částic pro další experimenty.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nealkoholická steatohepatitida (NASH)

Nealkoholická steatohepatitida je celosvětově nejrozšířenější příčinou chronické elevace jaterních enzymů, kdy steatotické postižením jater není způsobeno vysokou konzumací alkoholu. Předstupeň onemocnění bývá označován souhrnným pojmem NAFLD (z anglického: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease). NASH zahrnuje jak steatózu a zánětlivé postižení, tak i pokročilejší fáze jaterního poškození. Může progredovat do cirhózy s další dekompenzací vedoucí k odumírání jaterních buněk. Mezi následné komplikace NASH se řadí portální hypertenze, jaterní selhání a také hepatocelulární karcinom. [1, 2, 3]

NASH se stává stále častějším onemocněním souběžně s rostoucí prevalencí obezity a dalších složek metabolického syndromu. Průřezová studie prokázala, že 20–30 % dospělých žijících ve vyspělých zemích a konzumujících západní stravu má ztučnění jater, u 2–5 % je přítomno značné poškození jater a 1–2 % všech dospělých je ohroženo progresí zánětů vedoucích až k cirhóze jater. Spojitost mezi NASH s pokročilou fibrózou, diabetes mellitus 2. typu a obezitou je zcela zřejmá. [4]

Pro vznik onemocnění je zásadní přetížení jater primárními metabolickými substráty jako jsou monosacharidy – glukóza a fruktóza, které se v játrech přeměňují na mastné kyseliny, a samotné mastné kyseliny pocházející z tukové tkáně. Lipidové přetížení jater je ještě umocněno při inzulínové rezistenci. Při přetížení jater substráty sacharidů a mastných kyselin nebo narušením funkce metabolismu mastných kyselin, anebo dost možná kombinací obou, může docházet ke vzniku toxických forem mastných kyselin (např. diacylglycerolů, ceramidů, lysofosfatidylcholinu). Ty vedou k narušení funkce endoplazmatického retikula, mitochondriální dysfunkci a souhrnně tak hepatocelulárnímu poškození, zánětu a apoptóze. Tyto procesy jsou podmětem pro fibrogenezi, případně maligní transformace. [4]

Kromě nezdravého životního stylu, možné genetické predispozice a změn střevní mikroflóry se na patogenezi NASH podílejí intracelulární děje mezi hepatocyty, Kupfferovými buňkami a jaterními hvězdicovými buňkami. [5] Kupfferovy buňky jsou jaterní rezidenční makrofágy a hrají významnou roli v iniciaci a progresi zánětlivých reakcí. Infiltrace monocytů a jejich následná diferenciaci na makrofágy vede k chronickému zánětu jater a fibrogenezi. Především makrofágy a

neparenchymové buňky produkují zánětlivé, profibrogenní cytokiny a chemokiny. Podrobněji v kapitole 2.2 [6]

Onemocnění je obvykle zcela bezpříznakové a diagnostikováno bývá na základě náhodně zjištěné zvýšené hladiny transamináz (aspartátaminotransferáza (AST), alaninaminotransferáza (ALT)). Typické je 2–3násobné zvýšení hladin transamináz a poměr AST/ALT menší než 1. Cíleně by se po přítomnosti NAFLD mělo pátrat u pacientů s rizikovými faktory jako jsou obezita, diabetes nebo hyperlipidémie. Diagnóza vyžaduje vyloučení všech jiných jaterních onemocnění – především požívání nadměrného množství alkoholu, virové hepatitidy B a C, autoimunitních chorob a polékových postižení. Jaterní biopsie není nutnou podmínkou pro diagnózu, poslouží však k rozlišení prosté steatózy, steatohepatitidy, fibrózy a cirhózy. V současnosti neexistuje neinvazivní vyšetření, které by jaterní biopsii v posouzení zánětlivých změn a stupně fibrózy spolehlivě nahradilo. [1]

## **2.2 Játra a imunitní buňky**

Játra jsou velmi složitý orgán s mnoha rozdílnými populacemi buněk, které se liší jak morfologií, tak funkcí, které spolu ovšem silně souvisejí. V játrech se také vyskytují buňky imunitního systému. Imunitní buňky, a především makrofágy se významně podílejí na procesech provázejících NASH. V případě metabolického přetížení jater jsou imunitní buňky aktivovány endogenními alarmíny nebo DAMPs (damage-associated molecular patterns). [7, 8]

I když existují i další jaterní buňky s fagocytární aktivitou, Kupfferovy buňky nesou hlavní odpovědnost za fagocytózu v játrech. Kupfferovy buňky jsou rezidenční jaterní makrofágy. Jedná se o neparenchymové buňky, které sídlí v sinusovém vaskulárním prostoru a vystylají jaterní sinusoidy. Zde je jejich úlohou odstraňování cizorodých částic z krve. Vzhledem ke své fyziologické funkci mají ústřední roli v regulaci homeostázy, buněčné komunikaci, regulaci zánětu a imunitních procesů. Kupfferovy buňky internalizují částice prostřednictvím scavengerových, toll-like a manózových receptorů, a zřejmě i řady dalších. Zapojenými mechanismy jsou makropinocytóza, endocytóza zprostředkovaná klatrinem, endocytóza zprostředkovaná caveolinem a další endocytotické dráhy. Endocytóza zprostředkovaná klatrinem je zřejmě odpovědná za internalizaci částic o velikosti 100–350 nm, zatímco mechanismus zprostředkovaný caveolinem je zodpovědný za

endocytózu částic o velikosti 20–100 nm. Kupferovy buňky jsou schopné prezentace antigenu a stimulace T lymfocytů. Rekrutují další imunitní buňky a uvolňují mediátory k zahájení zánětlivé reakce v jiných jaterních buňkách [7, 9, 10]

Rekrutované makrofágy pocházejí z kostní dřeně a jsou klíčovou složkou akutního i chronického zánětu, v závislosti na své polarizaci se mohou podílet na prozánětlivých i protizánětlivých procesech. Dalšími imunitními buňkami účastnících se zánětu jsou neutrofily, dendritické buňky a T lymfocyty. Dendritické buňky jsou profesionální antigen-prezentující buňky. Při poškození jater vylučují cytokiny a mají schopnost indukovat jaterní hvězdicové buňky, NK buňky (Natural Killer) a T lymfocyty ke zprostředkování zánětu. Cytokiny produkované makrofágy jsou spojeny s aktivací jaterních hvězdicových buněk indukujících syntézu kolagenu, která následně vede k fibróze, což vede ke zhoršení stavu u pacientů s NASH. [7, 9]

Kupferovy buňky se řadí k buňkám mononukleárně-fagocytického systému (MPS). Makrofágy odvozené z monocytů patří k buňkám retikuloendoteliálního systému (RES). Makrofágy pocházející z obou systémů se mohou diferencovat na dvě široké podskupiny makrofágů, které jsou polarizovány jako klasicky aktivované (M1) nebo alternativně aktivované (M2). V zasažených tkáních jsou makrofágy polarizovány na prozánětlivý fenotyp M1, kdy polarizace je řízena především Th1 cytokiny (např.: lipopolysacharidy (LPS)). M1 produkují prozánětlivé působky, jako je IL-6, IL-12 a TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrotizující Faktor- $\alpha$ ). Fenotyp M1 vykazuje antimikrobiální a antineoplastický účinek. Následně mohou být makrofágy polarizovány na fenotyp M2, který zodpovídá především za protizánětlivé odpovědi a opravu poškozených tkání. M2 uvolňují protizánětlivé působky IL-4, IL-10, IL-13. Makrofágy fenotypu M2 navozují hojení ran remodelací tkáně, ovšem potlačují protinádorovou imunitu. Klíčovým aspektem polarizace makrofágů je změna exprese buněčných markerů. Makrofágy M1 nadměrně exprimují proteiny CD80, CD86 a CD16/32. Naproti tomu exprese arginázy-1, manózoového receptoru (CD206), protizánětlivého faktoru (IL-10) a chemokinů je zvýšena u makrofágů M2. [6, 7, 11]

Jaterní makrofágy tedy hrají zásadní roli v mnoha patologiích, jako je akutní poškození jater, ztučnění jater, fibróza, cirhóza a nádory jater. Komplexní role makrofágů, exprese různých fenotypů a mnohočetné vzájemné vztahy s jinými jaterními buňkami mohou vést k ochranným i škodlivým reakcím. Právě díky své

regulační schopnosti jsou makrofágy potenciálním terapeutickým cílem pro ovlivnění průběhu jaterních onemocnění. Modulace aktivity jaterních makrofágů může být využita k léčbě a nanosystémy představují slibné alternativy dosažení tohoto cíle. Z výše uvedeného plyne, že pevné nanočástice, které jsou makrofágy aktivně vychytávány, jsou potenciálně velmi efektivní platformou pro dodání léčiv specificky do zánětlivé jaterní tkáně a pro cílenou protizánětlivou terapii. [6, 7]

### **2.3 Léčebné strategie NASH**

Základním kamenem prevence i léčby je úprava životního stylu se zaměřením na zamezení vzniku obezity pravidelnou pohybovou aktivitou a racionálním přístupem ke stravování. Mnoho současných farmakologických přístupů léčby NASH se zaměřuje především na snížení poškození jater, omezení zánětu a fibrogenese, řešení metabolického syndromu a omezení přetížení jater mastnými kyselinami. [4] Navzdory rostoucí prevalenci NAFLD a NASH schválená konvenční terapie neexistuje. Všechna doporučení připouštějí, že předepisování léků na NASH je považováno za použití off-label, a že by měla být pečlivě zvážena rizika a přínosy. Byla prokázána účinnost metforminu, pioglitazonu, analog GLP-1 (liraglutid) a vitamínu E. Mnoho doporučení se shoduje na tom, že i používání statinů je bezpečné a prospěšné především u pacientů s NAFLD s dyslipidemií a aterogenním profilem. Ovšem z důvodu hepatotoxicity, která může být s užíváním spojena, nejsou statiny doporučovány pacientům s dekompenzovanou cirhózou a akutním jaterním selháním. Některé studie prokázaly pozitivní vliv vysokých dávek kyseliny ursodeoxycholové, jiné studie nepotvrdily významnější vliv oproti placebo, a naopak spíše upozorňují na významné nežádoucí účinky vysokých dávek jako např. kožní vyrážky, průjem. [5]

Léčba ve stádiu jaterní cirhózy se neliší od cirhóz jiného původu. V případě alkoholického i nealkoholického původu se přistupuje k léčbě pomocí kortikosteroidů. Názory na prospěšnost terapie kortikosteroidy se ovšem různí a neexistují dostatečné důkazy pro doporučení nebo vyvrácení používání kortikosteroidů u pacientů s jaterní cirhózou. Zastánci léčby uvádějí významné zlepšení krátkodobé až střednědobé mortality, zatímco odpůrci upozorňují na riziko sepse a gastrointestinálního krvácení při léčbě kortikosteroidy. [12, 13, 14]

Vzhledem k omezené účinnosti a bezpečnosti v současnosti používané farmakoterapie je pozornost věnována i rostlinám a výtažkům z nich – ostropestřec

mariánský (silybin, silibinin, silymarin), resveratrol, kurkumin, zelený čaj nebo zázvor. [5]

Inovativní terapie NASH zahrnuje 4 hlavní cesty:

- Snížení kumulace tuku v játrech – mezi tato léčiva patří modulátory PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ) jako jsou pemafibrát, nebo elafibranor; agonista nukleárního receptoru FXR (Farnesoin X Receptor) kyselina obeticholová; inhibitory de novo lipogeneze např. aramchol. [15]
- Snížení oxidačního stresu, zánětu a apoptózy – tato třída léčiv zahrnuje inhibitory signalizace apoptózy kinázy 1 (ASK1) a ireverzibilní inhibitor kaspázy (emricasan). [15]
- Dalším přístupem je zaměření se na spojitost onemocnění se střevním mikrobiomem, který je schopen vytvářet mastné kyseliny s krátkým řetězcem, alkohol a ovlivnit metabolismus žlučových kyselin. Dále také zvýšená permeabilita střeva daná dysfunkcí střevní bariéry vede ke zvýšenému přístupu bakteriálního LPS do portálního oběhu a do jater a také může podporovat zánět. K této skupině léčiv se řadí antagonisté Toll-Like Receptoru 4, anebo makrolidové antibiotikum solithromycin. [5]
- Čtvrtým přístupem je cílení na jaterní fibrózu. Léčivo cenicivirok je řazeno do nové skupiny léčiv antifibrotika a stejně jako elafibranor, kyselina obeticholová a inhibitor ASK1 se řadí mezi nejnadějnější léčiva testovaná pro léčbu NASH. [15]

## 2.4 Nanočástice pro jaterní targeting

Jaterní makrofágy jsou potenciálně atraktivními terapeutickými cíli, přičemž nanočásticové systémy nabízejí nové perspektivy ke specifickému dosažení makrofágů. Makrofágy hrají zásadní roli v konečném určení nanoformulace v organismu, protože se podílejí na jejich příjmu a biodistribuci. Jsou vyvíjeny různé typy drug-delivery nanosystémů pro cílení do makrofágů, např. lipozomy, pevné lipidové, polymerní nebo kovové nanočástice. [7, 16]

Nanočástice umožňují na základě aktivního nebo pasivního targetingu poskytnout zacílení do konkrétní tkáně, orgánu nebo skupiny buněk, tím snížit toxicitu a vedlejší účinky léčiva pro zbytek těla a zároveň jsou schopny uchránit léčivo před degradací. Aktivní targeting využívá pro cílení specifické ligandy, zatímco pasivní

targeting cílí nanočástice do příslušných tkání na základě jejich fyzikálních vlastností, jako jsou velikost, náboj a hydrofilita. [10, 16, 17]

Nanočástice příslušné velikosti a příslušných vlastností jsou vlivem pasivního targetingu akumulovány v játrech, a to díky fagocytóze makrofágy. Pasivní targeting vede v největší míře k zachycení částic Kupfferovými buňkami a rekrutovanými makrofágy. Vychytávání nanočástic je mnoha autory vnímáno jako negativum, kterému je třeba se vyhnout. Obavy některých autorů jsou spojovány s nedostatečně specifickou selektivitou distribuce a rovněž s obavami z toxicity. Nicméně z jiného úhlu pohledu tento fenomén otevírá prostor pro léčbu jinak těžce terapeuticky zvládnutelných jaterních onemocnění. [7, 10, 16, 18, 19]

Intravenózní cesta podání umožňuje systémové dodávání nanočástic. Prvním klíčovým bodem je kompatibilita nanočástic s krví. Po intravenózním podání formulace nanočástic je vhodné sledovat minimálně tyto tři jevy:

- adsorpce proteinů krve na povrch nanočástic,
- vliv nanočástic na koagulační kaskádu,
- vliv nanočástic na hemolýzu erytrocytů.

Adsorpce proteinu na povrch nanočástic je dobře známý a široce studovaný jev, ke kterému dochází při vstupu nanočástic do krevního řečiště. Nazývá se „opsonizace“ a přispívá k určení osudu nanočástic v těle, který závisí na typu a množství proteinů adsorbovaných na povrch nanočástic. Opsonizace závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech nanočástic, jako jsou velikost, náboj a povrchové modifikace. V krvi nejhojněji zastoupeným proteinem je sérový albumin, ten je jedním z hlavních proteinů, které se adsorbují na povrch nanočástic, dále také fibrinogen. Bylo prokázáno, že množství sérového albuminu naadsorbovaného na povrch je závislé na velikosti nanočástic, dále že snížení hydrofobnosti povrchu vede k menší adsorpci sérového albuminu na polymerní nanočástice. Naproti tomu adsorpce fibrinogenu závisí na povrchovém náboji nanočástice. Fibrinogen se adsorbuje především na kationické nanočástice. [20]

Vliv nanočástic na koagulační kaskádu je dalším důležitým faktorem. Intravenózně podané polymerní nanočástice mohou modifikovat koagulační čas. Výsledky studie Fornaguera a kol. (2015) [20] dokazují, že nanočástice připravené z kopolymeru poly(D,L-laktid-ko-glykolidu) (PLGA) neovlivňují aktivovaný

parciální tromboplastinový čas ani protrombinový čas. PLGA nanočástice neovlivňují koagulační časy při koncentracích do 1 mg/ml, což je obvyklá koncentrace používaná pro provádění koagulačních studií. Studie dokazuje, že PLGA nanočástice nemají prokoagulační charakter. [20, 21]

V neposlední řadě je důležitým parametrem hemolýza. Termínem hemolýza se označuje rozrušení červených krvinek. PLGA nanočástice podle většiny studií nepůsobují hemolýzu. Mohou být tedy označeny jako bezpečné z hlediska indukce embolizace a buněčné lýzy. [22, 20]

Pro makrofágy jsou atraktivní částice o velikosti větší než 100 nm a menší než 6  $\mu\text{m}$ , z tohoto širokého rozmezí vykazují největší kumulaci v játrech a slezině částice s velikostí od 100 do 300 nm. Pokud jsou částice větší než 6  $\mu\text{m}$ , obvykle se deponují v plicích, částice menší než 100 nm nedokážou aktivovat MPS a jejich doba setrvání v oběhu se stává funkcí jejich velikosti. Velikosti fenestrací v ledvinách se pohybují od 20 do 30 nm a tedy nanočástice s menšími průměry jsou rychle odstraněny renální exkrecí. Větší částice (30–100 nm) mají delší doby oběhu, ale z oběhu jsou nakonec vytlačeny přes endoteliální fenestrace. [10, 19]

Tendence polymerních nanočástic akumulovat se v cílové tkáni závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech včetně distribuce velikosti částic. Úspěšná formulace bezpečných, stabilních a účinných nanočástic vyžaduje přípravu homogenních (monodisperzních) nanočástic o určité velikosti. S ohledem na charakterizaci distribuce velikosti částic se parametr používaný k definování rozsahu velikostí nanočástic nazývá „index polydisperzity“ (PDI). Termín „polydisperzita“ se používá k popisu stupně nestejnomyšlnosti distribuce velikosti částic, je také známý jako „index heterogenity“. PDI je v podstatě reprezentace distribuce velikostních populací v rámci daného vzorku. Jedná se o bezrozměrný parametr. Číselná hodnota PDI se pohybuje od 0,0 (pro dokonale jednotný vzorek s ohledem na velikost částic) do 1,0 (pro vysoce polydisperzní vzorek s různými velikostmi částic). Pro polymerní nanočástice jsou v praxi za dostatečně monodisperzní považovány hodnoty  $\text{PDI} \leq 0,2$ . [23, 24]

Tvar nanočástic má také velký vliv na vychytávání nanočástic makrofágy, nejvýhodnější je sférický tvar nanočástic. [7, 25]

Jako cizorodé rozpoznávají makrofágy zejména hydrofobní částice. Pokud je cílem léčit stav v játrech nebo v jiných makrofágy infiltrovaných tkáních, je hydrofobní charakter nosiče výhodou. Hydrofilní charakter prodlužuje cirkulaci v krevním oběhu, vzhledem k menší míře interakcí s buňkami MPS. Dekorace povrchu částice poly(ethylenglykolem) (PEG) je nejčastější a neúčinnější způsob zvýšení hydrofility. Prodloužená cirkulace nanočástic umožňuje více času pro selektivní dodání do konkrétní postižené tkáně prostřednictvím aktivního cílení. [10, 19, 26]

Bylo pozorováno, že elektricky neutrální částice mají nižší rychlost opsonizace než nabitě částice. Pro cílení do buněk MPS je zvláště výhodný záporný povrchový náboj. [10]

Příklady různých nanočásticových systémů a různých účinných látek použitých k léčbě NAFLD/NASH jsou uvedeny v následujících odstavcích.

#### **2.4.1 Polymerní nanočástice jako nosiče léčiv pro léčbu NASH**

##### **Inhibitory slezinné tyrosin kinazy**

Ve studii Kurniawan a kol. (2018) [6] byly navrženy PLGA jako nosiče inhibitoru slezinné tyrosinkinázy (SYK). Tento enzym je nadměrně exprimován v M-diferencovaných zánětlivých makrofázích a vykazuje pozitivní korelaci s patogenezí NASH a alkoholické hepatitidy. Selektivní inhibice SYK v makrofázích snižuje aktivaci makrofágů, což je prokázáno sníženou produkcí specifických markerů: iNOS (indukovatelná syntáza oxidu dusnatého), MCP1 (makrofágový chemotaktický protein 1), IL-6 a TNF- $\alpha$ , a dalších. [6]

Samotný inhibitor SYK označený R406, stejně tak PLGA nanočástice nesoucí léčivo R406 (R406-PLGA) významně inhibovaly signální dráhu SYK (fosforylaci SYK). Zatímco prázdné nanočástice PLGA nevykazovaly žádný účinek na fosforylaci SYK. [6]

V *in vitro* studiích byl volný R406 účinnější než nanočástice R406-PLGA, což je pravděpodobně způsobeno pomalejším uvolňováním léčiva z matrice nanočástic. R406-PLGA nanočástice (střední průměr 160 nm) významně zlepšily fibrózu, zánět a steatózu při studiích na myších modelech NASH. Dodání zprostředkované PLGA nanočásticemi významně zvýšilo *in vivo* terapeutickou účinnost a intrahepatální dostupnost R406, a proto potenciálně snížilo frekvenci podávání léčiva. [6]



## **Rosiglitazon**

Je prokázáno, že agonisté jaderného receptoru PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated receptor  $\gamma$ ) zmírňují zánětlivé reakce makrofágů zapojených do metabolických komplikací obezity a aterosklerózy. Jaderný receptor PPAR $\gamma$  je exprimován ve většině buněk a tkání, jeho všudypřítomná distribuce je problematická kvůli nežádoucím a vedlejším účinkům agonistů PPAR $\gamma$  – nárůst hmotnosti, edémy, zlomeniny kostí, městnavé srdeční selhání. [7, 27]

Sférické nanočástice o středním průměru 200 nm byly ve studii Mascolo a kol. (2013) [27] použity pro makrofágově selektivní dodávání agonisty PPAR $\gamma$  rosiglitazonu (RSG). Nanočástice se skládaly z vnitřní hydrofobní matrice tvořené PLGA, kde byly inkorporovány molekuly RSG. Matrice byla obklopená vnější vrstvou polyvinylalkoholu (PVA), který tvořil hydrofilní obal pro snížení agregace nanočástic a omezení opsonizace v krvi. Kombinace vhodné velikosti, tvaru a složení podporovala rychlou akumulaci systémově podaných nanosfér v cirkulujících monocitech a rezidentních makrofázích. RSG je ve vodě při fyziologickém pH velmi špatně rozpustný, ovšem jeho rozpustnost se zvyšuje v kyselém prostředí. Proto v kyselém endozomálním prostředí makrofágů docházelo k rychlému uvolňování RSG, nejprve došlo k hydrolýze stabilizující vnější vrstvy PVA, následované degradací a zvyšováním poréznosti PLGA jádra. [7, 27]

Experimenty s makrofágy izolovanými z kostní dřeně myši prokázaly, že nanočástice RSG indukovaly cílové geny PPAR $\gamma$  se stejnou nebo vyšší účinností jako volný RSG. Dále myši krmené tuky bohatou potravou, kterým byly intravaskulárně podány nanočástice RSG, vykazovaly zmírnění zánětu makrofágů v bílé tukové tkáni a játrech, bez vlivu na geny metabolismu lipidů nebo srdeční geny spojené se srdečními vedlejšími účinky systémového podávání RSG. [7, 27]

## **SiRNA inhibitory Nogo-B v játrech**

SiRNA (small interfering RNA) jsou krátké dvouvláknové nukleové kyseliny, které mohou ovlivňovat expresi jiného genu. Vzhledem k tomu, že siRNA jsou nestabilní a rychle degradované sérovými enzymy a intracelulárními nukleázami, je terapie založená na siRNA stále problematická. Navíc siRNA nemohou snadno difundovat přes buněčnou membránu kvůli jejich velké velikosti a negativnímu náboji.

K vyřešení těchto omezení byla prozkoumána již řada aplikačních platforem. Kationtové polymery s vysokou hustotou náboje, jako je polyethylenimin, poly(beta-amino-ester) a poly(l-lysin), mohou kondenzovat se siRNA prostřednictvím elektrostatických interakcí za vzniku polyplexů. Přestože jsou účinné pro dodávání siRNA *in vitro*, mnoho z těchto kationtových polymerů není vhodných pro dodávání *in vivo* kvůli asociaci s negativně nabitými sérovými proteiny a vysoké cytotoxicitě. Polymerní nanočástice z PLGA se často používá kvůli své nízké toxicitě a schopnosti postupného uvolňování. Nicméně použitelnost PLGA nanočástic pro siRNA je omezena nízkou účinností enkapsulace siRNA ve srovnání s kationtovými lipidy a polymery. [28]

Další možností mohou být kationtové polymery poly(amin)-ko-esterové (PACE) terpolymery (kopolymer 3 různých monomerů), které mají nízkou hustotou náboje, což vede k nižší cytotoxicitě. Také jsou schopné tvořit polyplexy, a byly proto použity jako nosiče siRNA terapeutik pro snížení exprese proteinů souvisejících s onemocněními jater. [28]

Reticulon 4B, také známý jako Nogo-B, je rezidentní skupina proteinů endoplazmatického retikula. Je vysoce exprimován v neparenchymálních buňkách – jaterní sinusové endoteliální buňky, Kupfferovy buňky a hepatické hvězdicové buňky. Nogo-B se podílí na řadě jaterních patologií, jako je jaterní fibróza a alkoholické onemocnění jater, konkrétně podporuje polarizaci M1 a inhibuje polarizaci M2 v Kupfferových buňkách. [28]

Ve studii Cui a kol. (2019) [28] byly PACE nanočástice s inkorporovanými siRNA *in vivo* testovány na myších. Intravenózní podání vedlo k preferenční distribuci nanočástic do jater. Ve studii se prokázalo, že PACE nanočástice se siRNA potlačují Nogo-B v játrech. Jeden týden po podání došlo k více než 60% supresi jaterních hladin Nogo-B. [7, 28]

### **Inhibitory Notch signálního systému**

Jedna z nově objevených možností, jak přistoupit k terapii diabetes mellitus 2. typu a NASH, vyplývá z toho, že obě onemocnění vedou k maladaptivní reaktivaci signální dráhy Notch v játrech. Notch je buněčný signální systém, který řídí embryonální vývoj. Za fyziologických podmínek v dospělosti jeho funkce vyhasíná. U obézních pacientů a stejně tak u obézních myší byla pozorována aberantní aktivita

a reaktivace Notch receptorů v hepatocytech. Aktivace signální dráhy je indukována vazbou ligandu, dochází k aktivačnímu štěpení receptoru Notch, které je zprostředkované  $\gamma$ -sekretázou. [29]

Notch antagonisté účinně potlačují produkci glukózy v játrech a snižují jaterní fibrózu u NASH. Nejlépe prostudovanými antagonisty Notch jsou inhibitory  $\gamma$ -sekretázy (GSI), které zabraňují aktivačnímu štěpení receptorů Notch. GSI vykazují extrahepatální vedlejší účinky, zejména metaplazii pohárkových buněk, atrofii marginální zóny sleziny a šedivění vlasů, ty omezují terapeutické využití. Překonání těchto omezení může vyřešit specifické podávání GSI do jater pomocí nanočástic. [29]

Ve studii Richter a kol. (2020) [29] byly PLGA nanočástice s inkorporovaným GSI (střední průměr 180 nm) aplikovány myším krmených dietou provokující NASH. Po 4 dnech došlo ke zjevnému snížení produkce glukózy v játrech, ke snížení jaterní fibrózy a snížil se i počet jaterních makrofágů, které přispívají jak k zánětu jater, tak k fibróze. Ke snížení projevů NASH došlo bez zjevné gastrointestinální a slezinné toxicity. Šedivění chlupů bylo subjektivně pozorováno v menší míře než u myši, kterým byly podány neenkapsulované GSI, avšak výsledek svědčí pro dermální distribuci GSI bez ohledu na způsob podání. [29]

## **2.5 Metody přípravy nanočástic**

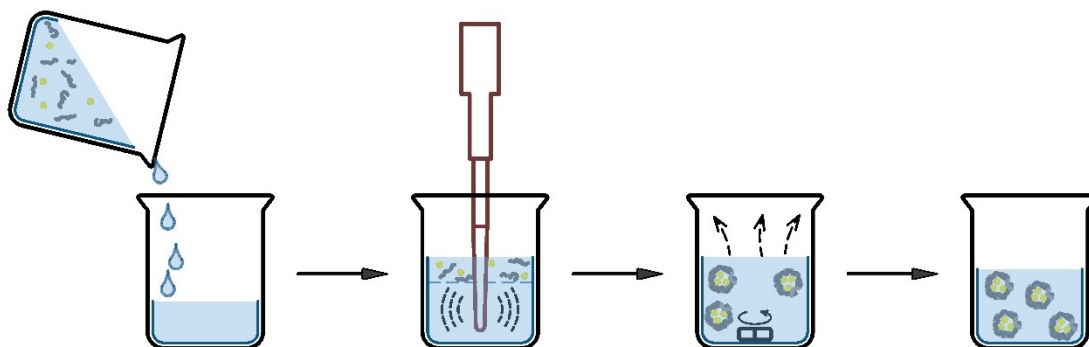
Metody přípravy polymerních nanočástic zahrnují dva principy. První možností je příprava in situ polymerací monomerů a druhou použití disperzí předem vytvořených polymerů. Výhodou přípravy nanočástic z již připravených polymerů je nepřítomnost toxických zbytků ve srovnání s metodami založenými na polymeračních reakcích, které mohou obsahovat nezreagované monomery a volné radikály. Volba metody pro přípravu nanočástic je vysoce závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech polymeru a léčiva. Metod přípravy polymerních nanočástic z předem vytvořených polymerů je více např: emulzní odpařovací metoda (ESE), nanoprecipitace (NPM), vysolování, dialýza, technologie superkritických tekutin a další. V následujících kapitolách budou představeny pouze metody používané pro přípravu nanočástic v experimentální části diplomové práce. [30, 31]

### **2.5.1 Emulzní odpařovací metoda – ESE**

Metoda zahrnuje dva kroky, nejprve je připravena organická fáze, která se skládá z léčiva, polymeru a směsi org. rozpouštědel, kdy jedno z rozpouštědel je neomezeně

mísitelné s vodou (např. aceton) a druhé je s vodou omezeně mísitelné nebo zcela nemísitelné (např. ethylacetát, dichlormethan). Dále se připraví vodná fáze obsahující povrchově aktivní látku. Spontánní emulgace spočívá v přidání organické fáze do vodné fáze, org. rozpouštědlo mísitelné s vodou rychle difunduje z organické do vodné fáze, což vede ke spontánní tvorbě jemných kapiček emulze vlivem výrazného poklesu mezifázového napětí mezi organickou a vodnou fází. Povrchově aktivní látka se adsorbuje na povrch kapiček a zabraňuje agregaci kapiček emulze. Pro finální úpravu velikosti nanokapek emulze následuje vysokoenergetická homogenizace (pomocí vysokorychlostního míchání, ultrazvuku nebo vysokotlakou homogenizací), která částice zmenší na požadovanou novelikost. [19, 30, 32, 33]

V dalším kroku se organické rozpouštědlo odpaří buď nepřetržitým mícháním při laboratorní teplotě nebo při nižší teplotě za sníženého tlaku. Ultracentrifugací a promytím čištěnou vodou se odstraní přebytek stabilizátoru a volného léčiva od nanočástic. Voda je následně odstraněna lyofilizací, pro zlepšení trvanlivosti během skladování. [30, 32, 33, 34, 35]



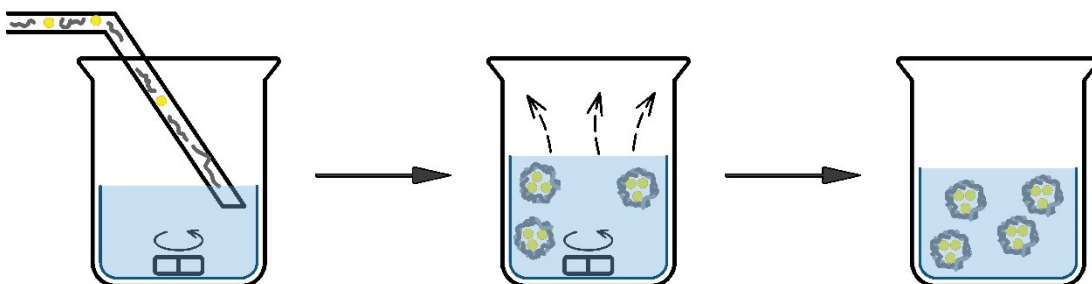
Obrázek 1: Schématický náčrt emulzní odpařovací metody

### 2.5.2 Nanoprecipitační metoda – NPM

NPM se též nazývá metoda vytěsnění rozpouštědla, jedná se o neemulzní metodu formulace nanočástic. Organická fáze se skládá z polymeru, léčiva a s vodou mísitelného organického rozpouštědla (např. aceton), ve kterém je léčivo dobře rozpustné. Organická fáze je v jednom kroku přidána do vodné fáze obsahující surfaktant. Léčivo není rozpustné ve vodné fázi. [10, 31]

Základní princip této metody je založený na vysrážení polymeru, který zachytí léčivo. K precipitaci dochází na rozhraní fází, které nastává po vytěsnění semipolárního rozpouštědla z organické fáze. Rychlá difúze rozpouštědla do vodné fáze vede k poklesu mezifázového napětí, a to vede k vytvoření velkého povrchu ve

formě nanočástic. Surfactant stabilizuje vzniklé nanočástice. Organické rozpouštědlo se z nanosuspenze odstraní odpařením. [10, 31, 36]

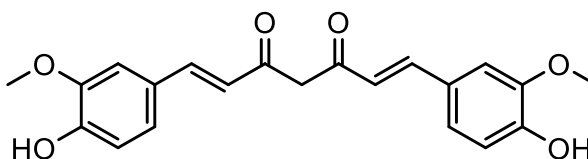


Obrázek 2: Schématický nákres nanoprecipitační metody

## 2.6 Použité účinné látky

### 2.6.1 Kurkumin

Kurkumin (obrázek 3) je barvivo které je nejvýznamnější složkou oddenků z kurkumy, oddenky používané k farmaceutickým účelům pocházejí z rostlin *Curcuma longa* nebo *Curcuma xanthorrhiza* (*Zingiberaceae*). Kurkumin je lipofilní látka, polyfenolického charakteru, obsahující dvojně vazby, vykazující keto-enol tautomerii. Keto forma převládá v kyselém a neutrálním prostředí, zatímco enol forma převažuje v prostředí alkalickém. Kurkumin vykazuje protizánětlivou, antiproliferační antibakteriální, antivirovou, neuroprotektivní a antioxidační aktivitu, je silným inhibitorem fibrogenese, což může vysvětlit jeho pozitivní účinky u nemocí, jako je fibróza ledvin, plic, jater a Crohnova choroba. Známé jsou také antirevmatické účinky kurkumy. Některé klinické studie ukázaly, že podávání kurkuminu významně snížilo hladiny ALT a AST a zlepšilo steatózu jater u pacientů s NAFLD. [5, 37, 38, 39]



Obrázek 3: Kurkumin, molekulová hmotnost: 368,4; logP: 3,2

Kurkumin je schopen down-regulovat transkripční faktory, jako je nukleární faktor-kappa B, aktivátorový protein 1, early growth response protein 1 (EGR-1) nebo intracelulární signální dráhy. Tyto faktory a signální dráhy jsou zodpovědné za regulaci genové exprese prozánětlivých molekul, jako jsou matrix-metaloproteinázy, cyklooxygenáza 2, TNF- $\alpha$ , iNOS, interleukiny (IL-1 $\beta$  IL-6, IL-8) a další prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které mají klíčovou roli v rozvoji chronického zánětu. [39]

Použití kurkuminu omezuje jeho minimální rozpustnost ve vodě a v důsledku toho nízká biologická dostupnost, ke které přispívá především nízká absorpce, rychlý metabolismus, rychlá eliminace i chemická nestabilita. Ke zlepšení biologické dostupnosti kurkuminu bylo použito mnoho přístupů: použití adjuvans, jako je piperin, který interferuje s glukuronidací a omezí tak rychlou metabolizaci kurkuminu; použití lipozomálního kurkuminu; nanočástice kurkuminu; použití fosfolipidových komplexů; anebo použití strukturních analogů kurkuminu. Nové formulace by mohly poskytnout lepší dostupnost, delší biologický poločas a vyšší odolnost vůči metabolickým procesům. [38, 40]

Pro dodání kurkuminu je široce rozšířená inkorporace v různých typech polymerních nanočástic a v micelách. Mezi nejpoužívanější polymerní vehikula pro dodání kurkuminu patří chitosan, N-isopropylakrylamid a polymer PLGA. Zejména nanočástice syntetizované z amfifilních polymerů jsou na rozdíl od volného kurkuminu dispergovatelné ve vodném prostředí, a zároveň prokazují stejnou terapeutickou účinnost jako volný kurkumin. [39, 41]

Bioaktivní kurkuminoidy (kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin) vykazují silnou absorpci UV-VIS světla při maximální vlnové délce 425 nm. UV-VIS spektroskopii lze tedy použít pro kvantifikaci kurkuminoidů. [42]

### **2.6.1.1 Nanočástice jako nosiče kurkuminu**

Ve studii Chen a kol. (2019) [43] bylo cílem připravit pomocí ESE metody PLGA nanočástice s inkorporovaným kurkuminem za účelem dosažení protinádorové aktivity proti rakovině jater. Kurkumin totiž vykazuje protinádorovou aktivitu včetně inhibice iniciace, progresu a metastázování rakovinných buněk. Přestože má kurkumin mnoho farmakologických aktivit, jeho klinická aplikace je stále omezena mnoha faktory, jako je např. špatná rozpustnost ve vodě ( $\approx 0,125$  mg/l), nízká biologická dostupnost, rychlý metabolismus a systémová clearance. [38, 43]

Ve studii Chen a kol. (2019) [43] byly nanočástice vytvořeny z PLGA s D- $\alpha$ -Tokopheryl polyethylenglykol 1000 sukcinátem (TPGS), což je emulgátor pro přípravu nanočástic, který může zlepšit permeabilitu léčiva a snížit P-glykoproteinem zprostředkovanou rezistenci vůči léčivům v rakovinných buňkách. [43]

Průměrná velikost částic byla  $110,6 \pm 2,3$  nm, dosažená enkapsulační efektivita (EE)  $83,2 \pm 2,7$  % a zeta potenciál  $-23,6$  mV. Pomocí konfokální mikroskopie byla srovnávána intracelulární absorpce volného kurkuminu, PLGA nanočástic s kurkuminem (CPN) a PLGA nanočástic s kurkuminem s TPGS (CPTN) do rakovinných buněk. Průměrné intenzity fluorescence (fluorescenční barvivo kumarinu-6) pro CPTN byly přibližně 2x vyšší než pro CPN. Vysoký příjem CPTN buňkami může být způsobena účinkem TPGS, který podporuje absorpci. [43]

Všechny výsledky ukázaly, že CPTN měly lepší protinádorový účinek *in vivo* než CPN a volný kurkumin. Histopatologie jater myši neukázala žádné degenerativní změny po podání formulace CPTN. To prokázalo bezpečnost a biokompatibilitu CPTN jako parenterální formulace pro cílení na játra. CPTN mohou zvýšit biologickou dostupnost kurkuminu, proto by teoreticky mohly být ideální pro léčbu nádorů jater. [43]

Cílem práce Pontes-Quero a kol. (2020) [39] byl vývoj polymerních nanočástic s obsahem kurkuminu za účelem překonání nevýhodných fyzikálních vlastností kurkuminu a využití výhod nanotechnologií. Řízené uvolňování kurkuminu může rozšířit jeho uplatnění při léčbě zánětlivých onemocnění a omezení oxidačního stresu. Jako nosič byl zvolen bioaktivní terpolymer (kopolymer 3 různých monomerů) na bázi  $\alpha$ -tokoferylmethakrylátu, 1-vinyl-2-pyrrolidonu a N-vinylkaprolaktamu. Nanočástice byly získány NPM a charakterizovány z hlediska velikosti (114-135 nm), PDI (pod 0,2), stability, EE (průměrně 74,6 %) a uvolňování léčiva. *In vitro* buněčné testy byly provedeny na kulturách lidských kloubních chondrocytů a RAW 264.7 (buněčná linie myších makrofágů), které byly stimulovány LPS. Hodnoceny byly cytotoxicita, absorpce, antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Biokompatibilita *in vivo* byla potvrzena na krysím modelu subkutánní injekcí disperze nanočástic. Nanočástice s enkapsulovým kurkuminem byly necytotoxické. [39]

Protizánětlivý potenciál byl prokázán snížením různých prozánětlivých faktorů, jako jsou IL-8, makrofágové zánětlivé proteiny v chondrocytech, iNOS, IL-6, TNF- $\alpha$  a MCP1 v RAW 264.7. Výhodné je, že nanonosič z  $\alpha$ -tokoferylmethakrylátu má vlastní antioxidační potenciál. [39]

Polymerní nanočástice jsou na rozdíl od volného kurkuminu stabilní ve vodném médiu. Potvrzení antioxidačních, protizánětlivých a biokompatibilních vlastností

polymerních nanočástic kurkuminu otevírá dveře k dalšímu *in vitro* a *in vivo* výzkumu léčby zánětů a nemocí souvisejících s oxidativním stresem. [39]

Také v práci Bisht a kol. (2007) [41] byly syntetizovány polymerní nanočástice s inkorporovaným kurkuminem. Využit byl kopolymer N-isopropylakrylamidu, s poly(ethylenglykol)monoakrylátem a N-vinyl-2-pyrrolidonem. Fyzikálně-chemická charakterizace dynamickým rozptylem laserového světla a transmisní elektronovou mikroskopií potvrdila úzkou distribuci velikosti kolem 50 nm. Nanokurkumin se na rozdíl od volného kurkuminu snadno disperguje ve vodném médiu. Nanokurkumin vykazuje srovnatelnou terapeutickou účinnost *in vitro* s volným kurkuminem na lidských buněčných liniích rakoviny slinivky břišní. Nanokurkumin stejně jako volný kurkumin indukuje buněčnou apoptózu, blokuje aktivaci nukleárního faktoru kappa B a snižuje hladiny prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$ ). [41]

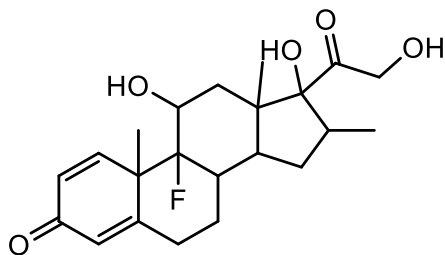
Nanokurkumin poskytuje příležitost rozšířit klinický repertoár této účinné látky tím, že umožňuje tvorbu vodné disperze. Budoucí studie využívající nanokurkumin jsou opodstatněné u preklinických *in vivo* modelů rakoviny a dalších nemocí, které by mohly mít prospěch z účinků kurkuminu. [41]

### 2.6.2 Dexametazon

Dexametazon (obrázek 4) je bílý, krystalický prášek bez zápachu. Prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný v methanolu, acetonu a omezeně rozpustný v dichlormethanu. Je to syntetický glukokortikoid se silnými protizánětlivými a imunosupresivními účinky. Má široké klinické použití. Dlouhodobé, systémové podávání dexametazonu je ovšem spojeno se závažnými vedlejšími účinky jako je hyperglykémie, hypertenze, riziko vzniku gastrointestinálních ulcerací vlivem zvýšené acidity, riziko tromboembolických komplikací, negativní ovlivnění psychiky nemocného, osteoporóza, iatrogenní Cushingův syndrom [25, 44]

Nanoformulace mají výrazný potenciál k minimalizaci vedlejších účinků. Cílené dodávání dexametazonu do klíčových buněk regulujících zánět, jako jsou makrofágy, představuje slibný terapeutický přístup. [9]





Obrázek 4 Dexametazon, molekulová hmotnost 392,46; logP 1,9

Částice mohou být formulovány ze široké škály syntetických látek a přírodních polymerů. Nicméně biodegradovatelné polymery, např jako PLGA, jsou nejčastěji používané, kvůli jejich nízké toxicitě. [25]

### 2.6.2.1 Nanočástice jako nosiče dexametazonu

Snahou studie Fichter a kol. (2013) [9] bylo vyvolat cílený transport nanokapslí na bázi dexametazonu za účelem potlačení zánětlivé reakce fagocytárních buněk. Byly zkoumány nanokapsle (NC) z hydroxyethylškrobu (HES) se zapouzdřeným dexametazonem (HES-DEX NC) a nanokapsle syntetizované výhradně z dexametazonu (DEX NC). Oba typy nanokapslí byly syntetizovány v inverzní (voda v oleji) miniemulzi prostřednictvím interfaciální polyadiční reakce. [9]

Biologické vlastnosti nanokapslí byly hodnoceny pomocí primárních buněčných kultur pocházejících z neparenchymálních myších jaterních buněk, kde hlavní zastoupení mají Kupfferovy buňky. Pomocí konfokální mikroskopie bylo dokázáno, že NC jsou vychytávány buňkami. Inkubace s DEX NC vedla k významně vyššímu příjmu ve srovnání s HES-DEX NC. [9]

Za účelem posouzení biologických vlastností obou formulací byly buňky stimulovány LPS a bylo stanoveno uvolňování prozánětlivých cytokinů (IL-6 a TNF- $\alpha$ ) po podání formulací. Je zajímavé, že účinek na celkové potlačení uvolňování cytokinů LPS stimulovaných buněk byly podobné u obou formulací nanokapslí, navzdory jejich odlišnému chování při vychytávání. Větší počet DEX NC vychytaný Kupfferovými buňkami neměl žádný významný vliv na uvolňování cytokinů. Vysvětlením tohoto jevu může být, že při přípravě polymerací dochází ke snížení biologické aktivity dexametazonu. Potlačení uvolňování cytokinů by však mohlo být způsobeno přítomností molekul dexametazonu na povrchu nanokapsle. [9]

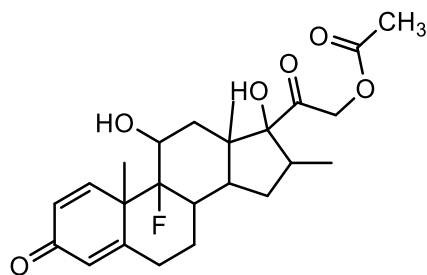
Cílem práce Gómez-Gaete a kol. (2006) [25] bylo optimalizovat enkapsulaci dexametazonu do nanočástic PLGA pro intravitreální injekci pro léčbu akutních i

chronických zánětů zadního segmentu oka. Tato práce se zabývá jak optimalizací enkapsulace dexametazonu, tak jeho uvolňováním z biodegradabilních nanočástic z PLGA připravených ESE metodou. Protože přidání dexametazonu vyvolalo tvorbu krystalů léčiva, byl zkoumán vliv několika parametrů na enkapsulaci dexametazonu. Byl zkoumán typ organického rozpouštědla a polymeru, počáteční hmotnost dexametazonu, rychlost odpařování rozpouštědla, saturace kontinuální fáze a začlenění lipidu do polymeru. Velikost nanočástic a zeta potenciál nebyly v přítomnosti dexametazonu modifikovány a byly přibližně 230 nm a -4 mV. Nejvyšší enkapsulace léčiva bylo dosaženo za použití 100 mg PLGA75:25 ve směsi aceton-dichlormethan 1:1 (obj.:obj.) a 10 mg dexametazonu. Byla provedena *in vitro* disoluce za sink podmínek, kdy dexametazon se z optimalizované formulace zcela uvolnil po 4 hodinách inkubace při 37 °C. Ani rychlost odpařování organického rozpouštědla, ani nasycení vodné fáze solí nebo začlenění lipidu (1 mg 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu) do polymeru neměnily účinnost enkapsulace. Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a rentgenová difrakce prokázaly, že léčivo bylo molekulárně dispergováno v nanočásticích, zatímco nezapouzdřený dexametazon krystalizoval. Tyto výsledky ukazují proveditelnost enkapsulace dexametazonu. [25]

### 2.6.3 Dexametazon acetát

Dexametazon acetát (obrázek 5) je ester dexametazonu s kyselinou octovou, jedná se o syntetický glukokortikoid se silným protizánětlivým účinkem. Dexametazon acetát je lipofilnější derivát dexametazonu. Kromě jiných indikací se využívá i v léčbě hepatitid a jako prevence jaterní fibrózy. Ovšem použití v terapii je omezené především ze dvou důvodů:

- Jeho rozpustnost ve vodě, ale i jiných fyziologicky kompatibilních rozpouštědlech je velmi omezená.
- Dexametazon acetát nepůsobí specificky na jaterní buňky a dlouhodobé užívání vysokých dávek může vést k mnoha vedlejším účinkům, jak je popsáno v kapitole 2.6.2



Obrázek 5: Dexametazon acetát, molekulová hmotnost 434,5; logP 2,8

K překonání těchto problémů lze využít pro dodání do cílové tkáně mikro/nanočásticové systémy s náloží dexametazon acetátu. Použitím polymerů polytrimethylenkarbonát nebo PLGA lze významně zlepšit rozpustnost ve vodě. [45]

### 2.6.3.1 Nanočástice jako nosiče dexametazon acetátu

Cílem experimentu Wang a kol. (2010) [45] bylo pomocí začlenění dexametazon acetátu (DexAct) do nanostrukturovaného lipidového nosiče (NLC) zvýšit akumulaci, a tím i protizánětlivou aktivitu DexAct v játrech, zároveň omezit vedlejší a nežádoucí účinky DexAct. [45]

NLC jsou složeny z binární směsi pevného lipidu a prostorově odlišného kapalného lipidu jako nosiče léčiva. Mezi hlavní výhody NLC patří zvýšená kapacita naplnění léčivem ve srovnání s pevnými lipidovými nanočásticemi. [45]

Ve studii Wang a kol. (2010) [45] byl pomocí metody filmové disperze a ultrazvuku DexAct začleněn do NLC (DexAct-NLC). Pevnou složku NLC tvořil lecitin a jako kapalná složka byl použit sójový olej. DexAct-NLC měly střední velikost částic  $151 \pm 3,5$  nm, záporný zeta potenciál  $(-38,7 \pm 3,7$  mV) a hydrofobní povrch z lecitinu. Pro vyhodnocení možných interakcí mezi DexAct a lipidovými materiály byla provedena DSC analýza, kdy nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi slepými NLC a NLC naplněnými DexAct. [45]

Tetrachlormethan ( $\text{CCl}_4$ ) je klasická hepatotoxická látka, která způsobuje rychlé poškození jater progredující ze steatózy do centrilobulární nekrózy. Dlouhodobé podávání  $\text{CCl}_4$  způsobuje chronické poškození jater a zvířecí model indukovaný tetrachlormethanem je široce přijímán jako model jaterní fibrózy. Po podání  $\text{CCl}_4$  dochází k významnému zvýšení obsahu hydroxyprolinu a sérových hladin AST a ALT. [45]

V studii Wang a kol. (2010) [45] byla zkoumána biodistribuce, farmakokinetika a terapeutická účinnost DexAct-NLC na myších indukovaných tetrachlormethanem.

Obsah hydroxyprolinu a sérových hladin transamináz se během pokusu se slepými NLC nezměnil, což naznačuje, že slepé NLC neměly žádný zjevný škodlivý účinek na játra. Jak při podání roztoku DexAct, tak při podání DexAct-NLC byl obsah hydroxyprolinu a sérových hladin transamináz snížen. Je třeba zdůraznit, že obsah hydroxyprolinu byl při podání DexAct-NLC mnohem nižší než s roztokem DexAct při stejné dávce. U DexAct-NLC bylo dosaženo 2,57x lepší biodostupnosti ve srovnání s roztokem DexAct. Tyto výsledky jasně naznačují selektivní schopnost DexAct-NLC zacílit na játra, pravděpodobně kvůli clearance nanočástic fagocytujícími buňkami. [45]

## 2.7 Biokompatibilní a biodegradovatelné polymery

Polymery mohou vytvářet koloidní systémy tvořené sférickými nanočásticemi, které nesou účinnou látku. Účinná látka může být enkapsulována v polymerní matici (nanosféry) nebo zachycena v dutině obklopené polymerní membránou (nanokapsle), případně může být přikonjugována k povrchu nanočástice. Mezi výhody polymerních nanočástic se řadí jejich stabilita *in vivo*, relativně homogenní distribuce velikosti částic (tzn. nízká polydisperzita), dobře kontrolovatelné fyzikálně-chemické vlastnosti. [16]

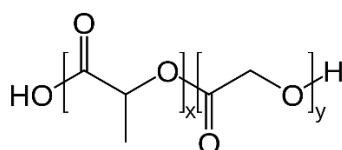
Mezi biologicky odbouratelné a biokompatibilní polymery se řadí jak syntetické polymery, tak přírodní polymerní látky. K přírodním polymerům lze zařadit chitosan, alginát, dextran, heparin, albumin, želatinu nebo kolagen. Přírodní polymery (tj. proteiny nebo polysacharidy) nejsou pro tvorbu nanočástic pro dodávání léčiv široce používány, protože navzdory tomu, že jsou levné, netoxické a snadno biologicky odbouratelné, vykazují relativně rychlé profily uvolňování a rozkladu. Nejsou přirozeně čisté a homogenní, což vyžaduje před použitím krok čištění. V důsledku toho se syntetickým polymerům v této oblasti věnuje podstatně více pozornosti. [16, 19]

Nebiodegradovatelné polymery, jako je polyakrylamid a poly(methakrylát), si užily přechodný okamžik slávy, ale nyní ztrácejí pozornost, především kvůli riziku chronické toxicity v důsledku intracelulární a tkáňové kumulace. [10]

Syntetickým, biologicky odbouratelným a biokompatibilním polymerům je tedy věnována největší pozornost. Dalšími žádoucími vlastnostmi syntetických polymerů jsou netoxicity, dostatečná účinnost nesení léčiva a možnost povrchové modifikace. Při cílení do makrofágů je výhodou hydrofobní charakter. Nejpoužívanějšími

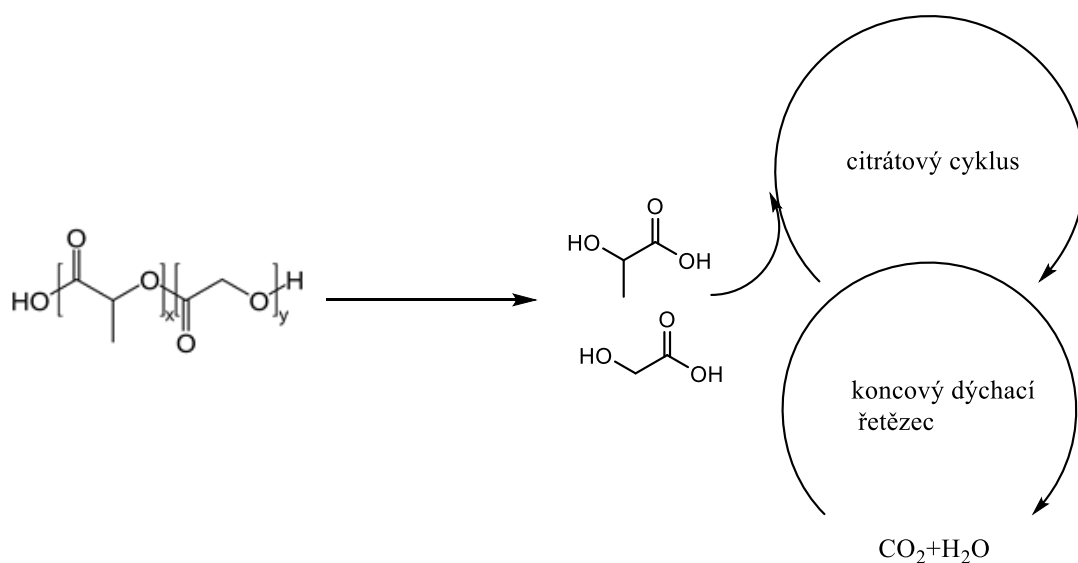
polymery pro přípravu nanočástic jsou polymery typu polyesteru: poly(mléčná kyselina) (PLA), poly(glykolová kyselina) (PGA) a jejich kopolymer, poly(laktid-ko-glykolid) (PLGA), dále poly(-kaprolakton) a poly(alkylkyanoakryláty) a také solubilní polyethylenglykol. [10, 16, 19, 23]

Poly(D,L-mléčná-ko-glykolová kyselina) (PLGA) (obrázek 6) je biologicky odbouratelný a biokompatibilní polymer schválený FDA. Díky svým vlastnostem je velmi často využíván pro řízené dodávání léčiv. [7, 46]



Obrázek 6: Poly(D,L-mléčná-ko-glykolová kyselina) (PLGA)

PLGA je kopolymerem poly(alfa-hydroxylových kyselin): kyseliny poly(mléčné) (PLA) a poly(glykolové) (PGA). PLGA je hydrofobní polymer. Fyzikálně-chemické vlastnosti PLGA jsou určeny molární hmotností, molekulární strukturou, poměrem kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, PLA vede ke zvýšené hydrofobnosti a PGA zvýšené hydrofilitě. PLGA je lineární, alifatický, syntetický polyester. Přítomnost esterové vazby v základním řetězci polymeru umožňuje jeho hydrolytickou degradaci ve vodném prostředí. Kyselina mléčná a glykolová jsou hlavními degradačními produkty, které vstupují do citrátového cyklu a z těla jsou eliminovány ve formě vody a oxidu uhličitého. Proto není PLGA spojena se systémovou toxicitou. (obrázek 7). [6, 7, 19, 43, 46]



Obrázek 7: Schéma odbourávání PLGA

Nanoformulace léčiv založené na PLGA jsou obvykle charakterizovány počátečním burst-efektem léčiva, následovaným uvolněním kinetikou nultého řádu. Profil uvolňování léčiva je ovlivněn rychlostí degradace PLGA. Rychlost degradace PLGA může být ovlivněna, již při její syntéze. Pomaleji se totiž degraduje PLGA s vyšší molární hmotností a s vyšším poměrem PLA. Rychlost degradace také ovlivňuje způsob výroby, pH prostředí a povaha interakcí PLGA-léčivo. PLGA částice podléhají homogenní erozi. Při degradaci polymeru je štěpení polymerních řetězců hydrolýzou esterové vazby pomalejší než pronikání vody do částice. Částice tedy neerodují primárně na povrchu, ale eroze probíhá homogenně v celém objemu částice. Rozměry částice se nemění, délka polymerních řetězců však klesá spolu s molární hmotností. To vede ke zvýšené molekulární mobilitě, tvorbě pórů a nakonec k difúzi enkapsulovaného léčiva. [23, 47]

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité suroviny

- Kopolymer PLGA A2 větvený na 2% kyselině polyakrylové – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (1:1)) (FaF UK, Katedra farmaceutické technologie, doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.)
- Lineární kopolymer PLGA5/5, Purasorb® PDLG 5002A – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (50:50)) (Corbion, Holandsko)
- Lineární kopolymer PLGA7/3, Purasorb® PDLG 7502A – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (75:25)) (Corbion, Holandsko)
- Poloxamer 407, Pluronic® F-127 (Merck, ČR)
- Polysorbát 20, Tween® 20 – Polyethylenglykol sorbitan monolaurát, (Merck, ČR)
- Cholát sodný (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo)
- Polyvinylalkohol (Merck, ČR)
- Span® 60 – Sorbitan monostearát (Merck, ČR)
- Kolliphor RH 40 – Makrogolglycerol hydroxystearát (Merck, ČR)
- Kolliphor HS 15 – Makrogol (15)-hydroxystearát (Merck, ČR)
- Čištěná voda (připravená reverzní osmózou, FaF UK)
- Kurkumin (Merck, ČR)
- Dexametazon (Avantor, ČR)
- Dexametazon acetát (FaF UK, Katedra analytické chemie)
- Aceton, Ethylacetát, Acetonitril, Dichlormethan (Penta, ČR)
- Trehalóza (Merck, ČR)

### 3.2 Použité přístroje

- Váhy Kern 440-53N (Kern, Německo) max. 400 g, d=0,01 g
- Analytické váhy Ohaus Diskavery (Ohaus, Švýcarsko), max 210 g, d=0,1 mg
- Magnetická míchačka IKA-WERKE RT5 Power (IKA, Německo), 100 – 1000 ot./min
- Ultrazvuková sonda Microspitze MS73 (Bandelin Electronic, Německo)
- Zetasizer ZS 90 (Malvern Panalytical, UK)

- Multifunkční chlazená centrifuga MPW 260R (MPW Medical Instruments, Polsko)
- Mini Vortexer (Heathrow Scientific, USA)
- Spektrofotometr Specord 205 (Jena analytik, Německo)
- HPLC (Agilent 1200, Agilent, USA)

### 3.3 Použité metody

#### 3.3.1 Příprava nanočástic – metoda nanoprecipitace

**Příprava vodné fáze:** Roztok surfaktantu byl připraven navážením a rozpuštěním v potřebném množství čištěné vody. Byly využity různé druhy povrchově aktivních látek (Pluronic® F-127, cholát sodný, Tween 20, PVA, Span 60, Kolliphor RH 40, Kolliphor HS 15 a jejich kombinace) a připraveny různé koncentrace vodných roztoků (m/V). Pro rychlejší rozpuštění tenzidu byl roztok míchán na magnetické míchačce (300 ot/min).

**Příprava organické fáze:** Do lékovky bylo naváženo potřebné množství léčiva pro vznik org. fáze o koncentraci: kurkumin 300 µg/ml, anebo dexametazon acetát 400 µg/ml. Dále bylo do lékovky naváženo potřebné množství polymeru (PLGA2, Cor50:50 nebo Cor75:25) pro vznik koncentrace 30 mg/ml, a poté přidáno potřebné množství organického rozpouštědla – acetonu, nebo acetonitrilu. Nejdéle do 5 minut došlo k úplnému rozpuštění polymeru i účinné látky.

**Proces nanoprecipitace:** Do 10 ml vodné fáze za stálého míchání na magnetické míchačce (300 ot./min) byl pomocí automatické pipety v jediném kroku přidán 1 ml organické fáze. Došlo ke vzniku částic, které se projeví opalescencí vzniklé nanosuspenze.

**Odpařování:** Nanosuspenze byla ponechána při laboratorní teplotě 120 minut na magnetické míchačce (300 ot./min) v digestoři, kde došlo k odpaření organického rozpouštědla.

**Příprava vzorku:** Po odpaření org. rozpouštědla byla nanosuspenze pomocí pipety přenesena z kádinky do kónické plastové zkumavky a objem suspenze byl doplněn čištěnou vodou na objem 10 ml podle rysky. Vzorek byl vortexován 30 s, přefiltrován pomocí stříkačkového filtru o velikosti pórů 1,2 µm a přenesen pomocí pipety po 2 ml do pěti mikrozkušavek typu eppendorf. Takto připravené vzorky byly



purifikovány centrifugací (jak je popsáno v kapitole 3.3.4), jedna zkumavka sloužila k proměření velikosti nanočástic, PDI a zeta-potenciálu.

### 3.3.2 Příprava nanočástic – emulzní odpařovací metoda

**Příprava vodné fáze:** Jako vodná fáze se využíval 0,5% (m/V) roztok emulgátoru Pluronic® F-127 a 1% (m/V) roztok emulgátoru PVA v čištěné vodě. Emulgátor byl navážen do kádinky a k němu se přidalo potřebné množství čištěné vody pro vznik uvedené koncentrace. Roztok Pluronic® F-127 byl pro rychlejší rozpuštění tenzidu míchán na magnetické míchačce (300 ot/min). PVA se obtížně rozpouštělo ve vodě, proto byl roztok míchán na magnetické míchačce a zároveň zahříván na teplotu 70 °C, potom byl míchán do vychladnutí.

**Příprava organické fáze:** Nejprve bylo do lékovky naváženo léčivo v množství potřebném pro vznik koncentrace: kurkumin 300 µg/ml, dexametazon acetát 400 µg/ml, dexametazon {400, 300, 150, 100, 50} µg/ml. Dále se do lékovky navázil polymer (PLGA2, Cor50:50, Cor75:25), v množství pro vznik koncentrace 30 mg/ml organické fáze. K účinné látce a polymeru se přidala směs organických rozpouštědel: dichlormethan:aceton (1:9), resp. ethylacetát:aceton (1:1) resp. (1:9), resp. čistý ethylacetát. V průběhu 5 minut došlo k úplnému rozpuštění polymeru i účinné látky v org. rozpouštědle.

**Proces ultrasonikace:** Do 25ml kádinky bylo pomocí pipety přeneseno 5 ml vodné fáze a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku (300 ot./min). Do druhé 25ml kádinky bylo také přeneseno 5 ml vodné fáze a k ní pomocí pipety přidán 1 ml organické fáze, došlo k vytvoření dvoufázového systému. Kádinka byla umístěna do ledové lázně. Pro vytvoření nanoemulze bylo třeba dodat soustavě energii pomocí vysoko-amplitudového ultrazvukového sonikátoru (Mikrospitze, Bandelin, Německo), sonikace probíhala po dobu 1 minuty na 70 % výkonu přístroje. Vytvořila se emulze, která byla přidána k 5 ml vodné fáze na míchačce. Proces odpařování a příprava vzorků již probíhala stejně jako u vzorků připravených NPM (popsáno v kapitole 3.3.1).

### 3.3.3 Měření velikosti, PDI a zeta-potenciálu

Do plastové kyvety byl přenesen 1 ml vzorku. Vzorek byl v kyvetě naředěn 1 ml čištěné vody a pomocí Zetasizeru byla změřena velikost částic v nanometrech a PDI. Intenzita rozptýleného světla byla detekována v úhlu zpětného rozptylu 173°. Velikost

a PDI nanočástic byly vypočteny na základě protokolu distribuce velikosti dle intenzity rozptýleného světla. Toto nastavení bylo zvoleno, aby se předešlo zkreslení výsledků v důsledku měnících se optických vlastností nanočástic. Viskozita média byla zvolena podle viskozity čištěné vody. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a každé měření zahrnovalo 12 nezávislých běhů. Zeta-potenciál byl stanoven pomocí elektroforetického rozptylu světla. Pro měření potenciálu byl atenuátor nastaven do automatického režimu. Byly použity elektroforetické kapilární kyvety DTS1070. Charakterizace částic pomocí Zetasizeru na principu dynamického rozptylu světla probíhala při teplotě 25 °C.

#### **3.3.4 Centrifugace**

Eppendorfovy zkumavky se 2 ml vzorku byly vloženy do rotoru centrifugy a centrifugovány při 20 °C, 15 minut, při 10 000x g. Jelikož supernatant nebyl úplně čirý, což naznačovalo, že nedošlo ke kvantitativní separaci částic, byly již všechny další vzorky centrifugovány při 14 °C, 15 minut, při 15 000x g. Zkumavky byly opatrně vyjmuty z centrifugy a pomocí automatické pipety byl odebrán supernatant nad peletou. Takto připravená peleta byla rozpuštěna v 1 ml acetonitrilu (v případě dexametazonu a dexametazon acetátu), nebo v 1 ml acetonu (v případě kurkuminu). Došlo k úplnému rozpuštění pelety.

Aby se předešlo poškození HPLC kolony při stanovení EE, byly vzorky s dexametazonem nebo dexametazon acetátem po rozpuštění v acetonitrilu znovu centrifugovány za podmínek: 25 °C, 20 minut, při 15 000x g. Nikdy nedošlo ke vzniku sedimentu a vzorky byly přeneseny do vialek na stanovení HPLC.

#### **3.3.5 Uchovávání vzorku**

Pokud bylo nutné vzorky uchovávat pro další měření, byla peleta vzniklá při centrifugaci redispergována roztokem trehalózy (5% m/V) a takto připravené vzorky pak byly uchovávány při teplotě -20 °C.

#### **3.3.6 Stanovení enkapsulační efektivity pomocí spektrofotometrie**

Pomocí spektrofotometrie byla stanovena EE kurkuminu. Pokud byly vzorky pelet uloženy při teplotě -20 °C, tak se nechaly rozmrazit při laboratorní teplotě a byly centrifugovány při 25 °C, 20 minut, při 15 000x g. Pomocí pipety se odebral supernatant, ke vzorku pelety se přidal 1 ml acetonu a takto připravený vzorek byl 10x naředěn acetonem, ředění 1:9 (V/V). K vzorkům pelet, u kterých byla EE stanovena

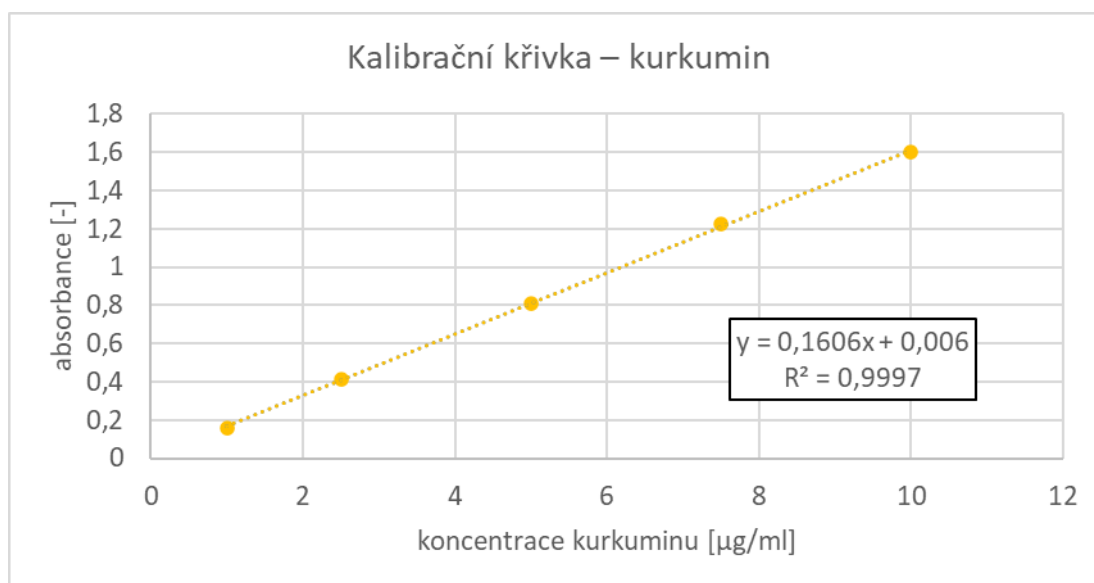
ihned po přípravě, se přidal 1 ml acetonu a vzorek byl 10x naředěn acetonem, ředění 1:9 (V/V). 2 ml naředěného vzorku byly přeneseny do skleněné kyvety.

Do vialek se navážením kurkuminu a přidáním acetonu připravila kalibrační řada, body kalibrační řady byly následující:

Tabulka 1: Kalibrační řada – kurkumin

Číslo vzorku	1	2	3	4	5
Koncentrace kurkuminu v acetonu [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1	2,5	5	7,5	10

Před každým měřením byla vytvořena nová kalibrační řada. Pomocí spektrofotometru byla zjištěna absorbance při 420 nm s použitím acetonu jako blanku. Absorbance byla změřena 3x pro každý vzorek. Z hodnot absorbance se stanovil průměr. Dále se vynesla do grafu kalibrační křivka jako závislost průměrů absorbance na koncentraci kurkuminu v roztoku. Body kalibrační křivky se proložily přímkou a byly popsány lineární funkcí a hodnotou spolehlivosti  $R^2$ . Na základě platnosti Lambert-Beerova zákona byla z rovnice vypočítána koncentrace vzorků a z ní vypočtena dosažená EE v procentech.



Graf 1: Kalibrační přímka – kurkumin v acetonu při 420 nm

Ze stanovené rovnice ( 1 ) vychází výpočet koncentrace enkapsulovaného kurkuminu. Vzorek byl před vlastním měřením 10x naředěn, proto musí být koncentrace vynásobena 10x

$$x = \frac{(y - 0,006)}{0,1606} \times 10 \quad (1)$$

kde: x je koncentrace kurkuminu [ $\mu\text{g/ml}$ ],  
y je absorbance, průměr ze tří měření [-]

Výpočet EE (rovnice ( 2 )) vychází z toho, že na přípravu nanočástic bylo využito 300  $\mu\text{g}$  kurkuminu, 10 ml vzniklé nanosuspenze bylo po odpaření organického rozpouštědla rozděleno alikvotně po 2 ml. 100 % kurkuminu v nanočásticích pro jedno měření je tedy 60  $\mu\text{g}$ .

$$EE = \left( \frac{x}{60} \right) \times 100 \quad (2)$$

kde: EE je enkapsulační efektivita [%],  
x je koncentrace kurkuminu [ $\mu\text{g/ml}$ ]

### 3.3.7 Stanovení enkapsulační efektivity pomocí HPLC

EE vzorků pelet s dexametazonem a dexametazon acetátem se stanovovala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Peleta byla rozpuštěna v 1 ml acetonitrilu a vzorek byl centrifugován, a potom přenesen do vialek na HPLC.

Do skleněných vialek byly připraveny roztoky kalibrační řady. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky – 2mM roztok dexametazonu v acetonitrilu a 2mM roztok dexametazon acetátu v acetonitrilu. K navážce se přidal acetonitril, účinná látka se ihned rozpustila. Ze zásobního roztoku byla ředěním připravena kalibrační řada. Vzorky byly po naředění přeneseny do vialek na HPLC.

Tabulka 2: Ředění roztoků kalibrační řady – dexametazon a dexametazon acetát

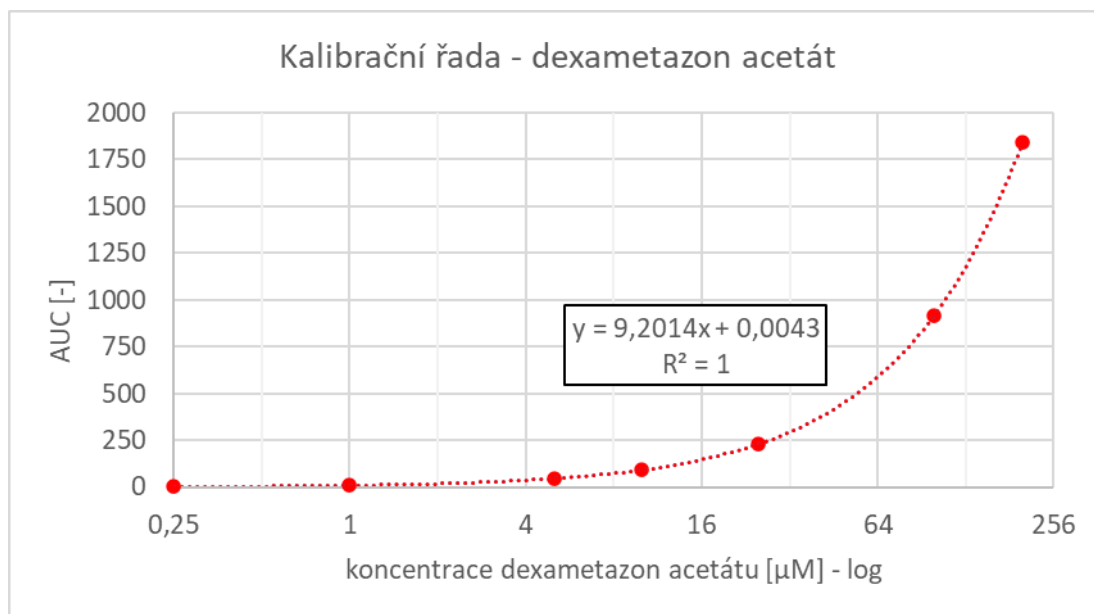
Číslo vzorku	Koncentrace kalibrační řady	Ředění	Ředění – množství acetonitrilu
	[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{l}$ ]	[ $\mu\text{l}$ ]
1	0,25	100 roztoku číslo 2	3000
2	1	800 roztoku číslo 3	3200
3	5	2000 roztoku číslo 4	2000
4	10	1600 roztoku číslo 5	2400
5	25	1000 roztoku číslo 6	3000
6	100	2000 roztoku číslo 7	2000
7	200	400 zásobního roztoku	3600

Při každém měření HPLC byla připravena nová kalibrační řada, protože s každým měřením docházelo k mírnému zanášení kolony a podmínky tak byly vždy trochu odlišné, ani rovnice popisující kalibrační přímku nebyly stejné. Vždy byla připravena vialka s promývacím roztokem, který měl stejné složení jako mobilní fáze.

Podmínky provedení HPLC:

- Objem nástřiku: 10,00  $\mu\text{l}$
- Teplota termostatovaného kompartmentu na koloně: 25 °C
- UV detektor: 238 nm
- Stacionární fáze – Chromatografická kolona Restek Ultra 100 A
  - Typ stacionární fáze: C18
  - Velikost částic [ $\mu\text{m}$ ]: 5
  - Délka x průměr [mm]: 150 x 4,6
- Složení mobilní fáze při stanovení EE dexametazonu:
  - acetonitril : voda (40 % : 60 %)
  - retenční čas: 4,2 min
- Složení mobilní fáze při stanovení EE dexametazon acetátu:
  - acetonitril : voda (50 % : 50 %)
  - retenční čas: 5,3 min
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min

Za těchto podmínek byly proměřeny vzorky pelet. Byly odečteny plochy pod křivkou (AUC) píku, který odpovídal účinné látce. Byl sestaven graf závislosti AUC na koncentraci účinné látky ve roztoku, vynesené body byly proloženy přímkou a popsány lineární funkcí. Byla zobrazena hodnota spolehlivosti  $R^2$ .



Graf 2: Kalibrační řada (logaritmické měřítko osy x) – dexametazon acetát

Na základě rovnic 3, 4, 5 bylo určeno množství účinné látky v nanočásticích.

$$x = \frac{(y - 0,0043)}{9,2014} \quad (3)$$

kde: x je koncentrace účinné látky v nanočásticích [µM],

y je AUC [-]

$$c = \left( \frac{x}{1\,000\,000} \right) \cdot M_n \cdot 1000 \quad (4)$$

kde: c je koncentrace účinné látky v nanočásticích [µg/ml],

x je koncentrace účinné látky v nanočásticích [µM],

$M_n$  je molekulová hmotnost účinné látky [-]

$$m [\mu\text{g}] = c \cdot 1 \quad (5)$$

kde: m je množství účinné látky v 1 ml [µg],

c je koncentrace účinné látky v nanočásticích [µg/ml]

Úpravou rovnic 3, 4, 5 byla získána finální rovnice (6) pro výpočet množství účinné látky enkapsulované v nanočásticích

$$m = \frac{(y - 0,0043)}{9,2014 \cdot 1\,000\,000} \cdot M_n \cdot 1000 \quad (6)$$

kde:  $m$  je množství účinné látky v 1 ml [ $\mu\text{g}$ ],  
 $y$  je AUC [-],  
 $M_n$  je molekulová hmotnost účinné látky [-]

Výpočet EE (rovnice (7)) vychází z toho, že při přípravě nanočástic se použilo 400  $\mu\text{g}$  účinné látky v 1 ml organického rozpouštědla, po jehož odpaření bylo 10 ml surové nanosuspenze rozdělena do pěti alikvot po 2 ml. 100 % účinné látky v nanočásticích pro jedno měření je tedy 80  $\mu\text{g}$ .

$$EE = \left(\frac{m}{80}\right) \times 100 \quad (7)$$

kde: EE je enkapsulační efektivita [%],  
 $m$  je množství účinné látky v 1 ml [ $\mu\text{g}$ ],

### 3.3.8 Mikroskopie

Nanosuspenze s enkapsulovaným dexametazon acetátem byly podrobeny zkoumání pod polarizačním mikroskopem, kvůli prokázání nebo vyloučení vzniku krystalů dexametazon acetátu, které by vedly k falešně pozitivním výsledkům EE hodnocené pomocí HPLC.

Pomocí kapátka byla na podložní sklíčko nanesena 1 kapka nanosuspenze. Podložní sklíčka se 30 minut ponechala v digestoři, kdy došlo k odpaření kapaliny. Obvod zaschlé kapky se obtáhnul úzkým černým fixem pro snazší orientaci na sklíčku pod mikroskopem.

Pro ověření habitu krystalů dexametazon acetátu byly vytvořeny kontrolní vzorky. Při jejich přípravě bylo postupováno naprosto shodně, jako při přípravě nanočástic, jen k organické fázi nebyl přidán polymer, aby došlo ke vzniku krystalů dexametazon acetátu.

Podložní sklíčko bylo vloženo pod polarizační mikroskop, po zaostření bylo celé označené pole prohlédnuto posuvem objektivu, obraz byl zprostředkován a analyzován prostřednictvím analySIS auto 5.1.

Parametry mikroskopie:

- Zvětšení: 10x

- Rozlišení kamery: 1360 x 1024 px
- Rozlišení fotoaparátu: 4140 x 3096 px
- Velikost jednoho pixelu: 0,2164  $\mu\text{m}$

### 3.3.9 Proces čištění

Pro proces čištění byly vybrány 3 vzorky nanočástic s dexametazon acetátem připravené NPM. Jedná se o opakování experimentu, tyto 3 druhy vzorků již byly dříve připraveny, a protože dosáhly dostatečně vysoké EE a vhodných parametrů stran velikosti a zeta-potenciálu, mohly by být po vyčištění použity k experimentům na buněčných kulturách.

Tabulka 3: Vzorky připravené NPM pro purifikaci

Číslo vzorku	Polymer	Org. fáze	Vodná fáze	DexAct
1	PLGA2	Aceton	0,5% PIF-127	400 $\mu\text{g/ml}$
2	Cor50:50	Aceton	0,5% PIF-127	400 $\mu\text{g/ml}$
3	Cor75:25	Aceton	0,5% PIF-127	400 $\mu\text{g/ml}$
Blanky				
4	PLGA2	Aceton	0,5% PIF-127	–
5	Cor50:50	Aceton	0,5% PIF-127	–
6	Cor75:25	Aceton	0,5% PIF-127	–

Nanočástice byly připraveny standardně, jak je uvedeno v kapitole 3.3.1. Vzorky 1), 2), 3) byly přefiltrovány přes 1,2 $\mu\text{m}$  sterilní filtr přímo do centrifugačních koncentrátorů. Blanky 4), 5), 6) nebyly filtrovány, ale pomocí pipety byl celý objem, tedy 10 ml, přenesen do kónických zkumavek s membránou a byly centrifugovány po dobu 30 minut, při 14 °C, při 6 000x g. Do dolní části zkumavky přes membránu přešla pouze část kapaliny, přešlo 7,5 ml a 2,5 ml zůstalo nad membránou, proto byla provedena ještě jedna centrifugace po dobu 10 minut, při 14 °C, na 6 000x g.

Z horní části zkumavek bylo 2,5 ml nanosuspenze kvantitativně přeneseno do centrifugačních zkumavek, objem byl doplněn na 10 ml čištěnou vodou. Poté byl odebrán vzorek o objemu 1,5 ml pro Zetasizer a vzorek o objemu 2 ml pro HPLC analýzu.

Vzorek se v laminárním boxu s horizontálním prouděním přefiltroval přes sterilní 0,45 $\mu\text{m}$  filtr do sterilních centrifugačních zkumavek. Přefiltrované vzorky byly centrifugovány při 8 000x g, 15 min, při 14 °C. V laminárním boxu byl odebrán



supernatant do nových sterilních zkumavek a peleta byla redispergována v 1 ml 5% sterilního roztoku trehalózy. Zkumavky se supernatantem se dále centrifugovaly při 10 000x g, 20 minut, při 14 °C, vzorek byl zpracován stejným způsobem jako v předchozím případě.

Takto zpracované vzorky byly spojeny do jedné zkumavky, potom alikvotně rozděleny po 2 ml do 3 Eppendorfových zkumavek. Vzorky byly uloženy při -70 °C.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Výsledky měření s použitím kurkuminu

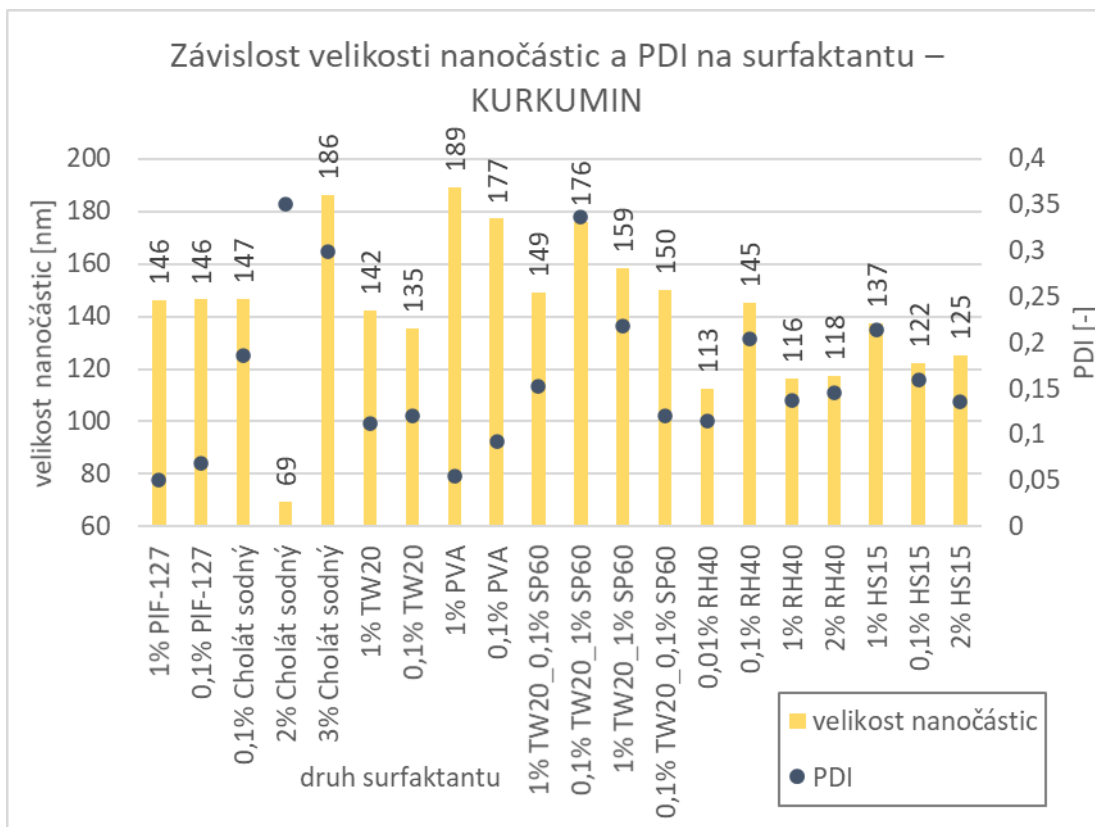
#### 4.1.1 Vliv různých surfaktantů

Vliv zvoleného druhu a koncentrace surfaktantu na velikost a PDI nanočástic s enkapsulovaným kurkuminem, které byly připraveny NPM, lze nalézt v grafu 3. Cílem bylo zvolit nejvýhodnější surfaktant pro další přípravy nanočástic.

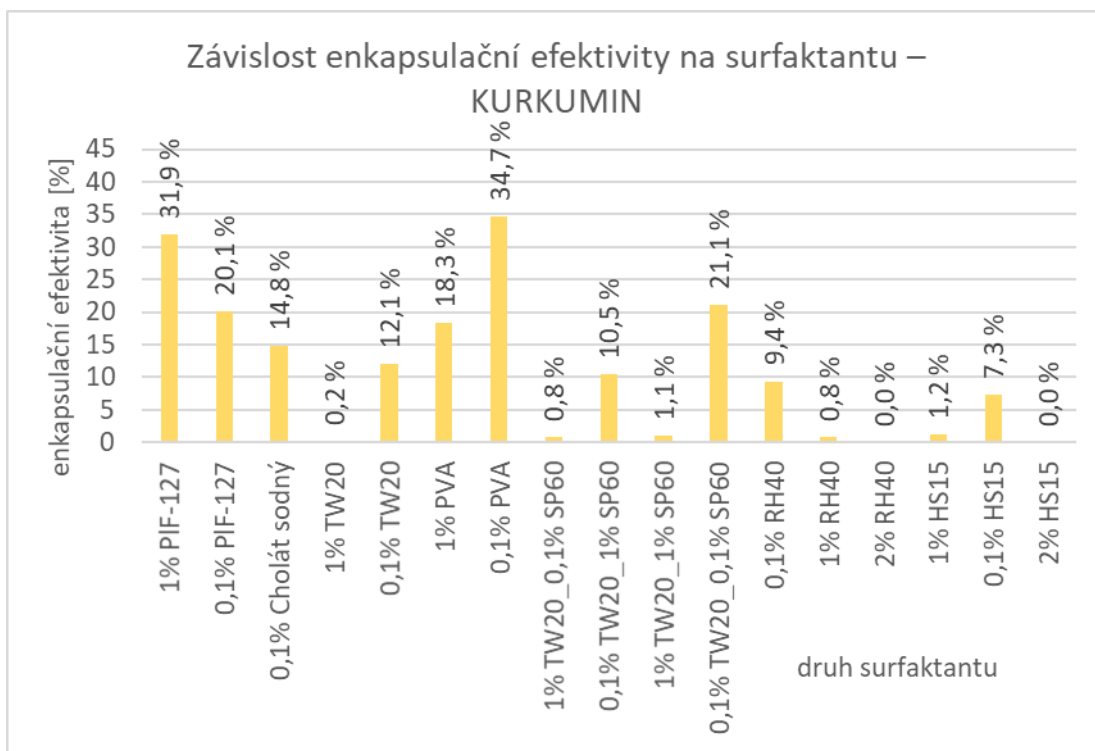
Vhodné velikosti pro pasivní targeting do buněk MPS v rozmezí 100–300 nm dosáhly všechny vzorky, kromě vzorku s použitím 1% roztoku cholátu sodného, kde velikost nanočástic byla přes 4000 nm (výsledky nejsou zaneseny v grafu 3) a vzorku s 2% roztokem cholátu sodného, kde naopak nanočástice nedosáhly ani 100 nm. V koncentracích 1%, 2%, 3% se cholát sodný projevil jako nevhodný surfaktant, protože po centrifugaci došlo k vytvoření nerozdispergovatelné pelety. Velikost nanočástic ostatních vzorků se pohybovala v ideálním rozmezí 110–190 nm, ovšem jejich polydisperzita byla různá. Jak uvádí graf 3 největší nanočástice vznikly s použitím 1% roztoku PVA (189 nm) naopak nejmenší s použitím 2% roztoku cholátu sodného (69 nm)

Z grafu 4 je zřejmé, že nejvyšší EE dosáhnul vzorek s 0,1% PVA (34,7 %). EE nad 20 % dosáhly vzorky s Pluronic® F-127, PVA a kombinace surfaktantů 0,1% Tween 20 a 0,1% Span 60. U vzorků 1%, 2%, a 3% cholátu sodného se EE nestanovovala kvůli vzniku agregátu. Stejně tak vznikl agregát ve vzorku s 0,01% Kolliphor RH40, kde koncentrace surfaktantu byla zřejmě příliš nízká, vzorek byl nestabilní. Vzorky se surfaktantem 0,1% cholát sodný, 0,1% a 1% Tween 20, kombinace Tween 20 a Span 60, různé koncentrace Kolliphoru RH40 a HS15, i když dosáhly vhodných velikostí a PDI, tak měly velmi nízkou EE.

Jako nejvýhodnější byly stran velikosti, PDI a EE vyhodnoceny surfaktanty Pluronic® F-127 a PVA, nanočástice měly ideální velikost v rozmezí od 140–190 nm a PDI menší než 0,1 a zároveň dosáhly EE kolem 20 % a vyšší. Tyto surfaktanty byly proto používány v dalších pokusech. Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.1



Graf 3: NPM, polymer PLGA2, org. fáze aceton, konc. kurkuminu 300 µg/ml, různé druhy a koncentrace vodné fáze



Graf 4: NPM, polymer PLGA2, org. fáze aceton, konc. kurkuminu 300 µg/ml, různé druhy a koncentrace vodné fáze

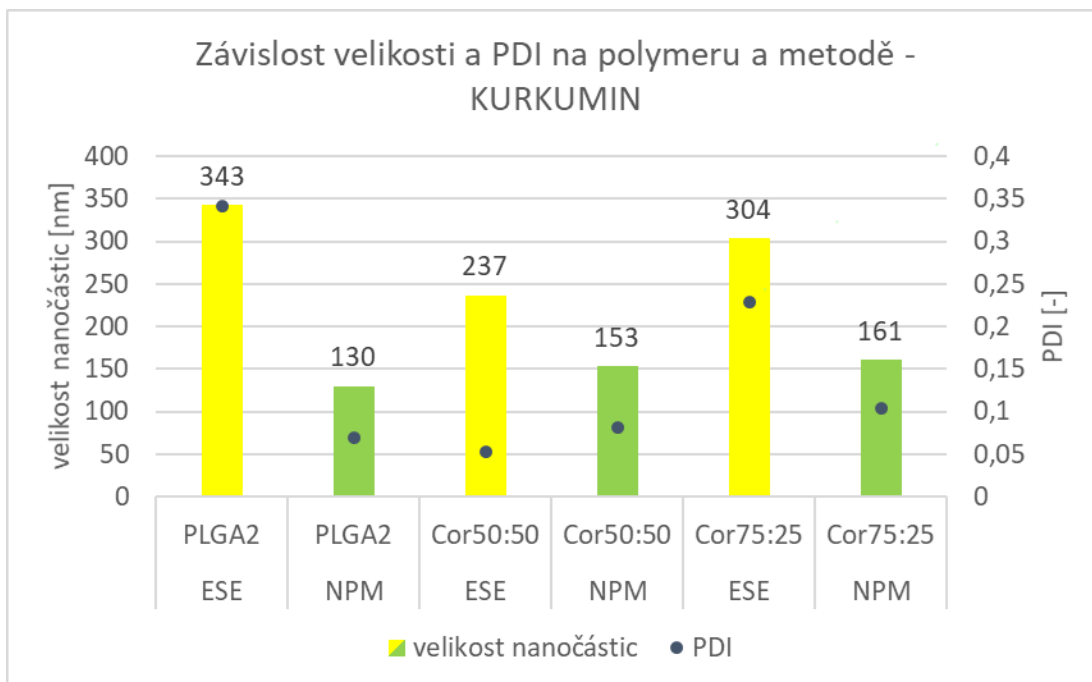
#### 4.1.2 Použití různých polymerů, porovnání NPM a ESE

Při měření se porovnávaly 2 metody přípravy a používaly se 3 typy polymeru PLGA s různým poměrem kyseliny mléčné (LA) a kyseliny glykolové (GA):

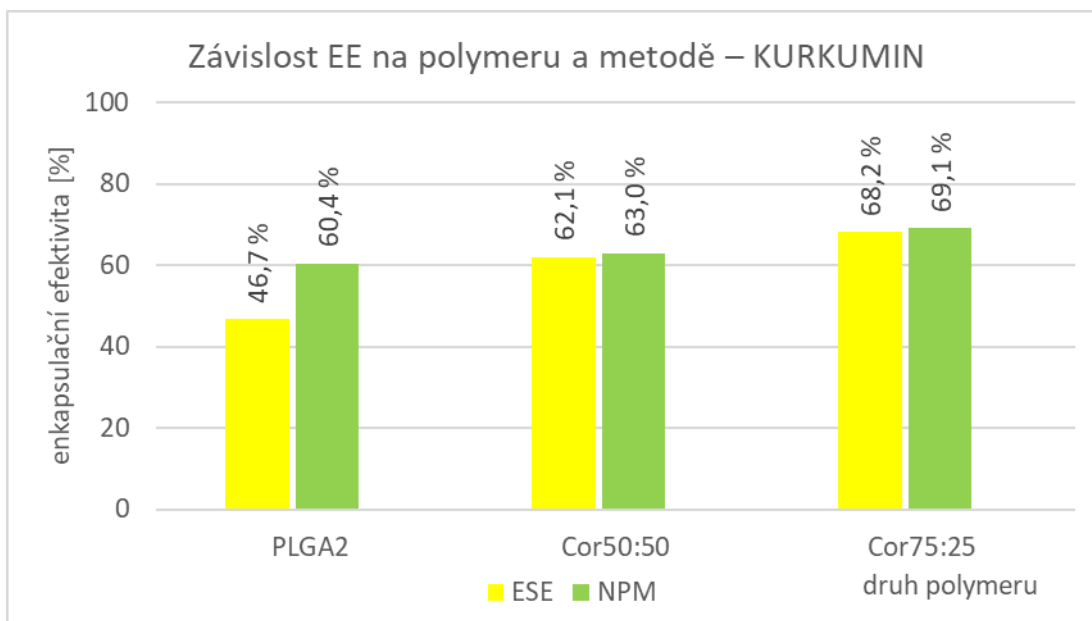
- PLGA A2: jedná se o kopolymer PLA a PGA s ekvimolárním poměrem LA a GA, větvený na kyselině polyakrylové, která byla přidána do reakční směsi v koncentraci 2 %. Díky tomu se jedná o větvený polymer s vyšším obsahem terminálních karboxylů ve své struktuře, které mohou způsobovat jeho méně lipofilní charakter ve srovnání s lineárními PLGA polymery;
- Cor50:50 je kopolymer PLGA, kde je LA:GA (50:50);
- Cor75:25 kopolymer PLGA, kde je LA:GA (75:25), kvůli nejvyššímu zastoupení LA je nejlipofilnější z používaných polymerů.

Z grafu 5 je patrné, že nanočástice vytvořené NPM jsou výrazně menší než připravené ESE metodou, také jejich PDI je menší. Nejlepší z hlediska EE je použití polymeru Cor75:25, který je nejlipofilnější z použitých polymerů. Viz graf 6. Je zde tedy patrná spojitost mezi silně lipofilním kurkuminem (LogP 3,2) a lipofilitou polymeru. Hodnoty EE se pohybují v rozmezí od 47 % do 69 %.

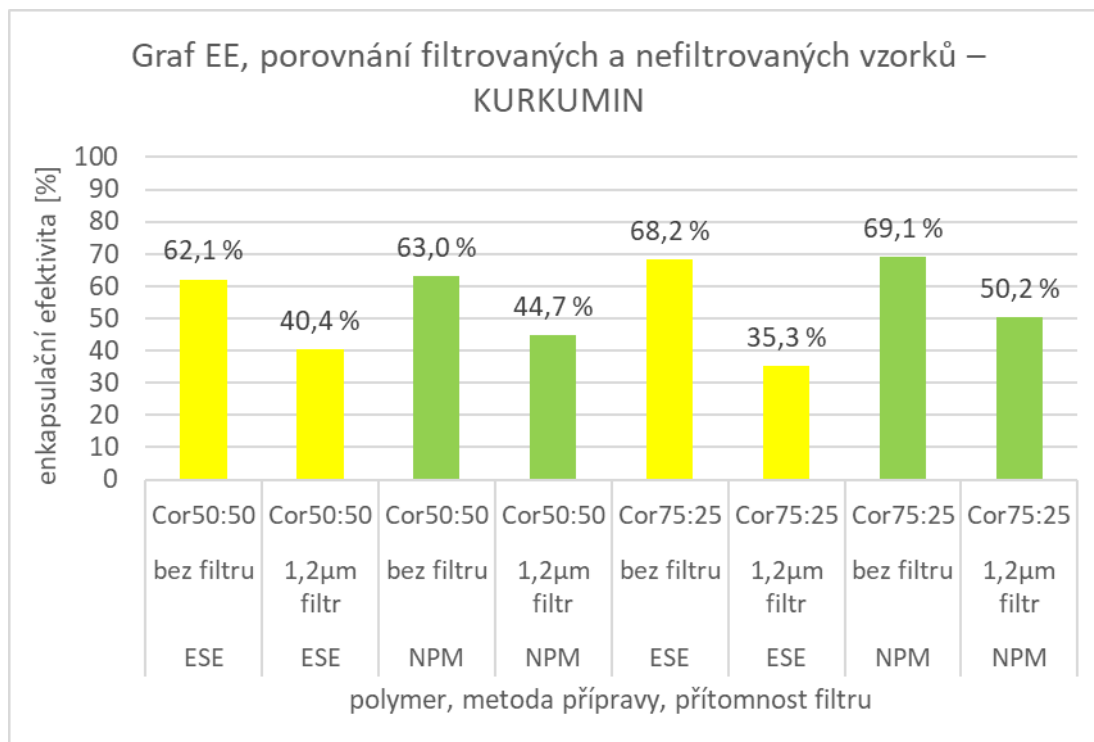
Vzorky připravené s Cor50:50 a Cor75:25 byly přefiltrovány přes filtr s velikostí pórů 1,2  $\mu\text{m}$ . Jak ukazuje graf 7, EE se filtrací snížila o třetinu a u některých vzorků ještě o více, což naznačuje buď přítomnost neadekvátně velkých částic, případně ukazuje na přítomnost krystalů účinné látky, což je vzhledem k faktu, že kurkumin je látka ve vodě prakticky nerozpustná pravděpodobné. Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.2



Graf 5: NPM/ESE, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton/EtAc:Ac(1:9), konc. kurkuminu 300 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127



Graf 6: NPM/ESE, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton/EtAc:Ac(1:9), konc. kurkuminu 300 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127



Graf 7: NPM/ESE, polymer Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton/EtAc:Ac(1:9), konc. kurkuminu 300 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127, ne/přítomnost filtru 1,2 µm

## 4.2 Výsledky měření s použitím dexametazonu

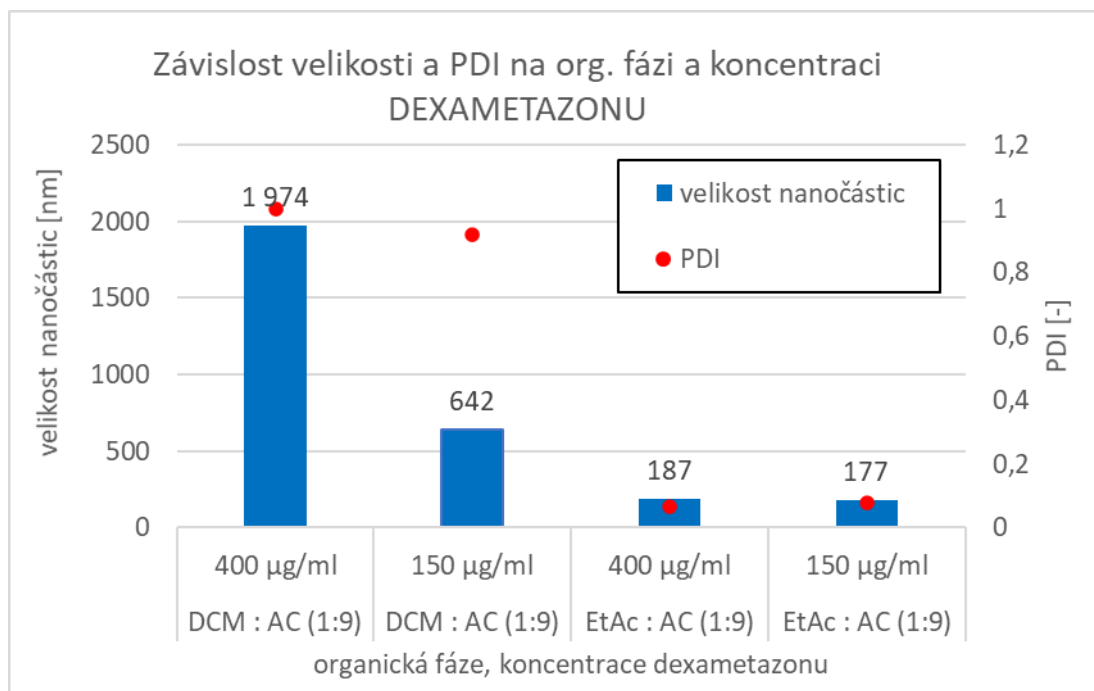
### 4.2.1 Vliv organické fáze a vstupní koncentrace dexametazonu

Při měření se porovnávaly dva druhy organické fáze: dichlormethan:aceton (DCM:AC) (1:9) a ethylacetát:aceton (EtAc:AC) (1:9), která z nich bude vhodnější pro ESE metodu přípravy. Také se porovnávaly dvě různé vstupní koncentrace dexametazonu: 150 a 400 µg/ml. Při všech měřeních se použil polymer PLGA2 a vodnou fází tvořil 0,5% roztok Pluronic® F-127. Vzorky byly centrifugovány za podmínek 20 °C, 15 minut, na 10 000x g, jak je uvedeno v kapitole 3.3.4

Použití organické fáze ve složení DCM:AC (1:9) se neosvědčilo. Vzniklé nanočástice byly příliš velké (1974 nm a 642 nm), viz graf 8. Vzorky byly mléčně zakalené, silně napěněné a na dně kádinky se vytvářela bílá sedlina. Organická fáze EtAc:AC (1:9) se jeví jako výhodnější, výsledná velikost se pohybovala v optimálním rozmezí 100-300 nm pro pasivní targeting do buněk MPS. Ethylacetát je více polární než dichlormethan, což zjevně hraje roli při vzniku fázového rozhraní při tvorbě nanočástic. Z grafu 8 vyplývá, že koncentrace dexametazonu nemá vliv na velikost vzniklých nanočástic. Zeta potenciál a EE byla změřena jen u vzorků vytvořených v EtAc:AC (1:9) a ve výsledcích s použitím koncentrace 400 µg/ml a 150 µg/ml

dexametazonu není markantní rozdíl. Zeta potenciál vyšel u obou koncentrací -14 mV a EE 10,4 % a 7,8 % (v pořadí 400 µg/ml a 150 µg/ml).

Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.3. Vliv vstupní koncentrace byl znovu zkoumán, jak je popsáno v následující kapitole 4.2.2.



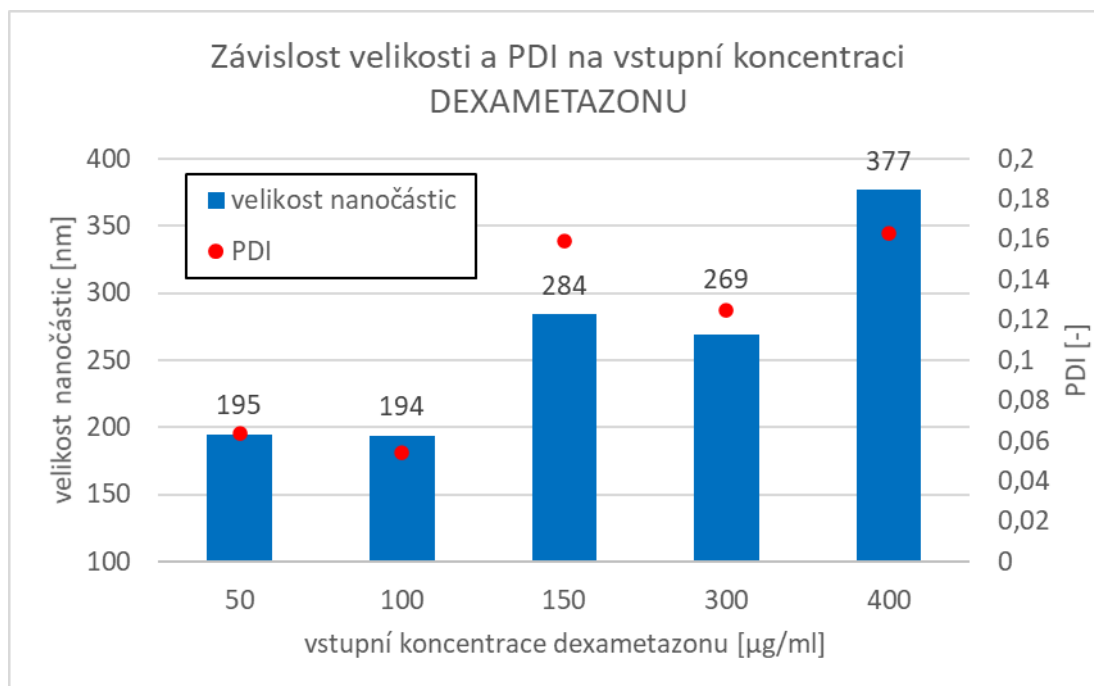
Graf 8: ESE, polymer PLGA2, org. fáze DCM:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 150/400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127

#### 4.2.2 Vliv vstupní koncentrace dexametazonu

Tímto experimentem se navázalo na měření popsané v kapitole 4.2.1, cílem bylo ověřit, zda má vstupní koncentrace účinné látky vliv na charakteristiky nanočástic. Vzorky byly připraveny ESE metodou za konstantního složení vodné fáze (0,5% roztok Pluronic® F-127), org. fáze (EtAc:AC (1:9)), s PLGA2 polymerem, vstupní koncentrace dexametazonu byla 50, 100, 150, 300, 400 µg/ml.

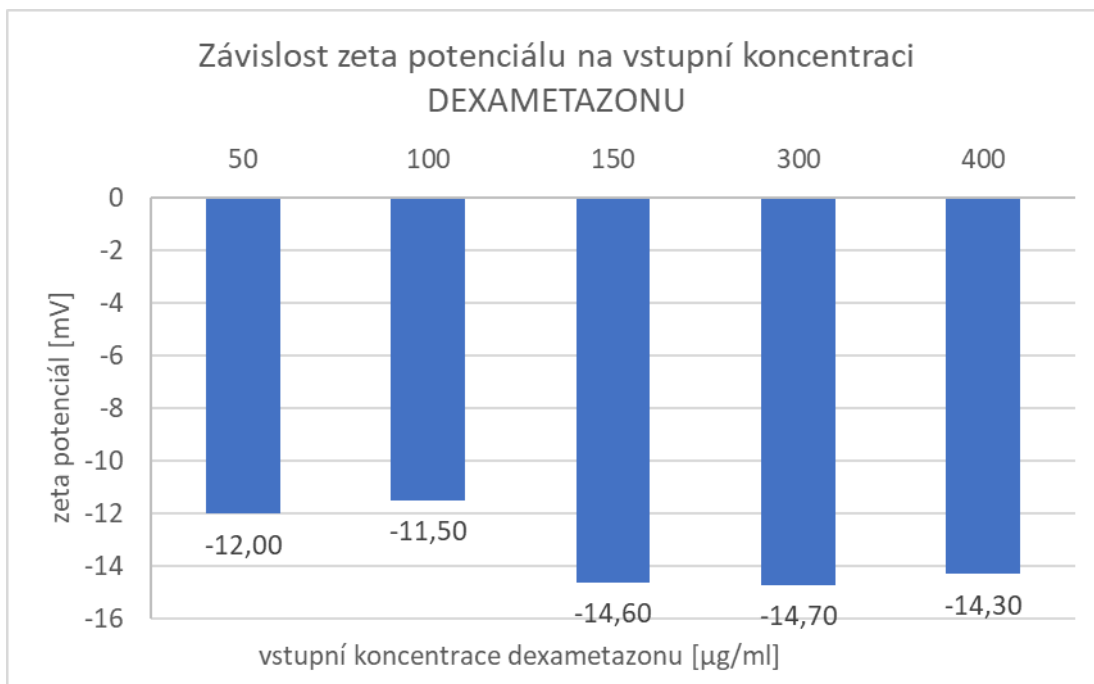
Podle grafu 9 se velikost nanočástic zvyšuje s rostoucí koncentrací dexametazonu, ale spolu s ní se zvyšuje i PDI, což může být způsobeno buď přítomností krystalů dexametazonu ve vodné fázi nebo tím, že vyšší koncentrace dexametazonu interferuje s fázovým rozhráním vzniklé emulze a způsobuje agregaci vzniklých částic. Nicméně s ohledem na to, že PDI se pohybovala pod 0,2, byly i tyto vzorky vyhodnoceny jako vyhovující. Z grafů 10, 11 lze usoudit, že zvyšující se koncentrace dexametazonu nemá vliv na zeta potenciál, ani na EE.

Z výsledků experimentu lze usoudit, že koncentrace použitého dexametazonu má vliv na velikost nanočástic (jak ukazuje graf 9) a nemá vliv na EE (viz graf 11). Stoupající velikost a PDI připravených nanočástic by mohla ukazovat na vznik krystalů účinné látky, nicméně toto se mikroskopickým experimentem nepodařilo prokázat. V dalších experimentech s dexametazonem se používala pouze koncentrace 400  $\mu\text{g/ml}$ , která je optimální pro následná biologická hodnocení. Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.4

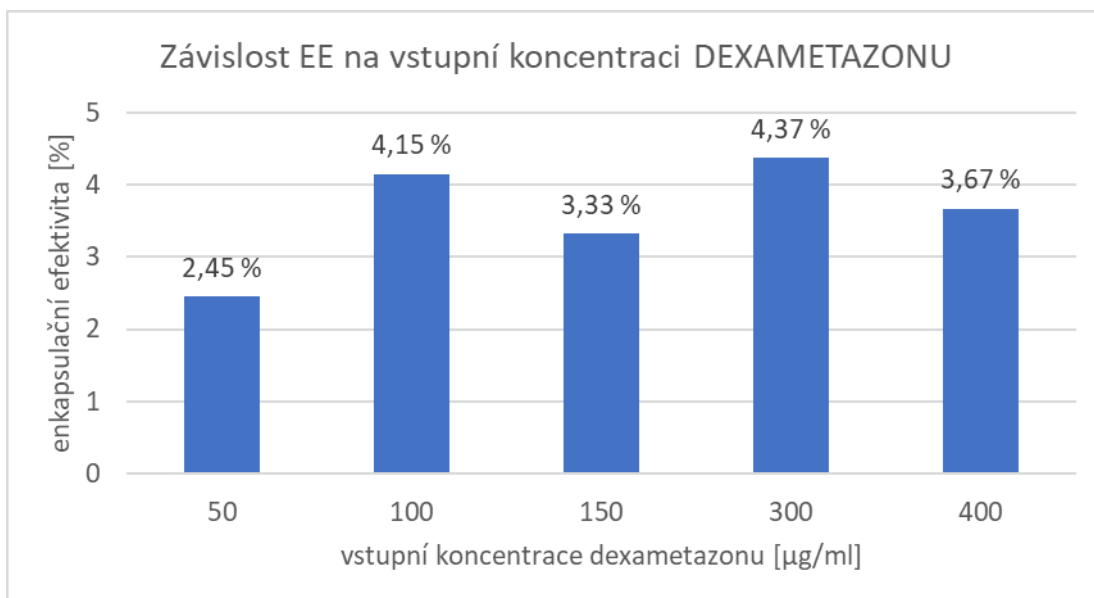


Graf 9: ESE, polymer PLGA2, org. fáze EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 50/100/150/300/400  $\mu\text{g/ml}$ , vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127





Graf 10: ESE, polymer PLGA2, org. fáze EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 50/100/150/300/400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127



Graf 11: ESE, polymer PLGA2, org. fáze EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 50/100/150/300/400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127

Vliv vstupní koncentrace dexametazonu na enkapsulaci byl hodnocen ve studii Gómez-Gaete a kol. (2006) [25]. Ve studii bylo využito 100 mg polymeru PLGA75:25, jako organická fáze 5 ml směsi AC:DCM (1:1), jako vodná fáze 0,25% roztok PVA a nanočástice byly připraveny ESE metodou. Použité hmotnosti dexametazonu byly v rozmezí 220 µg až 21 mg, tedy o několik řádů vyšší než v této

práci. Výsledky práce ukazují, že se zvyšující se vstupní hmotností se inkorporace dexametazonu do nanočástic zvyšuje, a to až do vstupní hmotnosti 10 mg dexametazonu, kde se dosáhlo enkapsulace 230  $\mu\text{g}/100$  mg PLGA. S dalším zvyšováním vstupní hmotnosti, již enkapsulace mírně klesá a stabilizuje se kolem 170  $\mu\text{g}/100$  mg PLGA. Studie tento výsledek vysvětluje tím, že v polymerní matici existuje konkurence mezi molekulární disperzí léčiva v polymeru a krystalizačními silami ve vodném roztoku. Zpočátku se množství inkorporovaného dexametazonu v nanočásticích zvyšuje, dokud není matrice nasycena (vstupní hmotnost dexametazonu  $<10$  mg). Při koncentraci, kdy převáží tvorba krystalů nad disperzí v polymeru, se krystalizace stává hlavní hnací silou a přispívá ke snížení množství enkapsulovaného léčiva. Nakonec je dosaženo rovnováhy krystalizovaným a inkorporovaným dexametazonem. Ve studii se prokázalo, že velikost nanočástic není ovlivněna počátečním množstvím dexametazonu. [25]

V našem experimentu se zdá, že vstupní koncentrace neovlivňuje EE, ale ovlivňuje velikost částic, což je v rozporu s výsledky studie Gómez-Gaete a kol. (2006) [25] Nicméně nižší použité koncentrace účinné látky by mohly být vysvětlením tohoto rozdílu.

#### **4.2.3 Výběr vhodné org. a vodné fáze, porovnání dvou polymerů**

Cílem tohoto experimentu bylo zvolit vhodnou organickou fází pro ESE metodu přípravy. Porovnávány byly charakteristiky nanočástic vzniklých s org. fázemi: EtAc:AC (1:9), EtAc:AC (1:1), a čistý ethylacetátem (EtAc). Na základě předchozích experimentů byly zvoleny vodné fáze: 0,5% roztok Pluronic<sup>®</sup> F-127 a 1% PVA. Pro tyto experimenty byly zvoleny dva typy polymerů PLGA2 a Cor50:50, koncentrace dexametazonu byla konstantní 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Vzorky s čistým EtAc a polymerem PLGA2 byly ihned po odpaření rozpouštědla úplně transparentní. Vysvětlení je zřejmé z grafu 12, protože vzniklé nanočástice byly v porovnání s ostatními výrazně menší (77,82 nm a 130,37 nm). U vzorků s EtAc:AC (1:9) a (1:1) byl zákal mnohem výraznější s ohledem na vyšší velikost nanočástic.

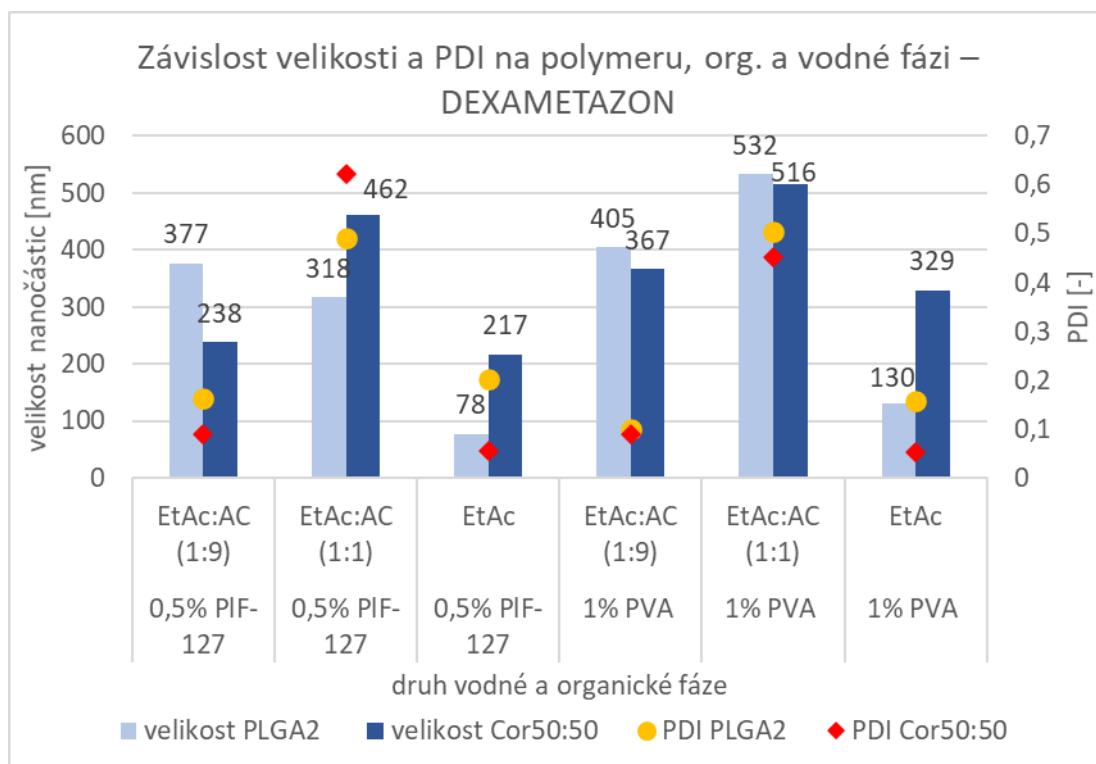
Z grafu 12 je zřejmé, že použití org. fáze EtAc:AC (1:1) je nevýhodné, vzniklé nanočástice jsou větší než 300 nm a PDI je větší než 0,5. Stran velikosti a PDI jsou výhodnější EtAc:AC (1:9) nebo čistý ethylacetát. Z hlediska volby vodné fáze 0,5%

roztok Pluronic® F-127 poskytuje při ESE metodě menší částice než 1% PVA. Vysvětlení spočívá v jeho vyšší povrchové aktivitě.

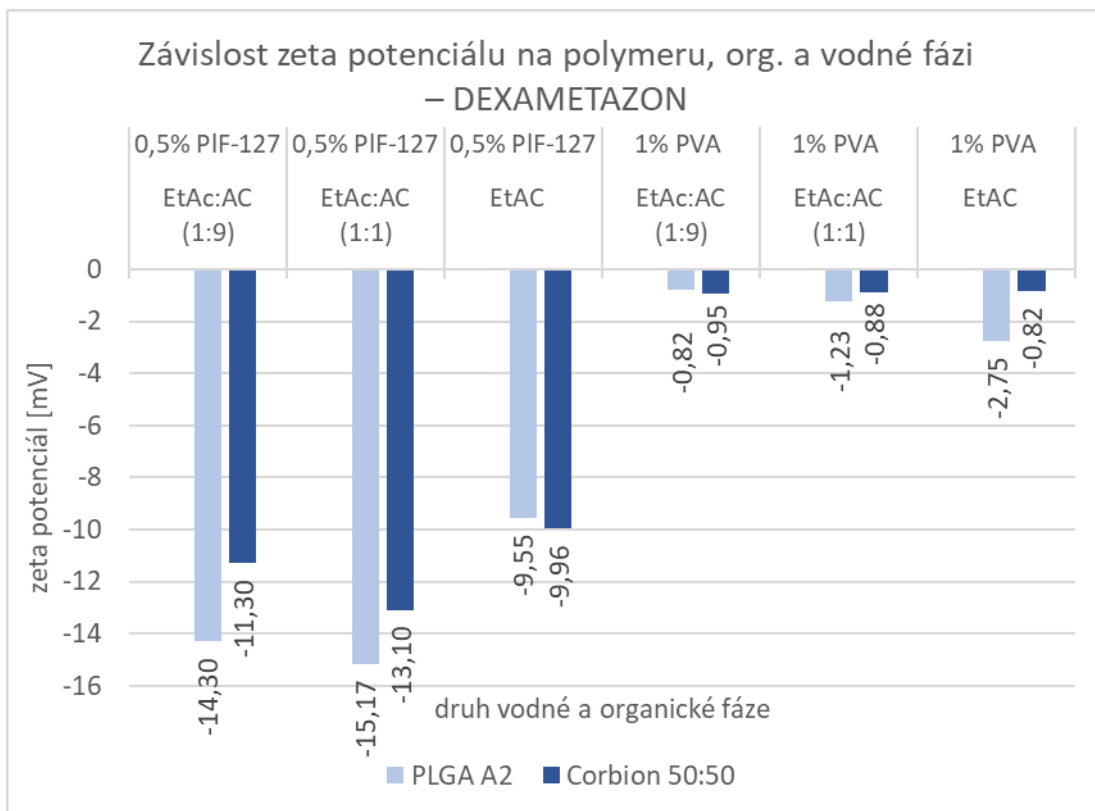
Při použití 1% roztoku PVA jako vodné fáze byl zeta potenciál výrazně vyšší a blízký nule ve srovnání s použitím 0,5% Pluronic® F-127. Viz graf 13. PVA jednoznačně maskuje zeta potenciál. Literatura uvádí, že pro pasivní targeting do MPS je výhodný záporný povrchový náboj, nanosuspenze je stabilnější. [10]

EE vzorků je zaznamenána v grafu 14. V souvislosti s výsledky z granulometrie (viz graf 12) je zřejmé, že nejlepších výsledků při ESE metodě dosáhl čistý EtAc s 0,5% Pluronic® F-127 s Cor50:50 (velikost 217 nm a EE 9,7 %). Všechny ostatní vzorky mají EE v rozmezí od 2,1 % do 10,3 %. Lze konstatovat, že hlavní roli hraje interakce účinné látky s polymerem, metoda přípravy je pro EE zřejmě vedlejší.

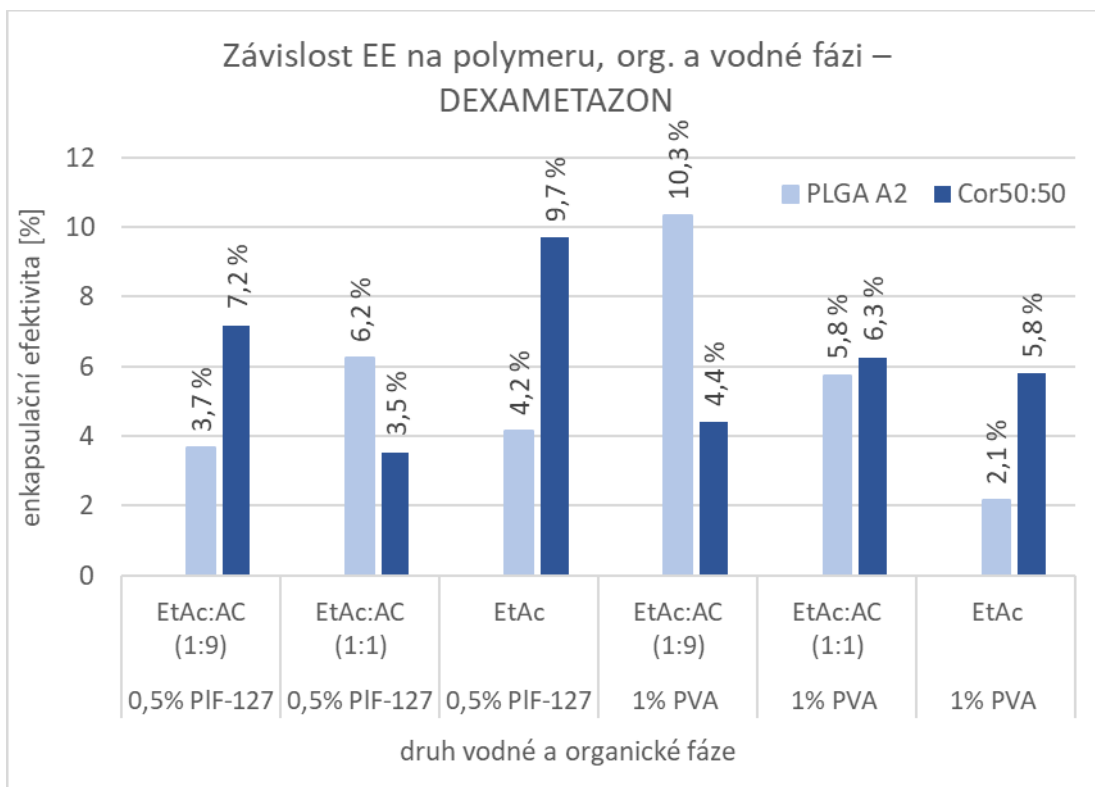
Pro další experimenty byla zvolena org. fáze EtAc:AC (1:9) a jako vodná fáze 0,5% roztok Pluronic® F-127. Od PVA bylo především kvůli komplikovanějšímu způsobu přípravy v dalších měřeních upuštěno. PVA je navíc stabilizátor, který nemusí být kompatibilní se všemi buněčnými kulturami, proto byly jako optimální zvoleny formulace stabilizované Pluronicem® F-127, byť dosažená hodnota EE byla nižší. Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.5.



Graf 12: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze: EtAc:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:1)/Ethylacetát, konc. dexametazonu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127/1% PVA



Graf 13: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze: EtAc:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:1)/Ethylacetát, konc. dexametazonu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127/1% PVA



Graf 14: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze: EtAc:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:1)/Ethylacetát, konc. dexametazonu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127/1% PVA

### 4.3 Výsledky měření s použitím dexametazon acetátu

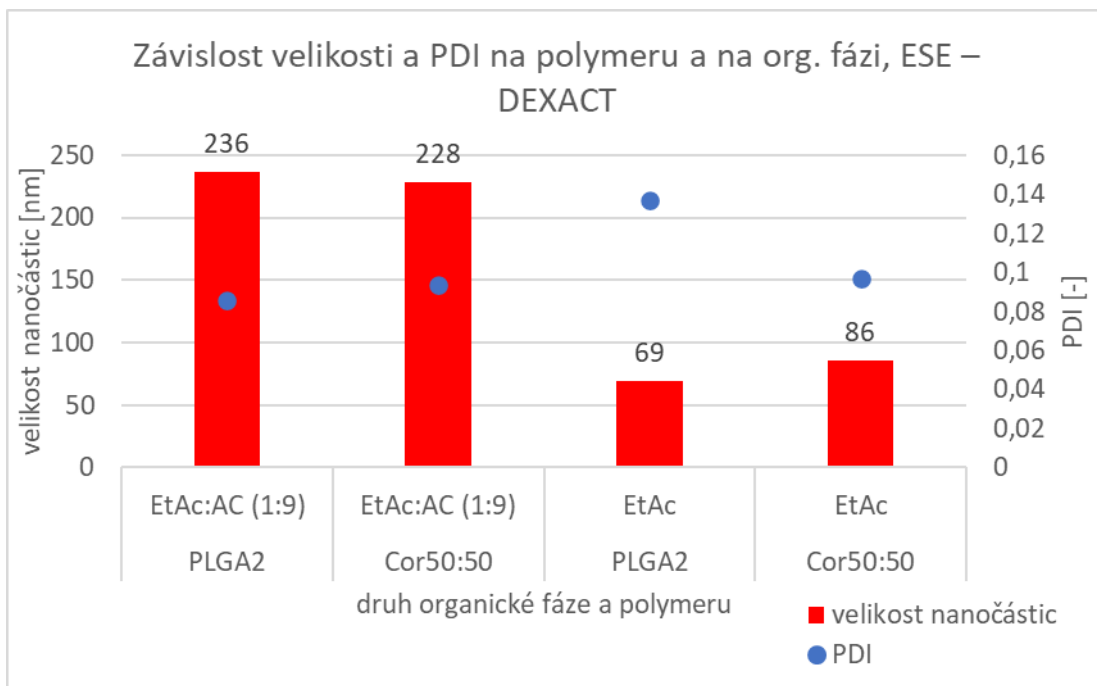
#### 4.3.1 ESE metoda, výběr org. fáze, porovnání dvou polymerů

K použití dexametazon acetátu bylo přistoupeno kvůli neuspokojivým výsledkům EE pro dexametazon. S ohledem na to, že dexametazon acetát ( $\log P$  2,8) je lipofilnější derivát předlokové látky dexametazonu ( $\log P$  1,9), dala se předpokládat vyšší EE.

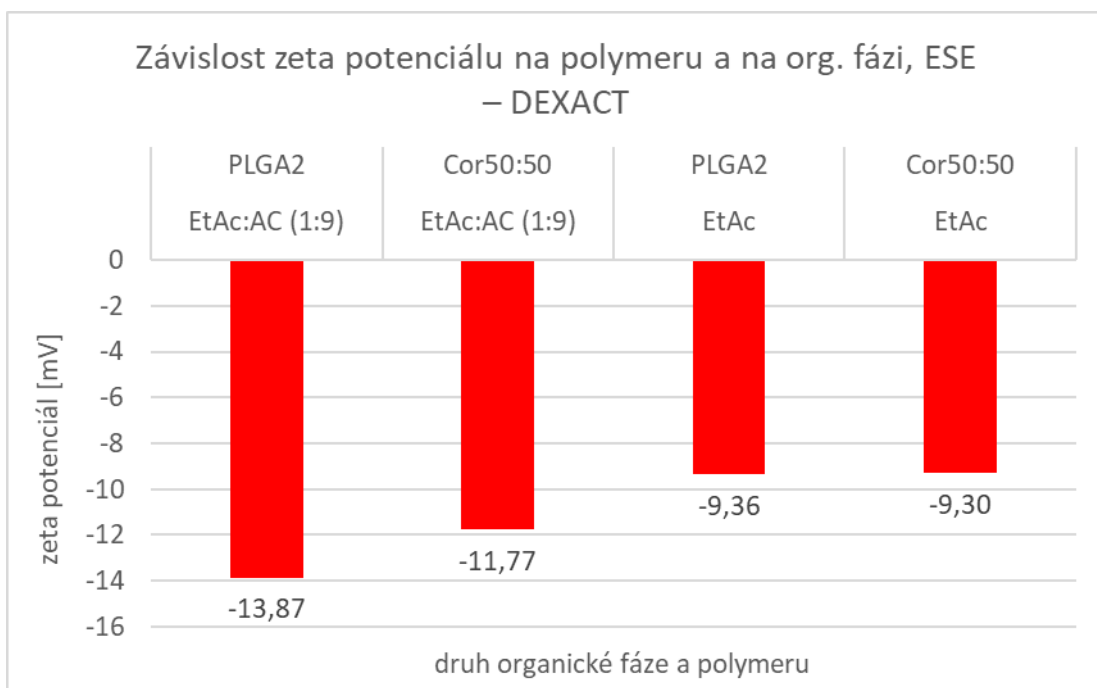
Prvním krokem bylo studium vlivu složení organické fáze na kritické parametry částic. V návaznosti na experimenty s dexametazonem (viz kapitulu 4.2) byly pro ESE metodu zvoleny org. fáze: EtAc:AC (1:9) a čistý EtAc. EtAc:AC (1:1) byl v závislosti na výsledcích předchozích experimentů vyřazen.

S použitím čistého EtAc došlo ke vzniku částic s velikostí výrazně pod 100 nm. (Viz graf 15). Malá velikost vede k výrazně nižší efektivitě separace nanočástic centrifugací. Vzhledem k použití přímé metody stanovení obsahu účinné látky je efektivita centrifugace zásadní. Tyto výsledky jsou potvrzením výsledků nanočástic s dexametazonem (srovnání s grafem 12), kdy bylo s čistým EtAc jako org. fází také dosaženo nízkých hodnot velikosti. V této práci nebyly částice pod 100 nm žádoucí, kvůli nízké interakci s potenciálními cílovými buňkami. Nicméně tato metoda by byla vhodnou alternativou, pokud by bylo cílem připravit částice např. pro EPR (Enhanced Permeability and Retention), tedy akumulaci částic v nádorové tkáni. [10]

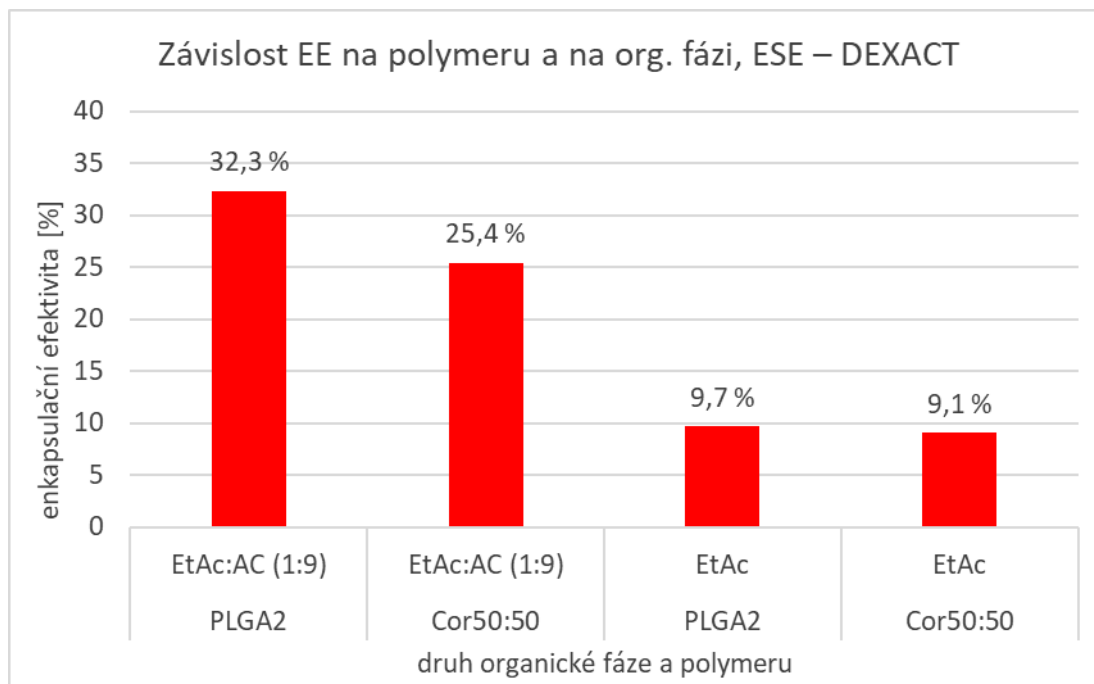
Nejen z hlediska velikosti je výhodnější EtAc:AC (1:9) jako org. fáze pro ESE metodu přípravy nanočástic. I z hlediska zeta potenciálu, který je nižší než při použití čistého EtAc (viz graf 16), tak z hlediska EE, která je vyšší než při použití čistého EtAc (viz graf 17). V prostředí EtAc:AC (1:9) vznikají nanočástice s vhodnými vlastnostmi pro cílenou distribuci do fagocytických buněk imunitního systému. Nejvyšší míry enkapsulace bylo dosaženo s použitím větveného polymer PLGA2 (32,3 %), což může být vysvětleno většími inter a intramolekulárními prostory ve struktuře tohoto polymeru, jak uvádí ve studii Šnejdřová a kol. (2020) [48] Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.6



Graf 15: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze EtAc:Ac(1:9)/Ethylacetát, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127



Graf 16: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze EtAc:Ac(1:9)/Ethylacetát, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127

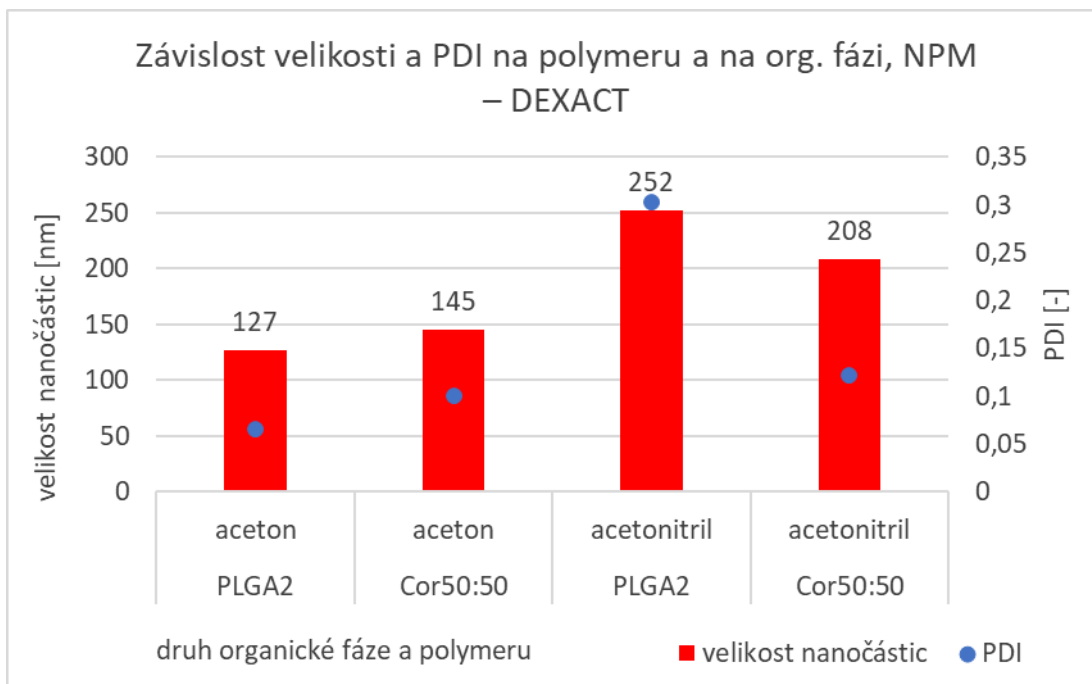


Graf 17: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze EtAc:Ac(1:9)/Ethylacetát, konc. dexametazonu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127

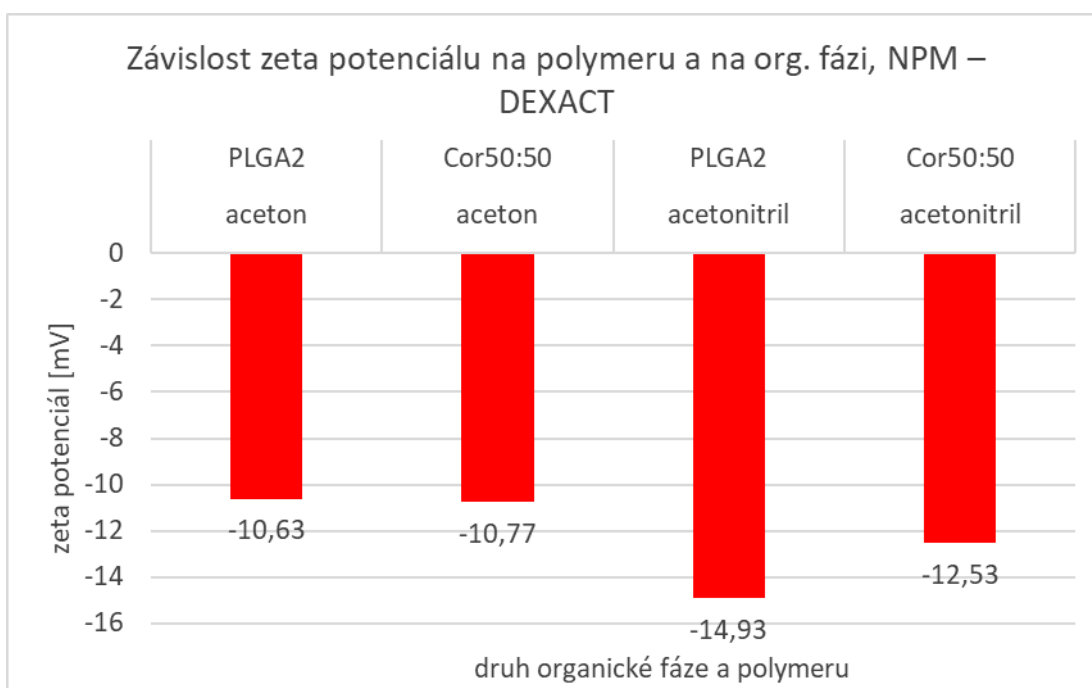
#### 4.3.2 NPM metoda, výběr org. fáze, porovnání dvou polymerů

S přihlédnutím k slibným výsledkům EE pro dexametazon acetát, byla testována i NPM jako alternativní metoda přípravy nanočástic. Při experimentu se vybírala vhodná org. fáze pro NPM: aceton (AC) vs. acetonitril (ACN), zároveň se porovnával vliv polymeru: PLGA2 vs. Cor50:50.

Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny v grafu 18, při použití ACN jako org. fáze pro NPM vznikly větší nanočástice (> 200 nm), i jejich PDI byla větší ve srovnání s částicemi precipitovanými z AC, především ve vzorku s PLGA2 polymerem (> 0,3). Velikost nanočástic kolem 120-140 nm s použitím AC jako org. fáze je ideální pro pasivní targeting do MPS buněk. Z grafu 19 a grafu 20 je patrné, že vzorky s ACN dosáhly nižšího zeta potenciálu a vyšší EE než vzorky s AC. (Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.7)

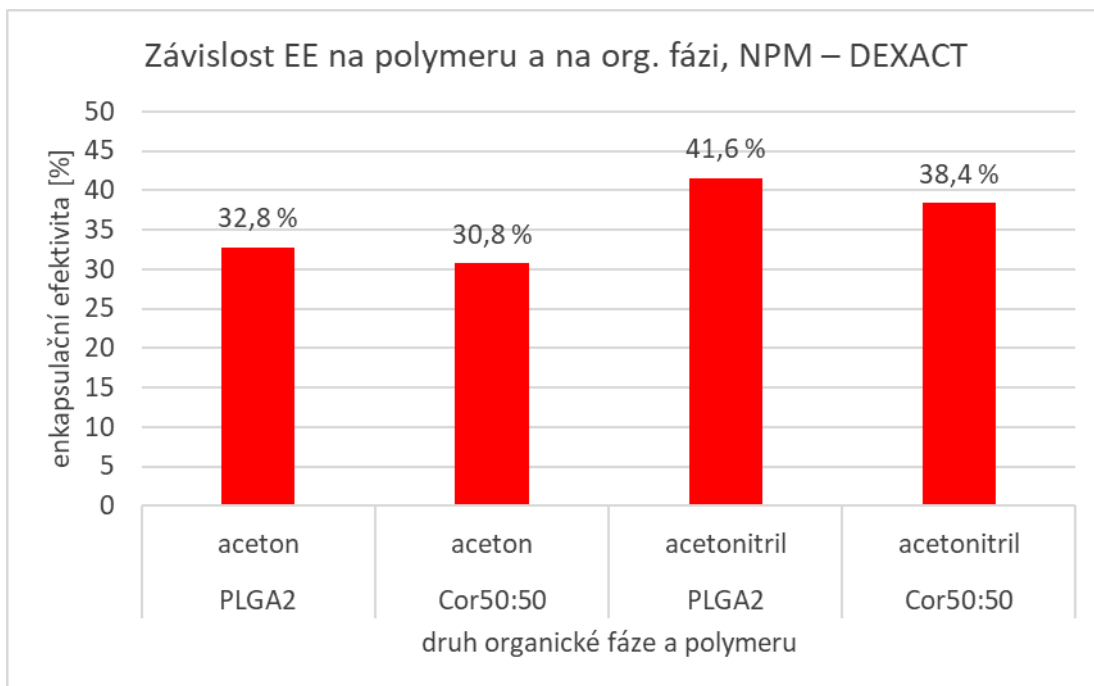


Graf 18: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze acetone/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127



Graf 19: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze acetone/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127





Graf 20 NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127

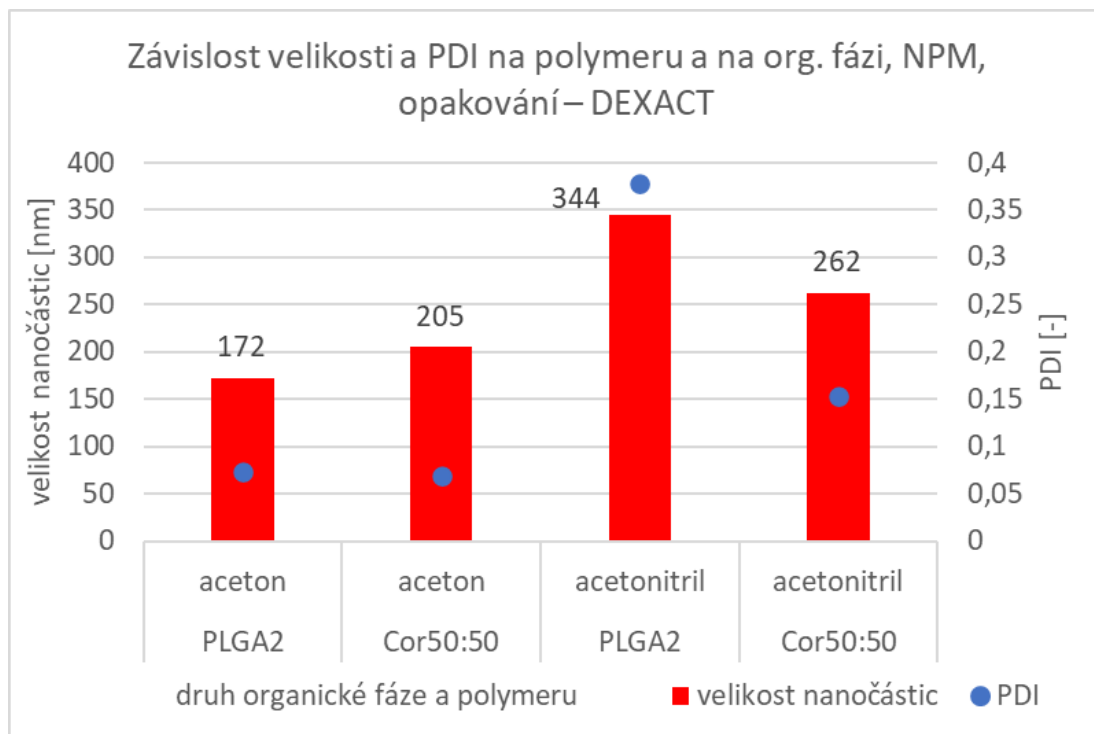
Z důvodu podezření, že během precipitace dochází ke vzniku krystalů dexametazon acetátu, které při stanovení EE pomocí HPLC vedou k falešně pozitivním výsledkům, byl experiment opakován. Vzorky byly připraveny znovu shodným způsobem, a navíc část každého vzorku byla přefiltrována přes filtr o velikosti pórů 1,2 µm. EE byla změřena u přefiltrovaných i nefiltrovaných vzorků, výsledky ukazuje graf 23.

Experimentálně bylo ověřeno, že filtrace nijak neovlivňuje výsledky granulometrické analýzy, kdy velikosti před i po filtraci byly prakticky totožné.

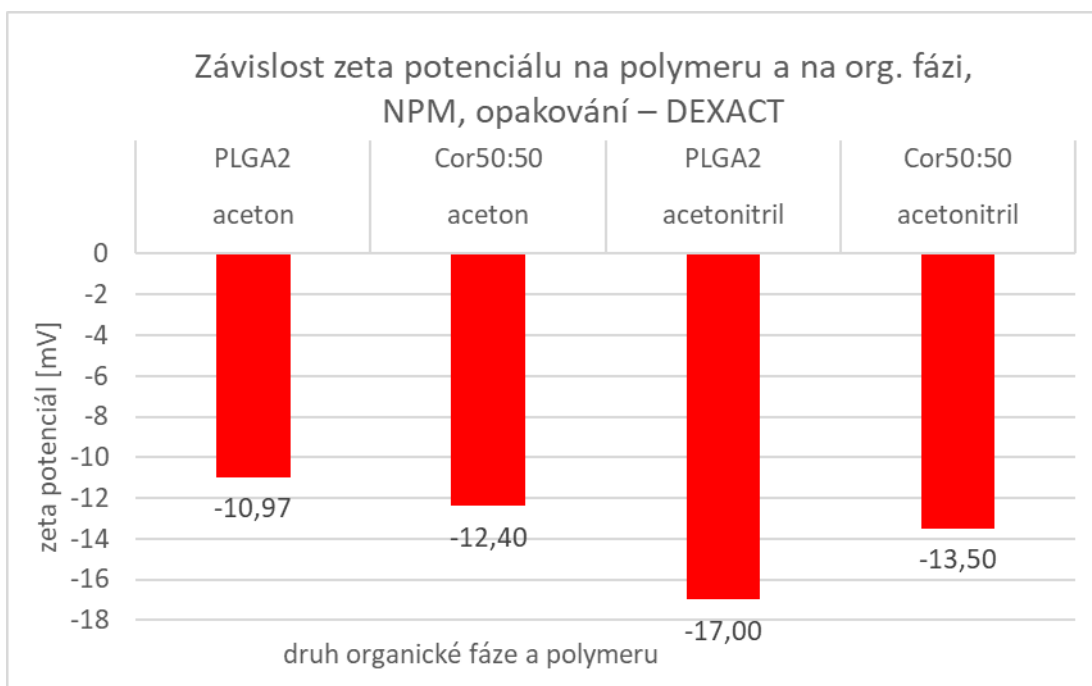
Srovnáním grafu 18 s grafem 21, které ukazují stejný experiment v opakování, je jasné, že při opakování (viz graf 21) byly nanočástice vytvořené za použití ACN opět výrazně větší, než při použití AC. I PDI vzorků vytvořených v ACN byla vysoká. Z grafu 22 je patrné, že i zeta potenciál měl v opakování podobný vývoj (srovnání s grafem 19).

Výsledky porovnání EE filtrovaných a nefiltrovaných vzorků jsou uvedeny v grafu 23. EE nefiltrovaných vzorků byla vyšší než po filtraci, a to u vzorků vytvořených v AC i v ACN. EE vzorků vytvořených v ACN se snížila po filtraci velmi výrazně, což ukazuje na přítomnost krystalů dexametazon acetátu ve vzorcích částic precipitovaných z ACN. Krystaly se podařilo potvrdit pomocí polarizační

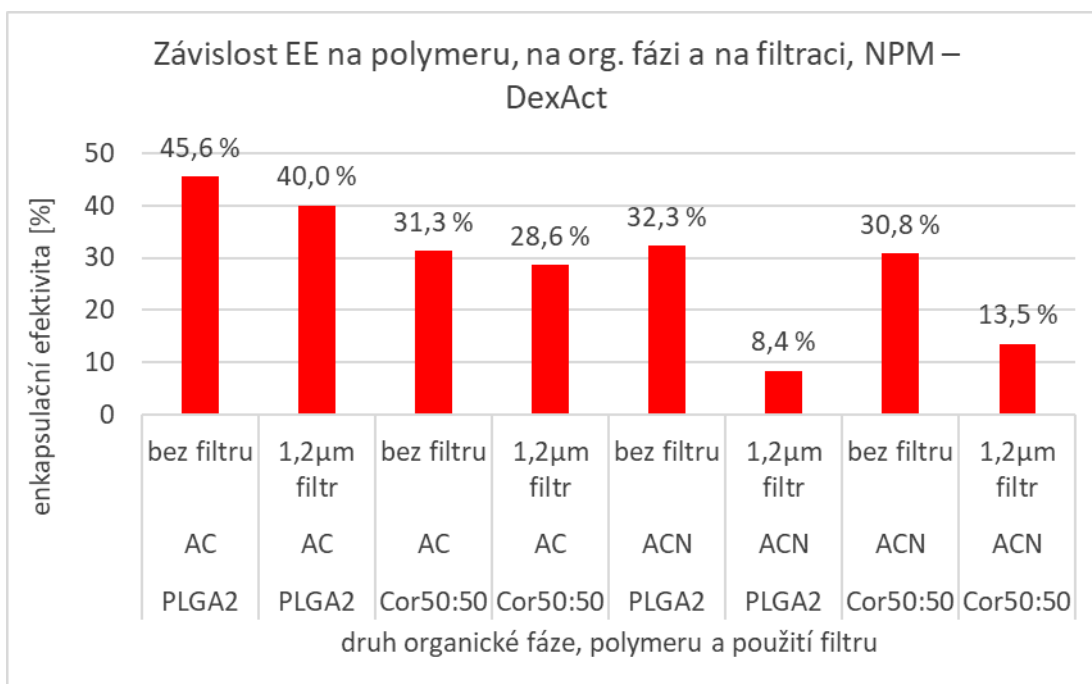
mikroskopie, ve vzorcích s ACN, a v menší míře i ve vzorcích částic připravených s AC. (Viz fotografie 3,4,7,8 v tabulce 5). V dalších experimentech se jako org. fáze NPM využíval AC, a nanosuspenze se filtrovaly přes 1,2 $\mu$ m filtr. Vyšších hodnot EE bylo opět dosaženo pro částice připravené s polymerem PLGA2, což lze opět vysvětlit jeho větvenou strukturou. [48] (Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.8.)



Graf 21: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazonu 400  $\mu$ g/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127



Graf 22: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127



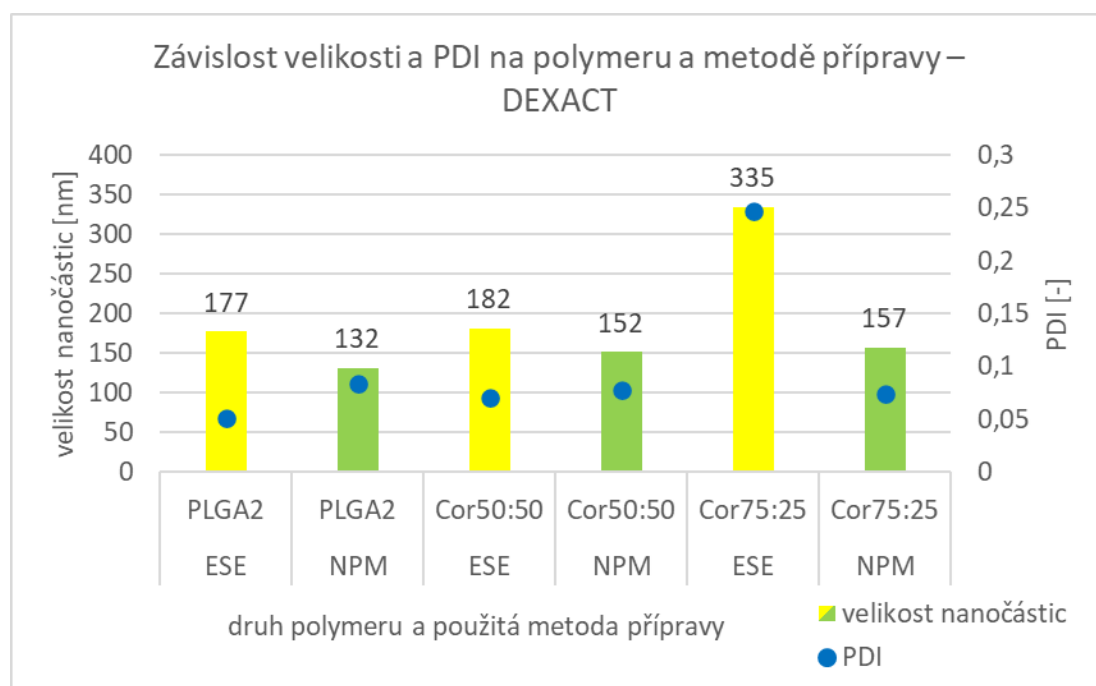
Graf 23: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, ne/přítomnost filtru 1,2 µm

### 4.3.3 Porovnání metod přípravy, vliv polymeru

V experimentu byly připraveny nanočástice s dexametazon acetátem pomocí obou metod ESE i NPM. V obou případech se využily org. fáze, které byly

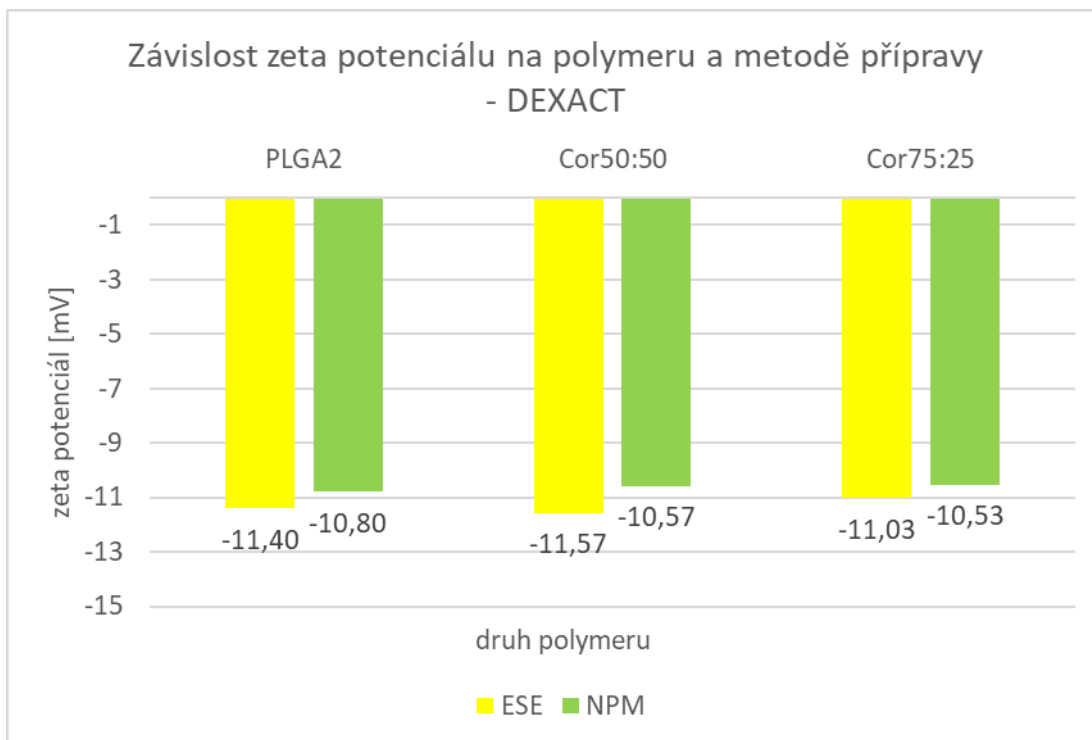
v předchozích experimentech vyhodnoceny jako nejvýhodnější – pro ESE EtAc:AC (1:9) (uvedeno v kapitole 4.3.1) a pro NPM čistý AC (uvedeno v kapitole 4.3.2.). Jako vodná fáze byl použit 0,5% roztok Pluronic® F-127, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml. V experimentu byl kromě již zavedených PLGA2 a Cor50:50 využit ještě jeden typ polymeru PLGA: Cor75:25, který je díky 75% zastoupení LA nejlipofilnějším z používaných polymerů. Grafy 24, 25, 26 porovnávají velikost, zeta potenciál a EE s využitím 2 metod přípravy a zároveň ukazují vliv polymerů s různou lipofilitou. Podle zjištění z předchozího experimentu (viz kapitolu 4.3.2) dochází během přípravy k tvorbě krystalů dexametazon acetátu, proto byly všechny vzorky filtrovány přes 1,2µm filtr.

Z grafu 24 je patrné, že při ESE metodě při použití polymeru Cor75:25 vznikly nanočástice výrazně větší (335 nm), i jejich PDI je výrazně větší, pravděpodobně došlo k aglomeraci částic. Ostatní vzorky jsou, bez ohledu na metodu přípravy, svojí PDI srovnatelné (0,05-0,08). Nanočástice vytvořené ESE metodou byly větší než jim odpovídající vzorky vytvořené NPM. Z hlediska velikost a PDI vzniklých nanočástic se jeví jako výhodnější použití NPM.



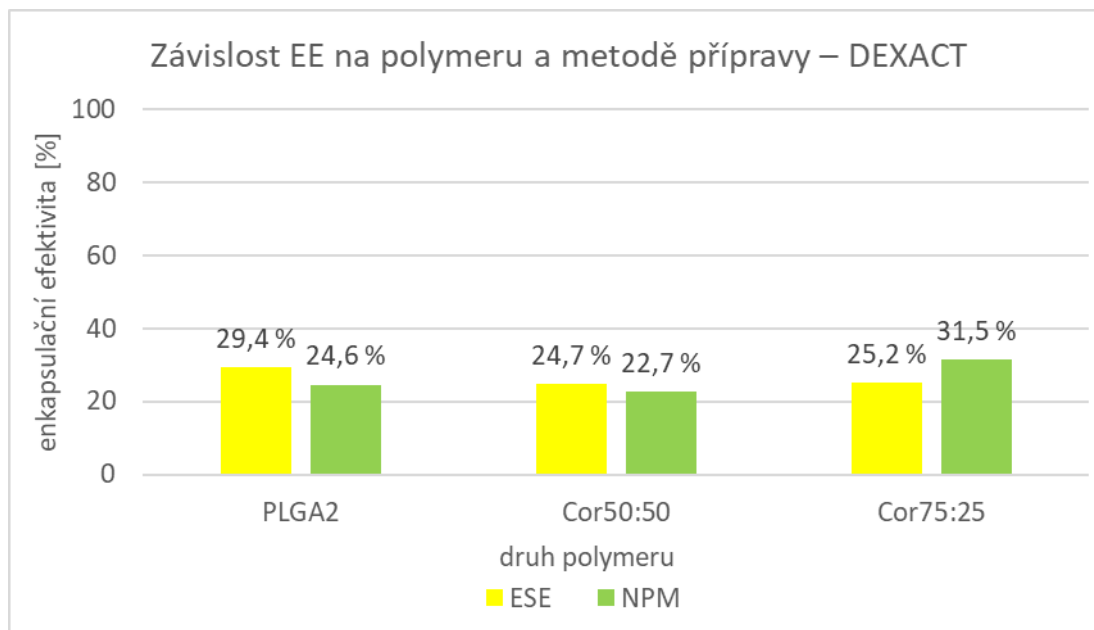
Graf 24: ESE/NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze ethylacetát:aceton(1:9)/aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm

Graf 25 ukazuje, že všechny vzorky bez ohledu na metodu i na použitý polymer dosáhly velmi srovnatelných výsledků velikosti zeta potenciálu.



Graf 25: ESE/NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze ethylacetát:aceton(1:9)/aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm

Při srovnání výsledků v grafu 26 je patrné, že nanočástice připravené s polymerem PLGA2 a PLGA75:25 dosáhly vyšších EE než při použití PLGA 50:50. Nejvyšší EE bylo dosaženo při použití NPM s Cor75:25 (31,5 %), což může ukazovat na souvislost nejlipofilnějšího z polymerů a lipofilního dexametazon acetátu. Druhé nejvyšší EE bylo dosaženo u PLGA2 nanočástic, připravených ESE metodou (29,4 %). Výsledky naznačují, že použitá metoda nehraje roli v enkapsulaci dexametazon acetátu. Výsledky se liší pouze v jednotkách procent, a proto můžeme usoudit, že použití ESE metody a NPM je, co se týká EE, rovnocenné. (Souhrnné tabulky hodnot jsou uvedeny v přílohách 9.9. a 9.10)



Graf 26: ESE/NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze ethylacetát:aceton(1:9)/aceton, konc. dexametazonu acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm

Vliv PLGA polymeru (poměr LA:GA, molekulární hmotnost PLGA) na inkorporaci dexametazonu do nanočástic byl zkoumán i ve studii Gómez-Gaete a kol. (2006) [25]. Využita byla ESE metoda přípravy, konstantní hmotnost polymeru (100 mg) a konstantní hmotnost dexametazonu (5 mg). A zkoušené byly polymery PLA, PLGA75:25, PLGA50:50. Velikost se vlivem polymeru nezměnila, všechny částice dosáhly středního průměru 220 nm. Enkapsulace dexametazonu do nanočástic se mírně lišila v závislosti na typu polymeru. Nejvyšší enkapsulace (142 µg/100 mg polymeru) byla získána za použití PLA. Nejvyšší inkorporace (170 µg/100 mg polymeru) bylo dosaženo za použití PLGA 75:25, ale rozdíl oproti PLGA 50:50 (162 µg/100 mg polymeru) nebyl významný. Studie shrnuje, že různá molekulová hmotnost polymeru zřejmě nemá vliv na množství enkapsulovaného léčiva. Tyto výsledky naznačují, že zapouzdření dexametazonu není výsledkem hydrofobních interakcí, protože PLA je více hydrofobní než PLGA 50:50, ale má větší sklon ke krystalinitě polymeru. [25]

V našem experimentu byl enkapsulován dexametazonu acetát, což je lipofilnější derivát, ovšem také bylo potvrzeno, že druh polymeru nemá jednoznačný vliv na velikost, stejně jako to uvádí studie Gómez-Gaete a kol. (2006) [25]. Studie uvádí, že druh polymeru zřejmě nemá vliv ani na množství enkapsulovaného léčiva, naše výsledky EE ovšem naznačují souvislost s hydrofobicitou a strukturou polymeru.

Z výše uvedeného se dá usoudit, že inkorporace dexametazonu a jeho acetátu do polymerních nanočástic je souhrou hydrofobních interakcí léčiva a polymeru a inter/intramolekulárních vakancí jako prostoru pro inkorporaci léčiva.

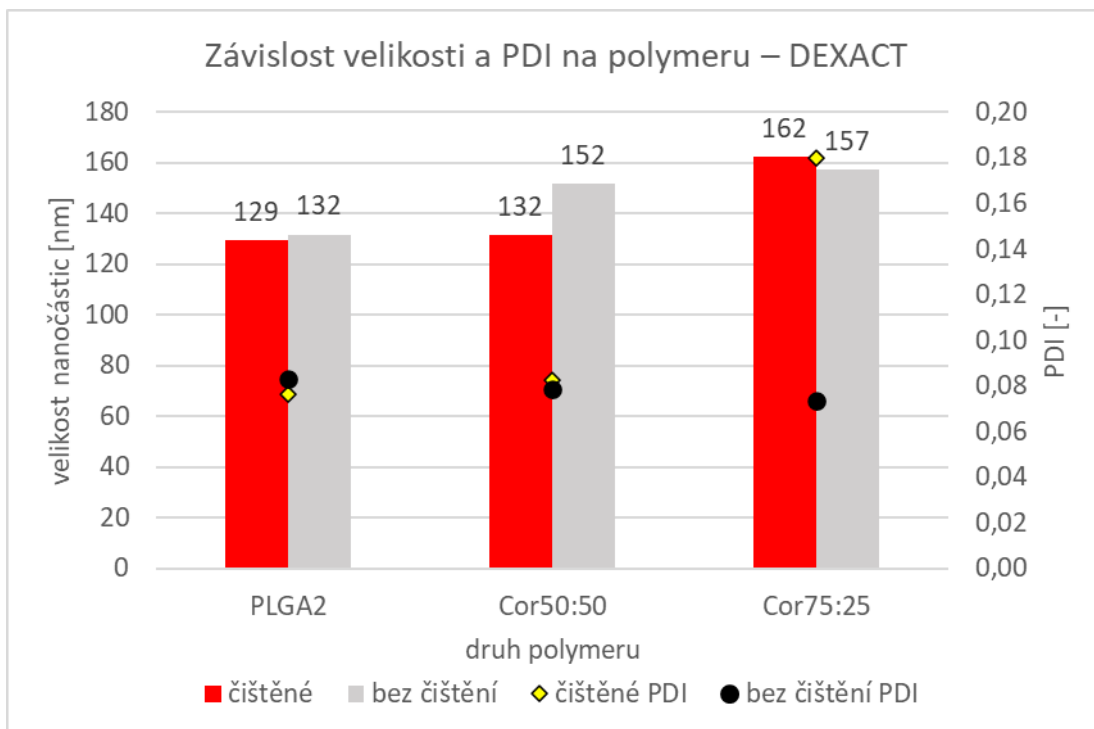
#### 4.3.4 Čištěné vzorky

Vzorky byly připraveny pomocí NPM a přečištěny, jak je popsáno v kapitole 3.3.9. Pro porovnání jsou uvedeny i výsledky nepřečištěných vzorků připravených stejným postupem. Čištění se provádělo z důvodu odfiltrování případných agregátů a případné bakteriální kontaminace. Dalším důvodem bylo, aby vzorky mohly být uloženy a použity k biologickému hodnocení na buněčných kulturách.

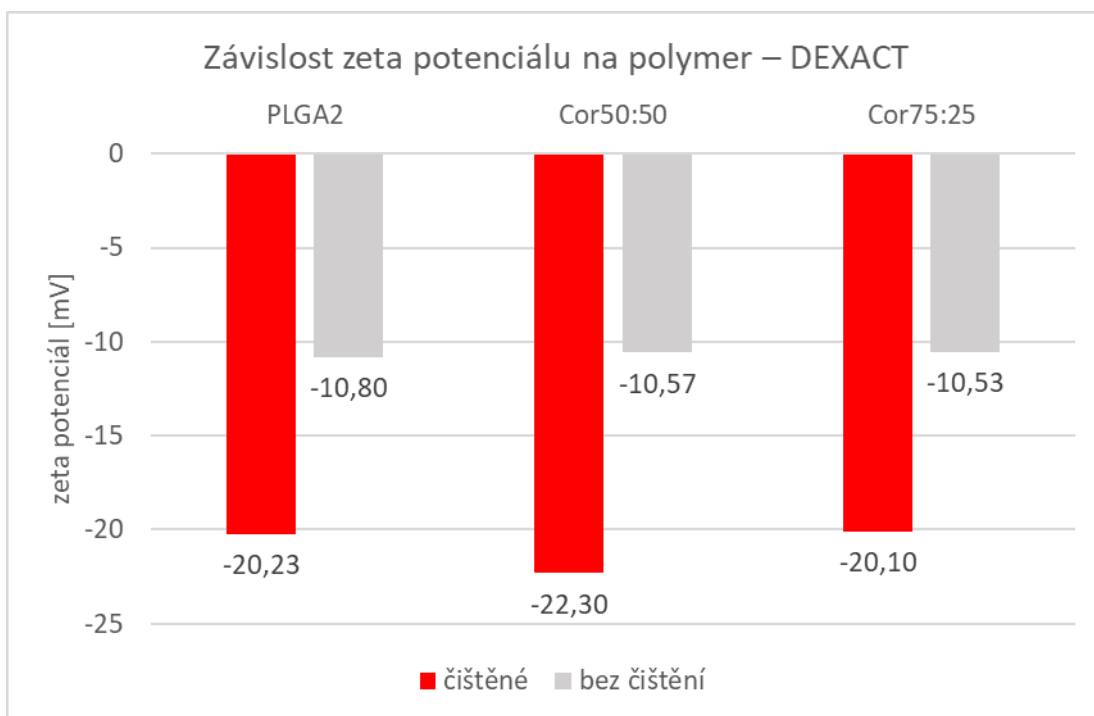
Podle grafu 27 proces čištění nemá vliv na velikost částic. Nejmenší nanočástice vznikly s polymerem PLGA2, jak u čištěných (129 nm), tak u nečištěných (132 nm), a největší s polymerem Cor75:25 (čištěné 162 nm, nečištěné 157 nm). Přečištěný vzorek s polymerem Cor75:25 má vyšší PDI oproti ostatním vzorkům, ovšem všechny vzorky mají PDI pod 0,2.

Zeta potenciál přečištěných vzorků byl dvojnásobný oproti nečištěným, viz graf 28. Což může být vysvětleno tím, že při průchodu přes membránu filtru byla na fázovém rozhraní filtru naadsorbována část molekul Pluronic® F-127 původně přítomných na povrchu částic, a tím došlo k omezení maskování povrchového náboje částic.

Graf 29 ukazuje, že EE přečištěných vzorků byla v porovnání vzorků připravovaných za stejných podmínek, ale bez čištění, výrazně nižší. Výrazný pokles výsledků EE také ukazuje na přítomnost částic o velikosti vyšší, než byla velikost pórů filtru, což se projevilo i zanášením filtrů během procesu purifikace. Například při použití polymeru Cor75:25, kde se v obou experimentech dosáhlo nejvyšší EE, měl přečištěný vzorek poloviční EE oproti nečištěnému vzorku (31,5 % vs. 15,9 %) Souhrnná tabulka hodnot je uvedena v příloze 9.11.

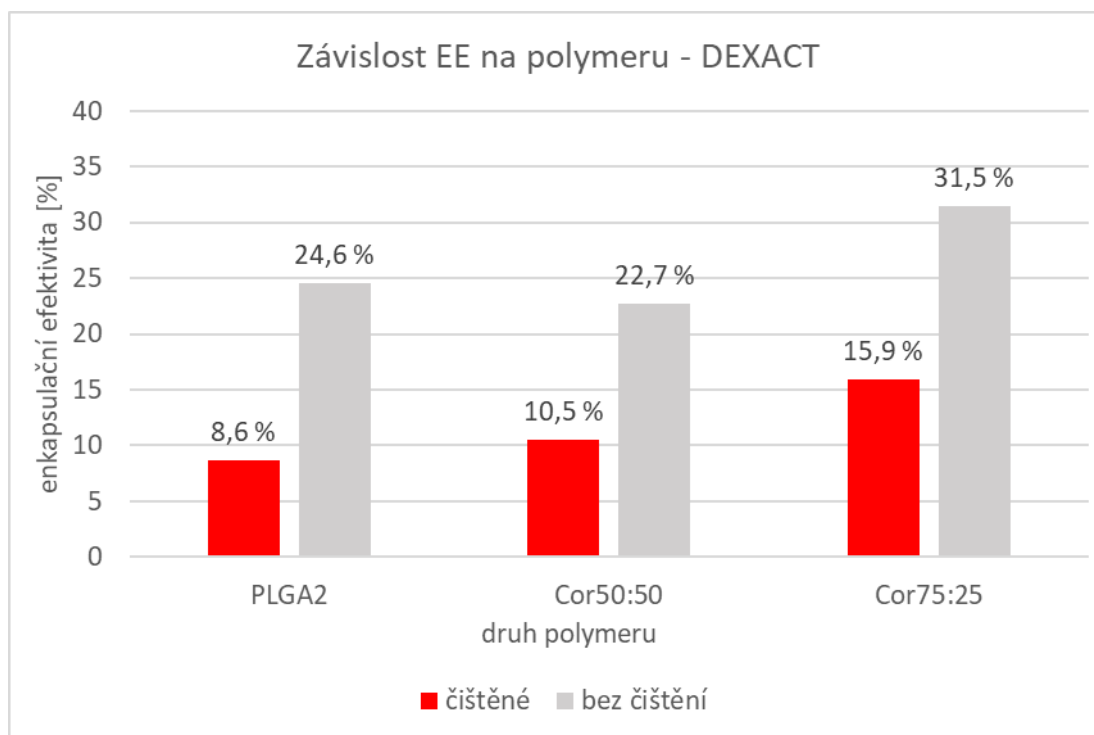


Graf 27: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm, ne/čištěné vzorky



Graf 28: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm, ne/čištěné vzorky





Graf 29: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm, ne/čištěné vzorky

Ve studii Tsukada a kol. (2008) [49] byly zkoumány postupy sterilizace, protože pro klinické zkoušky je nutné PLGA nanočástice upravit jako sterilní farmaceutické produkty. Tepelná sterilizace není vhodná. Vlivem tepla se může rozkládat léčivo i PLGA. PLGA má nízkou teplotu skelného přechodu (asi 45 °C). Vlivem tepla by se tedy mohly změnit vlastnosti formulace, jako je rychlost uvolňování léčiva z formulace. Lze uvažovat o jiných sterilizačních metodách včetně elektronového ozařování nebo tlakové filtrace pomocí membránového filtru s velikostí pórů 0,2 µm. Ve studii byla použita emulzně difúzní metoda přípravy. Prokázalo se, že při vhodné úpravě podmínek přípravy, lze připravit PLGA nanočástice, které projdou membránovým filtrem používaným k bakteriální filtraci (velikost pórů 0,2 µm). A i přesto, že při pozorování pomocí transmisní elektronové mikroskopie vykazovaly jistý stupeň aglomerace, byla jejich filtrační frakce 98-100 %. (Filtrační frakce PLGA nanočástic byla vypočtena porovnáním koncentrací PLGA v suspenzi před a po filtraci 0,2µm filtrem.) [49]

Předmětem dalších experimentů navazujících na tuto práci bude zlepšení procesu čištění a převodu vzorků na mikrobiálně nezávadné formulace. Studie

Tsukada a kol. (2008) [49] dokazuje, že je možné dosáhnout efektivně přečištěných formulací.

#### 4.4 Výsledky mikroskopie – dexametazon acetát

Mikroskopování byly nejdříve podrobeny vzorky připravené NPM, za použití AC a ACN jako org. fáze, 0,5% roztoku Pluronic® F-127 jako vodné fáze, dvou polymerů: PLGA2, Cor50:50 a koncentraci dexametazon acetátu 400 µg/ml.

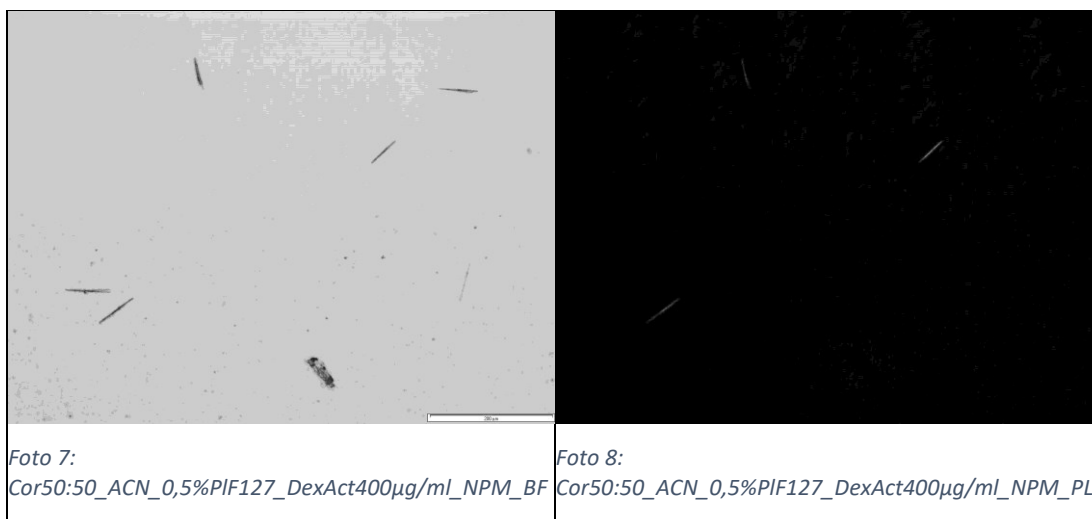
Přítomnost krystalů se potvrdila, a proto byly všechny další vzorky ihned po odpaření organického rozpouštědla filtrovány pomocí 1,2µm filtru. Vybrané fotografie pořízené z mikroskopování jsou uvedeny v tabulce 5. Seznam vzorků s popisem je uveden v následující tabulce 4.

Tabulka 4: Výsledky mikroskopování, NPM, porovnání org. fáze: AC a ACN

Název vzorku, komentář	Odkaz
Kontrolní vzorek: <b>NPM, bez polymeru, org. fáze AC, konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Krystaly přítomné, velmi výrazné, mají tvar jehlice.	Foto 1 Foto 2
<b>NPM, polymer PLGA2, org. fáze AC, konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Krystaly přítomné, nalezen jeden větší krystal.	Foto 3 Foto 4
<b>NPM, polymer Cor50:50, org. fáze AC, konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Krystaly přítomné, více menších krystalů, tvar jehlic.	
Kontrolní vzorek: <b>NPM, bez polymeru, org. fáze ACN, konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Krystaly přítomné, jasně viditelné, ale menší a užší než v acetonu	Foto 5 Foto 6
<b>NPM, polymer PLGA2, org. fáze ACN, konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Přítomné drobné krystaly	
<b>NPM, polymer Cor50:50, org. fáze ACN, konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Krystaly přítomné	Foto 7 Foto 8

Tabulka 5: Fotografie z mikroskopování, NPM, porovnání org. fáze: AC a ACN





Při dalším mikroskopování byly porovnávány vzorky připravené ESE metodou a NPM. Výsledkem je, že při ESE metodě se krystaly dexametazonu acetátu nevytvářejí. Vybrané fotografie pořízené z mikroskopování jsou uvedeny v tabulce 7. Seznam vzorků a popisy výsledků jsou v následující tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledky mikroskopování, porovnání ESE a NPM

Název vzorku, komentář	Odkaz
<p>Kontrolní vzorek: <b>ESE, bez polymeru, org. fáze EtAc:AC (1:9), konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b></p> <p>Nenalezeny žádné krystaly, což bylo u kontrolního vzorku překvapující. Kontrolní vzorek byl vytvořen bez polymeru, aby došlo ke vzniku krystalu a mohl být ověřen jejich habitus. Pro ověření byl pokus zopakován a opět nebyly krystaly přítomné. Možné vysvětlení je, že ultrasonikace dodá soustavě tolik energie, že dexametazonu acetát přejde do jiné, rozpustnější, krystalové modifikace a 0,5% roztok Pluronic® F127 jako surfaktant podpoří rozpuštění krystalů dexametazonu acetátu. Polymorfii dexametazonu acetátu potvrzuje studie Pedro da Silva a kol. (2018) [50].</p>	<p>Foto 9 Foto 10</p>
<p>Kontrolní vzorek: <b>NPM, bez polymeru, org. fáze AC, konc. DexAct 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127</b></p>	

<p>Na kontrolním vzorku byly vidět jehlicovité krystaly, stejné jako na foto 1 a foto 2. Na další sklíčko se připravil stejný vzorek přefiltrovaný přes filtr 1,2 <math>\mu\text{m}</math> a v něm už žádné krystaly nebyly viditelné. To znamená, že filtr krystaly spolehlivě odfiltruje.</p>	
<p><b>ESE, polymer PLGA2, org. fáze EtAc:AC (1:9), konc. DexAct 400 <math>\mu\text{g/ml}</math>, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Nenalezeny žádné krystaly.</p>	
<p><b>ESE, polymer Cor50:50, org. fáze EtAc:AC (1:9), konc. DexAct 400 <math>\mu\text{g/ml}</math>, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Nenalezeny žádné krystaly.</p>	
<p><b>NPM, polymer PLGA2, org. fáze AC, konc. DexAct 400 <math>\mu\text{g/ml}</math>, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Nenalezeny krystaly typu jehlice, ale spíše shluky, které v polarizačním světle svítily.</p>	<p>Foto 11 Foto 12</p>
<p><b>NPM, polymer Cor50:50, org. fáze AC, konc. DexAct 400 <math>\mu\text{g/ml}</math>, vodná fáze 0,5% PIF-127</b> Nenalezeny žádné krystaly.</p>	

Tabulka 7: Fotografie z mikroskopování, porovnání ESE a NPM



Tvorbu krystalů při použití ESE metody přípravy nanočástic s dexametazonem popisuje studie Gómez-Gaete a kol. (2006) [25]. Ačkoli koncentrace DEX byla nízká (10 mg dexametazonu v 5 ml org. fáze (složení různá), 100 mg PLGA 75:25), pozorování pomocí optické mikroskopie mezi křížovými polarizátory odhalila přítomnost krystalů dexametazonu, jejichž velikost se pohybuje mezi 1 a 10 µm. To znamená, že část účinné látky není inkorporována. Studie tvorbu krystalů vysvětluje tím, že organická rozpouštědla difundují do spojitě fáze v důsledku jejich mísitelnosti s vodou, dočasně se zvýší rozpustnost léčiva v kontinuální fázi. Po úplném odpaření organického rozpouštědla se však rozpustnost snižuje a část volného léčiva může krystalizovat ve vodné fázi. Ve studii byly krystaly dexametazonu pozorovány ve všech suspenzích. Množství krystalů se zdálo nižší při použití org. fáze

AC:DCM (1:1). Krystaly lze odstranit pomocí filtrů, ze suspenze byly eliminovány následnou filtrací pomocí polyvinylidenfluoridových filtrů (3,0; 1,5 a 0,45  $\mu\text{m}$  postupně). Na množství krystalů a množství enkapsulovaného dexametazonu má rozhodující vliv použité organické rozpouštědlo. [25]

Studie Gómez-Gaete a kol. (2006) [25] prokázala přítomnost krystalů při použití ESE metody, což se v našem experimentu nepotvrdilo. Ve studii byl využíván dexametazon a v našem experimentu lipofilnější derivát dexametazonu acetát s jinými krystalizačními vlastnostmi.

## 5 ZÁVĚR

Byly připraveny PLGA nanočástice s enkapsulovanými protizánětlivě působícími látkami (kurkumin, dexametazon, dexametazon acetát). Nanočástice byly charakterizovány pomocí optických metod. Posuzovanými parametry byla velikost částic, index polydisperzity, zeta potenciál a enkapsulační efektivita. Cílem bylo připravit nanočástice s optimálními vlastnostmi pro pasivní cílení do buněk MPS. Optimální vlastnosti nanočástic jsou sférický tvar, polydisperzita  $\leq 0,2$ , velikost v rozmezí 100-300 nm, záporný povrchový náboj a hydrofobní charakter částic. Pro získání nanočástic s optimálními vlastnostmi byly optimalizovány podmínky přípravy pomocí ESE a NPM.

Při přípravě nanočástic s kurkuminem pomocí NPM byl jako nejvhodnější surfaktant zvolen roztok poloxameru Pluronic<sup>®</sup> F-127, který byl využíván v dalších experimentech u obou metod přípravy. Nanočástic s kurkuminem byly vytvořeny ESE a NPM, pomocí ESE vznikly nanočástice až dvojnásobně větší oproti NPM. Druh polymeru zřejmě nemá vliv na velikost nanočástic. Kurkumin dosáhl nejvyšší enkapsulační efektivity (69,1 %) s použitím polymeru Cor75:25, který je nejlipofilnější z použitých polymerů. Je zde tedy patrná spojitost mezi silně lipofilním kurkuminem a lipofilitou polymeru.

Vzorky s dexametazonem se připravovaly pomocí ESE. Z výsledků vyplývá, že vstupní koncentrace dexametazonu neovlivňuje enkapsulační efektivitu, ani zeta potenciál, ale ovlivňuje velikost, kdy se zvyšující se vstupní koncentrací se zvyšuje velikost nanočástic, spolu s ní se zvyšovala i polydisperzita. Nejvyšší enkapsulační efektivita (10,3 %) u nanočástic s dexametazonem bylo dosaženo při použití ethylacetátu:acetonu (1:9) jako organické fáze a 1% roztoku PVA jako vodné fáze. PVA se však projevil jako nevhodný surfaktant, protože maskuje záporný povrchový náboj. V dalších experimentech byl využíván 0,5% roztok Pluronic<sup>®</sup> F-127 a jako organická fáze pro ESE metodu směs ethylacetát:acetonu (1:9). Enkapsulační efektivita dexametazonu nebyla uspokojivá, proto bylo přistoupeno k použití jeho lipofilnějšího derivátu dexametazonu acetátu.

Při přípravě nanočástic s dexametazon acetátem byl jako nejvhodnější organická fáze pro NPM zvolen aceton, který se používal i v dalších experimentech. Při srovnání výsledků nanočástic připravených ESE a NPM je patrné, že metoda přípravy ani druh



polymeru nemá vliv na velikost nanočástic, ani na velikost zeta potenciálu. Nejvyšší enkapsulační efektivita (31,5 %) bylo dosaženo pomocí NPM u lipofilního polymeru Cor75:25. Nanočástice s dexametazon acetátem dosáhly až trojnásobné enkapsulační efektivita oproti dexametazonu. Polarizační mikroskopie prokázala přítomnost krystalů dexametazon acetátu vznikajících při přípravě pomocí NPM. Všechny vzorky s dexametazon acetátem musely být filtrovány přes 1,2 $\mu$ m filtr, který krystaly spolehlivě odstraní.

Vzorky s dexametazon acetátem byly přečištěny a pomocí filtrace (0,45  $\mu$ m) převedeny na mikrobiálně nezávadné vzorky, aby mohly být použity pro biologické hodnocení (není předmětem této práce). Během čištění se nezměnila velikost částic, poklesl zeta potenciál, a významně kleslo množství enkapsulovaného léčiva. Proces čištění bude předmětem dalšího zkoumání.

Souhrnně lze říci, že nejzásadnější vliv na vlastnosti PLGA nanočástic má typ polymeru, enkapsulované léčivo a jejich vzájemná interakce. Preferovanou metodou přípravy je NPM pro její jednoduchost.

## 6 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

### Obrázky:

Obrázek 1: Schématický nákres emulzní odpařovací metody .....	20
Obrázek 2: Schématický nákres nanoprecipitační metody .....	21
Obrázek 3: Kurkumin, molekulová hmotnost: 368,4; logP: 3,2 .....	21
Obrázek 4 Dexametazon, molekulová hmotnost 392,46; logP 1,9 .....	25
Obrázek 5: Dexametazon acetát, molekulová hmotnost 434,5; logP 2,8 .....	27
Obrázek 6: Poly(D,L-mléčná-ko-glykolová kyselina) (PLGA) .....	29
Obrázek 7: Schéma odbourávání PLGA .....	29

### Tabulky:

Tabulka 1: Kalibrační řada – kurkumin .....	35
Tabulka 2: Ředění roztoků kalibrační řady – dexametazon a dexametazon acetát ...	37
Tabulka 3: Vzorčky připravené NPM pro purifikaci .....	40
Tabulka 4: Výsledky mikroskopování, NPM, porovnání org. fáze: AC a ACN .....	66
Tabulka 5: Fotografie z mikroskopování, NPM, porovnání org. fáze: AC a ACN ...	67
Tabulka 6: Výsledky mikroskopování, porovnání ESE a NPM .....	68
Tabulka 7: Fotografie z mikroskopování, porovnání ESE a NPM .....	70

### Grafy:

Graf 1: Kalibrační přímka – kurkumin v acetonu při 420 nm .....	35
Graf 2: Kalibrační řada (logaritmické měřítko osy x) – dexametazon acetát .....	38
Graf 3: NPM, polymer PLGA2, org. fáze aceton, konc. kurkuminu 300 µg/ml, různé druhy a koncentrace vodné fáze .....	43
Graf 4: NPM, polymer PLGA2, org. fáze aceton, konc. kurkuminu 300 µg/ml, různé druhy a koncentrace vodné fáze .....	43
Graf 5: NPM/ESE, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton/EtAc:Ac(1:9), konc. kurkuminu 300 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127 .....	45
Graf 6: NPM/ESE, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton/EtAc:Ac(1:9), konc. kurkuminu 300 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127 .....	45
Graf 7: NPM/ESE, polymer Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton/EtAc:Ac(1:9), konc. kurkuminu 300 µg/ml, vodná fáze 0,5% PIF-127, ne/přítomnost filtru 1,2 µm .....	46
Graf 8: ESE, polymer PLGA2, org. fáze DCM:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 150/400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	47
Graf 9: ESE, polymer PLGA2, org. fáze EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 50/100/150/300/400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	48

Graf 10: ESE, polymer PLGA2, org. fáze EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 50/100/150/300/400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	49
Graf 11: ESE, polymer PLGA2, org. fáze EtAc:Ac(1:9), konc. dexametazonu 50/100/150/300/400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	49
Graf 12: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze: EtAc:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:1)/Ethylacetát, konc. dexametazonu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127/1% PVA.....	51
Graf 13: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze: EtAc:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:1)/Ethylacetát, konc. dexametazonu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127/1% PVA.....	52
Graf 14: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze: EtAc:Ac(1:9)/EtAc:Ac(1:1)/Ethylacetát, konc. dexametazonu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127/1% PVA.....	52
Graf 15: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze EtAc:Ac(1:9)/Ethylacetát, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	54
Graf 16: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze EtAc:Ac(1:9)/Ethylacetát, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	54
Graf 17: ESE, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze EtAc:Ac(1:9)/Ethylacetát, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	55
Graf 18: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	56
Graf 19: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	56
Graf 20 NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	57
Graf 21: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	58
Graf 22: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127 .....	59
Graf 23: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50, org. fáze aceton/acetonitril, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, ne/přítomnost filtru 1,2 µm.....	59
Graf 24: ESE/NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze ethylacetát:aceton(1:9)/aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm.....	60
Graf 25: ESE/NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze ethylacetát:aceton(1:9)/aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm.....	61

Graf 26: ESE/NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze ethylacetát:aceton(1:9)/aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm.....	62
Graf 27: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm, ne/čištěné vzorky .....	64
Graf 28: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm, ne/čištěné vzorky .....	64
Graf 29: NPM, polymer PLGA2/Cor50:50/Cor75:25, org. fáze aceton, konc. dexametazon acetátu 400 µg/ml, vodná fáze 0,5% Pluronic® F-127, filtr 1,2 µm, ne/čištěné vzorky .....	65

## 7 SEZNAM ZKRATEK

AC	Aceton
ACN	Acetonitril
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
AST, ALT	Aspartátaminotransferáza, alaninaminotransferáza
BF	Bright field
Cor50:50	Lineární kopolymer PLGA5/5, (kyselina mléčná:kyselina glykolová (50:50))
Cor75:25	Lineární kopolymer PLGA7/3, (kyselina mléčná:kyselina glykolová (75:25))
CPN	PLGA nanočástic s kurkuminem
CPTN	PLGA nanočástic s kurkuminem s TPGS
CUR	kurkumin
DCM	Dichlormethan
DEX	Dexametazon
DEX NC	Dexametazonové nanokapsle
DexAct	Dexametazon acetát
DexAct NLC	Nanostrukturované lipidové nosiče s dexametazon acetátem
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
EE	Enkapsulační efektivita
ESE	Emulzní odpařovací metoda
EtAc	Ethylacetát
FDA	Food and Drug Administration
GA	Glykolová kyselina
GSI	Inhibitory $\gamma$ -sekretázy
HES-DEX-NC	Hydroxyethylškrobové nanokapsle s dexametazonem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS15	Kolliphor HS15
IL	Interleukin
iNOS	Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
LA	Mléčná kyselina
LPS	Lipopolysacharidy

M1	Klasicky aktivované makrofágy
M2	Alternativně aktivované makrofágy
MCP1	Makrofágový chemotaktický protein 1
MPS	Mononukleární fagocytický systém
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Nealkoholická steatohepatitida
NLC	Nanostrukturované lipidové nosiče
NPM	Nanoprecipitační metoda
Org.	Organický/á
PACE	Poly(amin)-ko-esterové polymery
PDI	Index polydisperzity
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Polyglykolová kyselina
PL	Polarization light
PLA	Polymléčná kyselina
PIF-127	Pluronic® F-127
PLGA	Kopolymer poly(mléčná-ko-glykolová) kyseliny
PLGA2	Kopolymer PLGA A2 větvený na 2% kyselině polyakrylové – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (1:1))
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PVA	Polyvinylalkohol
RES	Retikuloendoteliální systém
RH40	Kolliphor HR40
RSG	Rosiglitazon
SiRNA	Small interfering RNA
SP60	Span 60
SYK	Slezinné tyrosinkinázy
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TPGS	D-a-Tokopheryl polyethylenglykol 1000 sukcinát
TW20	Tween 20

## 8 SEZNAM LITERATURY

- 1 BRŮHA, Radan a Karel DVOŘÁK. Nealkoholická steatóza a steatohepatitida. *Interní medicína pro praxi*. [online] 2007, **9**(5), 210-212. [cit. 2021-11-19]
- 2 JACKULIAKOVÁ, Dagmar, Helena VAVERKOVÁ a Vlastimil ŠČUDLA. Nealkoholická steatóza jaterní: Má smysl se jí zabývat?. *Medicína pro praxi*. [online] 2009, **6**(4), 187-190. [cit. 2021-11-19]
- 3 EGUCHI, Akiko, Toru YOSHITOMI, Milos LAZIC, et al. Redox nanoparticles as a novel treatment approach for inflammation and fibrosis associated with nonalcoholic steatohepatitis. *Nanomedicine*. [online] 2015, **10**(17), 2697-2708. ISSN 1743-5889. [cit. 2021-11-13] Dostupné z: doi:10.2217/nmm.15.87
- 4 NEUSCHWANDER-TETRI, Brent A. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Medicine*. [online] 2017, **15**(1). ISSN 1741-7015. [cit. 2021-11-19] Dostupné z: doi:10.1186/s12916-017-0806-8
- 5 GERGES, Samar H., Sara A. WAHDAN, Doaa A. ELSHERBINY a Ebtehal EL-DEMERDASH. Non-alcoholic fatty liver disease: An overview of risk factors, pathophysiological mechanisms, diagnostic procedures, and therapeutic interventions. *Life Sciences*. [online] 2021, **271**. ISSN 00243205. [cit. 2022-01-29] Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2021.119220
- 6 KURNIAWAN, Dhadhang Wahyu, Arun Kumar JAJORIYA, Garima DHAWAN, et al. Therapeutic inhibition of spleen tyrosine kinase in inflammatory macrophages using PLGA nanoparticles for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Controlled Release*. [online] 2018, **288**, 227-238. ISSN 01683659. [cit. 2022-01-29] Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2018.09.004
- 7 COLINO, Clara I., José M. LANA O a Carmen GUTIERREZ-MILLAN. Targeting of Hepatic Macrophages by Therapeutic Nanoparticles. *Frontiers in Immunology*. [online] 2020, **11**. ISSN 1664-3224. [cit. 2022-01-30] Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.00218

- 8 KOYAMA, Yukinori a David A. BRENNER. Liver inflammation and fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. [online] 2017, **127**(1), 55-64. ISSN 0021-9738. [cit. 2022-04-17] Dostupné z: doi:10.1172/JCI88881
- 9 FICHTER, Michael, Grit BAIER, Marvin DEDTERS, Leah PRETSCH, Anette PIETRZAK-NGUYEN, Katharina LANDFESTER a Stephan GEHRING. Nanocapsules generated out of a polymeric dexamethasone shell suppress the inflammatory response of liver macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. [online] 2013, **9**(8), 1223-1234. ISSN 15499634. [cit. 2022-01-24] Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2013.05.005
- 10 TAMMAM, Salma N., Hassan M. E. AZZAZY a Alf LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. [online] 2015, **11**(4), 555-577. ISSN 15507033. [cit. 2022-03-10] Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017
- 11 YUNNA, Chen, Hu MENGROU, Wang LEI a Chen WEIDONG. Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*. [online] 2020, **877**. ISSN 00142999. [cit. 2022-01-29] Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090
- 12 RAMBALDI, A., H. H. SACONATO, E. CHRISTENSEN, K. THORLUND, J. WETTERSLEV a C. GLUUD. *Systematic review: glucocorticosteroids for alcoholic hepatitis - a Cochrane Hepato-Biliary Group systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomized clinical trials*. [online] 2008, **27**(12), 1167-1178. ISSN 02692813. [cit. 2022-05-03] Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03685.x
- 13 FORREST, Ewan, Jane MELLOR, Louise STANTON, et al. Steroids or pentoxifylline for alcoholic hepatitis (STOPAH): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. [online] 2013, **14**(1), 1167-1178. ISSN 1745-6215. [cit. 2022-05-03] Dostupné z: doi:10.1186/1745-6215-14-262



- 14 BRŮHA, Radan, Karel DVOŘÁK, Jaromír PETRTÝL a Tomislav ŠVESTKA. Alkoholové poškození jater. *Medicína pro praxi*. [online] 2009, **6**(3), 144-146. [cit. 2022-05-03]
- 15 SUMIDA, Yoshio a Masashi YONEDA. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *Journal of gastroenterology*. [online] 2018, **53**(3), 362-376. [cit. 2022-03-31] Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s00535-017-1415-1>
- 16 PÉREZ-HERRERO, Edgar a Alberto FERNÁNDEZ-MEDARDE. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. [online] 2015, **93**, 52-79. ISSN 09396411. [cit. 2022-01-29] Dostupné z: doi:[10.1016/j.ejpb.2015.03.018](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018)
- 17 ZCZEPANOWICZ, Krzysztof, Monika BZOWSKA, Tomasz KRUK, Alicja KARABASZ, Joanna BERETA a Piotr WARSZYNSKI. Pegylated polyelectrolyte nanoparticles containing paclitaxel as a promising candidate for drug carriers for passive targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. [online] 2016, **143**, 463-471. ISSN 09277765. [2022-01-29] Dostupné z: doi:[10.1016/j.colsurfb.2016.03.064](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.064)
- 18 JOSHI, Medha D. a Rainer H. MÜLLER. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. [online] 2009, **71**(2), 161-172. ISSN 09396411. [cit. 2022-01-29] Dostupné z: doi:[10.1016/j.ejpb.2008.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003)
- 19 HANS, M.L a A.M LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. [online] 2002, **6**(4), 319-327. ISSN 13590286. [cit. 2022-03-07] Dostupné z: doi:[10.1016/S1359-0286\(02\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00117-1)
- 20 FORNAGUERA, Cristina, Gabriela CALDERÓ, Montserrat MITJANS, Maria Pilar VINARDELL, Conxita SOLANS a Christine VAUTHIER. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale*. [online] 2015, **7**(14), 6045-6058. ISSN 2040-3364. [cit. 2022-05-02] Dostupné z: doi:[10.1039/C5NR00733J](https://doi.org/10.1039/C5NR00733J)

- 21 DOBROVOLSKAIA, Marina A., Parag AGGARWAL, Jennifer B. HALL a Scott E. MCNEIL. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*. [online] 2008, **5**(4), 487-495. ISSN 1543-8384. [cit. 2022-05-02] Dostupné z: doi:10.1021/mp800032f
- 22 CENNI, Elisabetta, Donatella GRANCHI, Sofia AVNET, et al. Biocompatibility of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials*. [online] 2008, **29**(10), 1400-1411. ISSN 01429612. [cit. 2022-05-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.022
- 23 BOLTNAROVA, Barbora, Jana KUBACKOVA, Josef SKODA, et al. PLGA Based Nanospheres as a Potent Macrophage-Specific Drug Delivery System. *Nanomaterials*. [online] 2021, **11**(3). ISSN 2079-4991. [cit. 2022-04-20] Dostupné z: doi:10.3390/nano11030749
- 24 DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATAELI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018, **10**(2). ISSN 1999-4923. [cit. 2022-05-03] Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- 25 GOMEZGAETE, C, N TSAPIS, M BESNARD, A BOCHOT a E FATTAL. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. [online] 2007, **331**(2), 153-159. ISSN 03785173. [cit. 2022-11-07] Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.028
- 26 HICKEY, John W., Jose Luis SANTOS, John-Michael WILLIFORD, et al. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *Journal of Controlled Release*. 2015, **219**(2), 536-547. ISSN 01683659. [cit. 2022-03-05] Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.006
- 27 DI MASCOLO, Daniele, Christopher J. LYON, Santosh ARYAL, et al. Rosiglitazone-loaded nanospheres for modulating macrophage-specific

- inflammation in obesity. *Journal of Controlled Release*. [online] 2013, **170**(3), 460-468. ISSN 01683659. [cit. 2022-01-29] Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2013.06.012
- 28 CUI, Jiajia, Alexandra S. PIOTROWSKI-DASPIT, Junwei ZHANG, et al. Poly(amine-co-ester) nanoparticles for effective Nogo-B knockdown in the liver. *Journal of Controlled Release*. [online] 2019, **304**(3), 259-267. ISSN 01683659. [cit. 2022-01-29] Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2019.04.044
- 29 RICHTER, Lauren R., Qianfen WAN, Di WEN, Yuqi ZHANG, Junjie YU, Jin ku KANG, Changyu ZHU a Elizabeth L. MCKINNON. Targeted Delivery of Notch Inhibitor Attenuates Obesity-Induced Glucose Intolerance and Liver Fibrosis. *ACS Nano*. [online] 2020, **14**(6), 6878-6886. [cit. 2021-11-13] Dostupné z: doi:doi:10.1021/acsnano.0c01007.
- 30 G. NAVA-ARZALUZ, Maria, Elizabeth PINON-SEGUNDO, Adriana GANEM-RONDERO a David LECHUGA-BALLESTEROS. *Single Emulsion-Solvent Evaporation Technique and Modifications for the Preparation of Pharmaceutical Polymeric Nanoparticles*. [online] 2012, **6**(3), 209-223. ISSN 18722113. [cit. 2021-12-12] Dostupné z: doi:10.2174/187221112802652633
- 31 RAO, J. Prasad a Kurt E. GECKELER. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. [online] 2011, **36**(7), 887-913. ISSN 00796700. [cit. 2021-12-17] Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001
- 32 RODRÍGUEZ-BURNEO, Nathalia, Maria BUSQUETS a Joan ESTELRICH. Magnetic Nanoemulsions: Comparison between Nanoemulsions Formed by Ultrasonication and by Spontaneous Emulsification. *Nanomaterials* [online]. 2017, **7**(7) [cit. 2022-01-04]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano7070190
- 33 MURAKAMI, Hideki, Masao KOBAYASHI, Hirofumi TAKEUCHI a Yoshiaki KAWASHIMA. Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1999, **187**(2), 143-

- 152 [cit. 2022-01-08]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(99)00187-8
- 34 NIWA, T., H. TAKEUCHI, T. HINO, N. KUNOU a Y. KAWASHIMA. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *Journal of Controlled Release* [online]. 1993, **25**(1-2), 89-98 [cit. 2022-01-08]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/0168-3659(93)90097-O
- 35 PINTO REIS, Catarina, Ronald J. NEUFELD, António J. RIBEIRO, a Francisco VEIGA. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2006, **2**(1), 8-21 [cit. 2021-12-12]. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
- 36 BARICHELLO, Jose Mario, Mariko MORISHITA, Kozo TAKAYAMA a Tsuneji NAGAI. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. [online] 1999, **25**(4), 471-476. ISSN 0363-9045. [cit. 2022-01-09] Dostupné z: doi:10.1081/DDC-100102197
- 37 TŮMOVÁ, Lenka a Miluše ZATLOUKALOVÁ. KURKUMA – TERAPEUTICKÉ ÚČINKY A MOŽNÉ INTERAKCE. *Praktické lékárenství*. [online] 2010, **6**(4), 209-211. [cit. 2022-01-15] dostupné z <https://www.solen.cz>
- 38 MEHANNY, Mina, Rania M. HATHOUT, Ahmed S. GENEIDI a Samar MANSOUR. Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; Curcumin and its derivatives. *Journal of Controlled Release*. [online] 2016, **225**, 1-30. ISSN 01683659. [cit. 2022-03-07] Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.018
- 39 PONTES-QUERO, Gloria María, Lorena BENITO-GARZÓN, Juan PÉREZ CANO, María Rosa AGUILAR a Blanca VÁZQUEZ-LASA. Amphiphilic polymeric nanoparticles encapsulating curcumin: Antioxidant, anti-inflammatory and biocompatibility studies. *Materials Science and*

- Engineering: C.* [online] 2021, **121**. ISSN 09284931. [2022-01-15]  
Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111793
- 40 ANAND, Preetha, Ajaikumar B. KUNNUMAKKARA, Robert A. NEWMAN a Bharat B. AGGARWAL. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*. [online] 2007, **4**(6), 807-818. ISSN 1543-8384. [cit. 2022-01-15] Dostupné z: doi:10.1021/mp700113r
- 41 BISHT, Savita, Georg FELDMANN, Sheetal SONI, Rajani RAVI, Collins KARIKAR, Amarnath MAITRA a Anirban MAITRA. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. [online] 2007, **5**(1). ISSN 1477-3155. [cit. 2022-01-15] Dostupné z: doi:10.1186/1477-3155-5-3
- 42 KOTHA, Raghavendhar R. a Devanand L. LUTHRIA. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*. [online] 2019, **24**(16). ISSN 1420-3049. [cit. 2022-01-15] Dostupné z: doi:10.3390/molecules24162930
- 43 CHEN, Xiao-ping, Li YI, Zhang YU a Li GAO-WEI. <p>Formulation, Characterization And Evaluation Of Curcumin- Loaded PLGA- TPGS Nanoparticles For Liver Cancer Treatment</p>. *Drug Design, Development and Therapy*. [online] 2019, **13**, 3569-3578. ISSN 1177-8881. [cit. 2021-12-12] Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S211748
- 44 MATĚJOVSKÁ KUBEŠOVÁ, Hana, Ondřej VÝŠKA, Jiří NAKLÁDAL a Jan MATĚJOVSKÝ. Úskalí celkové a lokální terapie kortikosteroidy: Mezioborové přehledy. *Dermatologie pro praxi*. [online] 2019, **17**(1), 49-53. [cit. 2022-01-25] Dostupné z: www.dermatologiepropraxi.cz
- 45 WANG. In vivo biodistribution, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects of liver targeting dexamethasone acetate loaded nanostructured lipid carrier system. *International Journal of Nanomedicine*. [online] ISSN 1178-2013. [cit 2022-01-29] Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S10393
- 46 LI, Sha, Ying-chun ZENG, Ke PENG, Chang LIU, Zhi-rong ZHANG a Ling ZHANG. Design and evaluation of glomerulus mesangium-targeted PEG-

- PLGA nanoparticles loaded with dexamethasone acetate. *Acta Pharmacologica Sinica*. [online] 2019, **40**(1), 143-150. ISSN 1671-4083. [cit. 2021-11-13] Dostupné z: doi:10.1038/s41401-018-0052-4
- 47 MOLAVI, Fatima, Mohammad BARZEGAR-JALALI a Hamed HAMISHEHKAR. Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes: A review on formulation approaches. *Journal of Controlled Release*. [online] 2020, **320**, 265-282. ISSN 01683659. [cit. 2022-05-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2020.01.028
- 48 SNEJDROVA, Eva, Stepan PODZIMEK, Juraj MARTISKA, Ondrej HOLAS a Milan DITTRICH. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharmaceutica*. [online] 2020, **70**(1), 63-75. ISSN 1846-9558. [cit. 2022-05-03] Dostupné z: doi:10.2478/acph-2020-0011
- 49 TSUKADA, Yusuke, Kaori HARA, Yohei BANDO, C.C. HUANG, Yasuo KOUSAKA, Yoshiaki KAWASHIMA, Ryuichi MORISHITA a Hiroyuki TSUJIMOTO. Particle size control of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanospheres for sterile applications. *International Journal of Pharmaceutics*. [online] 2009, **370**(1-2), 196-201. ISSN 03785173. [2022-03-07] Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.11.019
- 50 SILVA, Ronaldo Pedro da, Mateus Felipe Schuchter AMBRÓSIO, Luciana Almeida PIOVESAN, et al. New Polymorph Form of Dexamethasone Acetate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. [online] 2018, **107**(2), 672-681. ISSN 00223549. [cit. 2022-05-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2017.10.001

## 9 PŘÍLOHY

### 9.1 Příloha 1

	KURKUMIN									
metoda	datum	polymer	vodná fáze	organická	konc. CUR	size	PDI	zeta	EE % peleta	
precipitační	16.09.2020	PLGA2	1% PIF-127	aceton	300 ug/ml	146,000	0,051		31,860	
precipitační	16.09.2020	PLGA2	0,1% PIF-127	aceton	300 ug/ml	146,367	0,069		20,144	
precipitační	17.09.2020	PLGA2	0,1% Cholát sodný	aceton	300 ug/ml	146,533	0,186		14,812	
precipitační	18.09.2020	PLGA2	1% Cholát sodný	aceton	300 ug/ml	4026,500	1,000		xxxxx	nepoužitelný vzorek
precipitační	17.09.2020	PLGA2	2% Cholát sodný	aceton	300 ug/ml	69,470	0,350		xxxxx	nepoužitelný vzorek
precipitační	18.09.2020	PLGA2	3% Cholát sodný	aceton	300 ug/ml	186,167	0,299		xxxxx	nepoužitelný vzorek
precipitační	21.09.2020	PLGA2	1% TW20	aceton	300 ug/ml	142,333	0,112		0,174	
precipitační	21.09.2020	PLGA2	0,1% TW20	aceton	300 ug/ml	135,233	0,120		12,088	
precipitační	21.09.2020	PLGA2	1% PVA	aceton	300 ug/ml	188,967	0,055		18,284	
precipitační	21.09.2020	PLGA2	0,1% PVA	aceton	300 ug/ml	177,133	0,093		34,736	
precipitační	22.09.2020	PLGA2	1% TW20_0,1% SP60	aceton	300 ug/ml	148,867	0,152	-24,167	0,826	
precipitační	22.09.2020	PLGA2	0,1% TW20_1% SP60	aceton	300 ug/ml	176,100	0,337	-13,300	10,494	
precipitační	22.09.2020	PLGA2	1% TW20_1% SP60	aceton	300 ug/ml	158,500	0,218	-24,433	1,097	
precipitační	22.09.2020	PLGA2	0,1% TW20_0,1% SP60	aceton	300 ug/ml	150,000	0,120	-24,833	21,116	
precipitační	23.09.2020	PLGA2	0,01% RH40	aceton	300 ug/ml	112,633	0,115		xxxxx	nepoužitelný vzorek
precipitační	23.09.2020	PLGA2	0,1% RH40	aceton	300 ug/ml	145,067	0,204		9,367	
precipitační	23.09.2020	PLGA2	1% RH40	aceton	300 ug/ml	116,133	0,138		0,810	
precipitační	23.09.2020	PLGA2	2% RH40	aceton	300 ug/ml	117,533	0,146		0,000	
precipitační	24.09.2020	PLGA2	1% HS15	aceton	300 ug/ml	137,400	0,214		1,241	
precipitační	24.09.2020	PLGA2	0,1% HS15	aceton	300 ug/ml	122,400	0,160		7,281	
precipitační	24.09.2020	PLGA2	2% HS15	aceton	300 ug/ml	125,267	0,136		0,000	

### 9.2 Příloha 2

	KURKUMIN									
METODA	ozn. vzorku	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. CUR	size	PDI	zeta	EE % peleta
emulzní	A	3.6.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	300 ug/ml	342,5000	0,3423	x	46,676
precipitační	B	3.6.	PLGA2	0,5% PIF-127	aceton	300 ug/ml	129,8333	0,0690	x	60,388
emulzní	C	3.6.	Cor5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	300 ug/ml	x	x	x	62,076
emulzní	C 1,2 um filtr	3.6.	Cor5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	300 ug/ml	236,9667	0,0530	-10,4667	40,352
precipitační	D	3.6.	Cor5.5	0,5% PIF-127	aceton	300 ug/ml	x	x	x	62,969
precipitační	D 1,2 um filtr	3.6.	Cor5.5	0,5% PIF-127	aceton	300 ug/ml	153,3667	0,0813	-10,8667	44,669
emulzní	E	3.6.	Cor7.3	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	300 ug/ml	x	x	x	68,154
emulzní	E 1,2 um filtr	3.6.	Cor7.3	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	300 ug/ml	303,7333	0,2290	-9,7267	35,333
precipitační	F	3.6.	Cor7.3	0,5% PIF-127	aceton	300 ug/ml	x	x	x	69,130
precipitační	F 1,2 um filtr	3.6.	Cor7.3	0,5% PIF-127	aceton	300 ug/ml	161,1000	0,1033	-8,7700	50,221

### 9.3 Příloha 3

EMULZNÍ	DEXAMETHASON									
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEX	size	PDI	zeta	EE % peleta	
	26.2.	PLGA2	0,5% PIF-127	dichlormethan: aceton (1:9)	400 ug/ml	1974,0000	1,0000	x	x	
	26.2.	PLGA2	0,5% PIF-127	dichlormethan: aceton (1:9)	150 ug/ml	642,1333	0,9190	x	x	
	26.2.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	187,3000	0,0660	-14,4333		10,4000
	26.2.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	150 ug/ml	176,8667	0,0797	-14,0000		7,8000

### 9.4 Příloha 4

EMULZNÍ	DEXAMETHASON									
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEX	size	PDI	zeta	EE % peleta	
	12.3.	PLGA2	0,5% Pluronic F-127	ethylacetát:aceton (1:9)	50 ug/ml	195,0000	0,0640	-12,0000		2,4500
	12.3.	PLGA2	0,5% Pluronic F-127	ethylacetát:aceton (1:9)	100 ug/ml	194,0000	0,0540	-11,5000		4,1500
	12.3.	PLGA2	0,5% Pluronic F-127	ethylacetát:aceton (1:9)	150 ug/ml	284,0000	0,1590	-14,6000		3,3300
	12.3.	PLGA2	0,5% Pluronic F-127	ethylacetát:aceton (1:9)	300 ug/ml	269,0000	0,1250	-14,7000		4,3700
	12.3.	PLGA2	0,5% Pluronic F-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	377,0000	0,1630	-14,3000		3,6700

## 9.5 Příloha 5

EMULZNÍ	DEXAMETHASON								
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEX	size	PDI	zeta	EE % peleta
	12.3.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	377,0000	0,1630	-14,3000	3,6700
	6.4.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:1)	400 ug/ml	317,9000	0,4910	-15,1667	6,2356
	6.4.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát	400 ug/ml	77,8200	0,2020	-9,5533	4,1572
	6.4.	PLGA2	1% PVA	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	404,7667	0,1000	-0,8150	10,3319
	6.4.	PLGA2	1% PVA	ethylacetát:aceton (1:1)	400 ug/ml	532,4000	0,5047	-1,2267	5,7509
	6.4.	PLGA2	1% PVA	ethylacetát	400 ug/ml	130,3667	0,1583	-2,7467	2,1455
	9.4.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	238,2000	0,0887	-11,3000	7,1777
	9.4.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:1)	400 ug/ml	462,3333	0,6220	-13,1000	3,5388
	9.4.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát	400 ug/ml	217,2333	0,0553	-9,9600	9,7111
	12.4.	Cor 5.5	1% PVA	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	367,3333	0,0887	-0,9487	4,4082
	12.4.	Cor 5.5	1% PVA	ethylacetát:aceton (1:1)	400 ug/ml	516,1000	0,4530	-0,8843	6,2565
	12.4.	Cor 5.5	1% PVA	ethylacetát	400 ug/ml	329,2333	0,0540	-0,8167	5,7958

## 9.6 Příloha 6

EMULZNÍ	DEXAMETHASON ACETÁT								
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEXACT	size	PDI	zeta	EE % peleta
	20.4.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	236,2333	0,0857	-13,8667	32,3174
	20.4.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	228,2333	0,0933	-11,7667	25,4185
	20.4.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát	400 ug/ml	69,2167	0,1373	-9,3567	9,6892
	20.4.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát	400 ug/ml	85,7733	0,0970	-9,3000	9,0977

## 9.7 Příloha 7

NANOPRECIPITAČNÍ	DEXAMETHASON ACETÁT								
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEXACT	size	PDI	zeta	EE % peleta
	26.4.	PLGA2	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	126,7333	0,0660	-10,6333	32,8084
	26.4.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	144,8000	0,1000	-10,7667	30,7935
	26.4.	PLGA2	0,5% PIF-127	acetonitril	400 ug/ml	251,9333	0,3030	-14,9333	41,5914
	26.4.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	acetonitril	400 ug/ml	207,9667	0,1220	-12,5333	38,4011

## 9.8 Příloha 8

NANOPRECIPITAČNÍ	DEXAMETHASON ACETÁT								
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEXACT	size	PDI	zeta	EE % peleta
	3.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	172,4667	0,0737	-10,9667	45,5768
1,2um filtr	3.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml				39,9888
	3.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	204,9000	0,0690	-12,4000	31,3087
1,2um filtr	3.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml				28,5582
	3.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	acetonitril	400 ug/ml	344,2667	0,3783	-17,0000	32,2773
1,2um filtr	3.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	acetonitril	400 ug/ml				8,3544
	3.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	acetonitril	400 ug/ml	262,4333	0,1537	-13,5000	30,7561
1,2um filtr	3.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	acetonitril	400 ug/ml				13,5140

## 9.9 Příloha 9

EMULZNÍ METODA	DEXAMETHASON ACETÁT								
	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEXACT	size	PDI	zeta	EE % peleta
1,2um filtr	11.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	177,4000	0,0513	-11,4000	29,1593
1,2um filtr DUPLIKÁT	11.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml				29,5902
1,2um filtr	11.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	181,6000	0,0700	-11,5667	25,0687
1,2um filtr DUPLIKÁT	11.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml				24,2601
1,2um filtr	1.6.	Cor 7.3	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml	335,0333	0,2470	-11,0333	25,5399
1,2um filtr DUPLIKÁT	1.6.	Cor 7.3	0,5% PIF-127	ethylacetát:aceton (1:9)	400 ug/ml				24,7833



## 9.10 Příloha 10

NANOPRECIPITAČNÍ		DEXAMETHASON ACETÁT				PO FILTRACI 1,2 um			
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEXACT	size	PDI	zeta	EE % peleta
1,2um filtr	11.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	131,6000	0,0833	-10,8000	24,1361
1,2um filtr DUPLIKÁT	11.5.	PLGA2	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml				25,0097
1,2um filtr	11.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	151,6667	0,0783	-10,5667	23,9472
1,2um filtr DUPLIKÁT	11.5.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml				21,4563
1,2um filtr	1.6.	Cor 7.3	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	157,3333	0,0737	-10,5333	29,4951
1,2um filtr DUPLIKÁT	1.6.	Cor 7.3	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml				33,4204

## 9.11 Příloha 11

NANOPRECIPITAČNÍ		DEXAMETHASON ACETÁT				PO FILTRACI 1,2 um			
METODA	datum	polymer	vodná fáze	organická fáze	konc. DEXACT	size	PDI	zeta	EE % peleta
čištění	7.6.	PLGA2	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	129,4000	0,0763	-20,2333	8,6111
čištění	7.6.	Cor 5.5	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	131,5333	0,0823	-22,3000	10,5233
čištění	7.6.	Cor 7.3	0,5% PIF-127	aceton	400 ug/ml	162,3000	0,1797	-20,1000	15,8682