

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



**Polymerní nanočástice jako platforma pro dodání ve vodě špatně
rozpuštěných léčiv**

**Polymeric nanoparticles as a platform for delivery of poorly water-
soluble drugs**

Diplomová práce

Hradec Králové 2023

Adéla Roztočilová

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

Dne 30.8. 2023 v Hradci Králové

.....
Adéla Roztočilová

Děkuji PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, také za ochotu, cenné rady a připomínky při zpracovávání práce. Také bych chtěla poděkovat za pomoc při realizaci experimentální části.

OBSAH

1	ABSTRAKT	6
2	ABSTRACT.....	7
3	Úvod a cíl práce	8
4	Seznam zkratk	9
5	Teoretická část	11
5.1	Nanočástice jako nosiče léčiv	11
5.2	Typy nanonosičů	11
5.2.1	Liposomy	11
5.2.2	Micely	12
5.2.3	Dendrimery	13
5.2.4	Polymerní nanočástice	14
5.3	Způsoby přípravy polymerních nanočástic	16
5.3.1	Odpařování rozpouštědla	16
5.3.2	Emulgace s difúzí rozpouštědla	17
5.3.3	Vysolování	17
5.3.4	Nanoprecipitace	18
5.4	Charakterizace polymerních nanočástic.....	20
5.4.1	Velikost nanočástic a index polydisperzity	20
5.4.2	Zeta potenciál.....	23
5.4.3	Enkapsulační efektivita a drug loading.....	25
5.5	Cílená distribuce nanočástic.....	27
5.5.1	Pasivní targeting	27
5.5.2	Aktivní targeting	28
5.5.3	Biologické bariéry cíleného podání	29
5.6	Nanočástice v léčbě zánětlivých onemocnění.....	30
5.6.1	NAFLD a NASH	32
5.7	Kurkumin	33
5.7.1	Polymerní nanočástice jako nosiče kurkuminu	34
6	Experimentální část.....	35
6.1	Použité přístroje	35
6.2	Použité suroviny.....	35
6.3	Použité metody.....	36

6.3.1	Příprava nanočástic-metoda nanoprecipitace.....	36
6.3.2	Příprava nanočástic-Emulzní odpařovací metoda.....	37
6.3.3	Centrifugace.....	37
6.3.4	Kvantifikace enkapsulovaného kurkuminu	38
6.3.5	Měření velikosti a PDI.....	39
6.4	Disoluce.....	40
7	Výsledky a diskuze	42
7.1	Nanočástice připravené pomocí metody nanoprecipitace.....	43
7.1.1	Nanočástice připravené za přítomnosti surfaktantu Pluronic® F127- sledování vlivu PLGA	43
7.1.2	Nanočástice připravené za přítomnosti surfaktantu PVA-sledování vlivu PLGA	47
7.1.3	Porovnání nanočástic za využití surfaktantů: Pluronic® F127, PVA.....	51
7.1.4	Nanočástice připravené za přítomnosti různých poměrů AC:EtOH.....	56
7.2	Nanočástice připravené za pomoci emulzní odpařovací metody	58
7.2.1	Hodnocení parametrů (Velikost, PDI, EE, DL).....	61
7.2.2	Porovnání nanočástic za využití metod: Nanoprecipitace (NPM), Emulzní odpařovací metoda (ESE)	62
7.3	Disoluce.....	68
8	Závěr	71
9	Seznam obrázků.....	73
10	Seznam grafů	74
11	Seznam tabulek	76
12	Seznam rovnic.....	76
13	Literatura.....	77

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Student: Adéla Roztočilová

Název diplomové práce: Polymerní nanočástice jako platforma pro dodání ve vodě špatně rozpustných léčiv

Polymerní nanočástice mohou být využívány díky jejich výhodným vlastnostem jako nosiče léčiv. Jednou z výhod polymerních nanočástic je např. zvýšení rozpustnosti léčiv ve vodě. Mají velký potenciál v terapii zánětlivých onemocnění jako je Crohnova choroba či v posunu farmakoterapie rakoviny.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo připravit polymerní nanočástice s enkapsulovaným kurkuminem jako modelové účinné látky. Pro přípravu nanočástic byly použity čtyři typy kopolymeru kyseliny poly(mléčné-ko-glykolové) (PLGA). Byla využita metoda nanoprecipitace a emulzní odpařovací metoda. Hodnocenými parametry byla enkapsulační efektivita, drug loading, velikost částic a polydisperzita. Během experimentu se měnila jak vodná fáze, kde se pracovalo se dvěma různými surfaktanty, tak organická fáze. V rámci experimentální části byla využita rovněž metoda disoluce, kde se porovnávaly dva typy kopolymeru PLGA a v průběhu disoluce byly odebírány vzorky v předem stanovených časech za stanovení celkového uvolněného množství kurkuminu.

Výsledky experimentální části ukazují, že naměřené velikosti nanočástic se pohybují v rozmezí 100-300 nm potřebnou pro cílenou distribuci do zánětlivých tkání. Z výsledků je také zřejmé, že vhodnější metodou pro přípravu polymerních nanočástic je metoda nanoprecipitace, kde enkapsulační efektivita (EE) dosahuje vyšších hodnot než u emulzní odpařovací metody. Nejvyšších hodnot EE dosahoval PLGA A2 za využití surfaktantu Pluronic® F127. Z disolučních profilů vyšlo, že uvolňování kurkuminu probíhalo rychleji u PLGA E 5/5, kdy po 72 hodinách došlo k uvolnění až 67 % kurkuminu.

Klíčová slova: polymerní nanočástice, kurkumin, targeting, enkapsulace

2 ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Mentor: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Adéla Roztočilová

Title of thesis: Polymeric nanoparticles as a platform for delivery of poorly water-soluble drugs

Polymer nanoparticles can be used as drug carriers due to their beneficial properties. One of the advantages of polymeric nanoparticles is, for example, to increase the solubility of drugs in water. They have great potential in the therapy of inflammatory diseases such as Crohn's disease or in shifting cancer pharmacotherapy.

The main objective of this thesis was to prepare polymeric nanoparticles with encapsulated curcumin as model active ingredient. Four types of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) copolymer were used to prepare the nanoparticles. Nanoprecipitation and emulsion evaporation methods were employed. The parameters evaluated were encapsulation efficiency, drug loading, particle size and polydispersity. Both the water phase, where two different surfactants were employed, and the organic phase were varied during the experiment. The experimental part also used a dissociation method where two types of PLGA copolymer were compared and during the dissociation, samples were taken at predetermined times to determine the total amount of curcumin released.

The results of the experimental part show that the measured nanoparticle sizes are in the range of 100-300 nm needed for targeted distribution to the inflammatory tissues. The results also show that the nanoprecipitation method is a more suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles, where the encapsulation efficiency (EE) reaches higher values than the emulsion evaporation method. The highest EE values were achieved by PLGA A2 using the surfactant Pluronic® F127. The dissolution profiles showed that curcumin release was faster in PLGA E 5/5, with up to 67% of curcumin released after 72 hours.

Key words: polymeric nanoparticles, curcumin, targeting, encapsulation

3 Úvod a cíl práce

V posledních letech došlo k nebývalému rozvoji výzkumu a aplikace v oblasti nanověd a nanotechnologií. Jedná se o rozsáhlou tematickou oblast, která zahrnuje nanočástice, které působí jako biologická mimetika, nanovlákná a polymerní nanočástice sloužící jako biomateriály, senzory a laboratorní materiály pro diagnostiku. Nanomateriály nacházejí své uplatnění i v medicínských vědách, a to především jako platforma pro řízené a cílené podání léčiv. Je pravděpodobné, že nanotechnologie aplikovaná v medicíně přinese významný pokrok v diagnostice a léčbě nemocí. Mezi hlavní důvody neúspěchu velkého počtu nových a kandidátských léčiv je jejich nedostatečná nebo suboptimální absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace (ADME). To přispívá k závažným problémům s biologickou dostupností, které následně vedou ke zvyšování dávky a frekvenci dávkování. Odpověď na tyto problémy se nachází ve využití sofistikovaných lékových systémů včetně těch nanočásticových.

Cílem této práce bylo připravit polymerní nanočástice s kurkuminem jako účinnou látkou. Jedná se o lipofilní látku, která má velmi nízkou rozpustnost ve vodě. Právě pomocí polymerních nanočástic lze dosáhnout vyšší biologické dostupnosti. Hodnocení nanočástic si klade za cíl charakterizovat je z hlediska velikosti částic, polydisperzity, enkapsulační efektivity a celkového množství inkorporovaného kurkuminu. Tato práce je zaměřena zejména na hledání vhodné metody přípravy nanočástic a optimálních podmínek pro další experimenty.

4 Seznam zkratek

ACE	Aceton
ADME	Absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace
AFM	Mikroskopie atomárních sil
COX	Lipooxygenáza
DL	Drug loading
DLS	Dynamický rozptyl světla
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Enkapsulační efektivita
EDX	Energeticko-disperzní rentgenová analýza
EtOH	Ethanol
ESE	Emulzní odpařovací metoda
FFA	Volná mastná kyselina
GA	Kyselina glykolová
HSC	Jaterní hvězdčovitě buňky
IN-6	Interleukin 6
IR	Inzulínová rezistence
KC	Kupfferovy buňky
LA	Kyselina mléčná
LSEC	Sinusoidální endoteliální buňky
NFκB	Nukleární faktor κB
MPS	Mononukleárně fagocytický systém
NASH	Nealkoholická steatohepatitida
NAFLD	Nealkoholické ztukovatění jater
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NPM	Nanoprecipitace
PCL	Poly(ε-kaprolakton)
PDI	Index polydisperzity
PE	Polyethylen
PEG	Poly(ethylenglykol)
PLA	Poly(mléčná) kyselina
PLGA	Poly(mléčná-ko-glykolová)kyselina

PLGA 5/5	Lineární kopolymer PLGA5/5, Purasorb® PDLG 5002A, v poměru 50:50 kyseliny mléčné:kyseliny glykolové
PLGA E 5/5	Lineární kopolymer PLGA5/5, Purasorb® PDLG 5002E – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (50:50)
PLGA 7/3	Lineární kopolymer PLGA7/3, Purasorb® PDLG 7502A, v poměru 75:25 kyseliny mléčné:kyseliny glykolové
PLGA A2	Kopolymer PLGA A2 větvený na 2% kyselině polyakrylové v poměru 1:1 kyseliny mléčné:kyseliny glykolové
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrolidon
RCF	Relative centrifugal force
RES	Retikuloendoteliární systém
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SLN	Pevné lipidové nanočástice
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TGF- β	Transformující růstový faktor
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa
T-SEM	Transmisní skenovací elektronová mikroskopie

5 Teoretická část

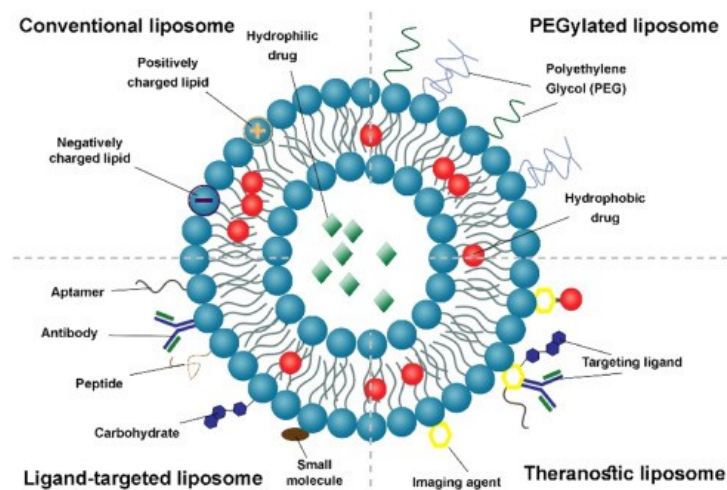
5.1 Nanočástice jako nosiče léčiv

Ve farmaceutické technologii můžeme pozorovat v posledních letech přechod k vývoji násobných forem a k jejich zavádění do terapeutické praxe. Důvodů je zde několik, z farmaceutického hlediska se jedná například o zmírnění nežádoucích účinků, zvýšení účinnosti terapie a řízené uvolňování. Příkladem těchto násobných forem mohou být nanočástice. [1] Jedná se o struktury v rozměrech od 1 do 100 nm. Předpona "nano" se však běžně v medicinských vědách používá pro částice, které mají velikost až několik set nanometrů. [2]. Nanočástice lze úspěšně používat jako nosiče pro podání obtížně vstřebatelných léčiv nebo mohou účinnou látku dopravit do místa jejího terapeutického působení. [1]

5.2 Typy nanonosičů

5.2.1 Liposomy

Liposom se skládá ze sférického dvouvrstevného obalu a vodného jádra. Obal je typicky tvořen fosfolipidovou dvojvrstvou (Obrázek 1). Do vodného jádra lze vložit hydrofilní léčiva a do lipofilních dvojvrstev liposomů lze inkorporovat lipofilní léčiva. Velikost částic se obvykle pohybuje mezi 25-1000 nm. Mezi metody přípravy liposomů řadíme ultrazvukovou dispergační metodu, injekční metodu nebo metodu reverzního fázového odpařování. Vzhledem k tomu, že jejich složení je podobné jako u membrán lidských buněk, mají liposomy jako cílené nosiče léčiv nesrovnatelné výhody. Díky jejich vlastnostem, jako je nízká toxicita, neimunogenicita a snadná příprava, bylo vyvinuto mnoho liposomálních přípravků a některá liposomální léčiva byla uvedena na trh. [3] Požadovaných vlastností liposomů lze rovněž dosáhnout pomocí přírodních i syntetických polymerů, které je možné připojit k vnějšímu i vnitřnímu povrchu liposomové membrány. Jedná se o tzv. polymerové liposomy. Příkladem takového polymeru může být makrogol, který zvýší dobu jejich cirkulace v krvi díky své hydrofilitě a vysoké flexibilitě makrogolových řetězců. Tato modifikace umožňuje jejich využití jako nosičů léčiv pro parenterální aplikaci. [1]

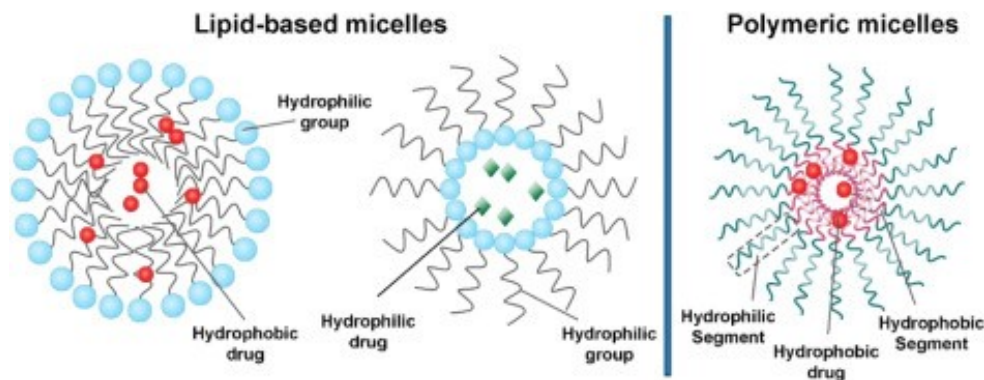


Obrázek 1: Struktura liposomu [4]

5.2.2 Micely

Micely obsahují hydrofilní obal a lipofilní jádro vzniklým samouspořádáním amfifilních molekul. Nanomicely mohou být vynikajícími nanonosiči léčiv díky několika výhodám jako je zlepšení rozpustnosti lipofilního léčiva ve vodě a jeho biologické dostupnosti, snížení nežádoucích vedlejších účinků, zlepšení propustnosti a biodistribuce a také ochrana léčiv před biologickými složkami. [4]

Polymerní micely (Obrázek 2) jsou tvořeny z amfifilních blokových kopolymerů tvořící struktury o velikosti pod 100 nm. [5] Jedná se například o hydrofilní kopolymery jako je poly(ethylenglykol) (PEG), chitosan a polyvinylpyrrolidon (PVP). Pro tvorbu jader micel mohou být použity hydrofobní materiály, jako je poly (kyselina mléčná) (PLA), poly (ϵ -kaprolakton) (PCL) či kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA). [3]

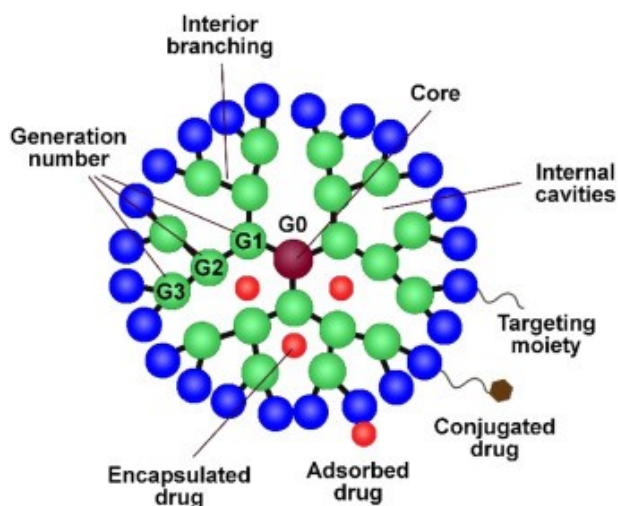


Obrázek 2: Micely na bázi lipidů vs. polymerní micely [4]

5.2.3 Dendrimery

Dendrimery jsou polymerní makromolekuly v nanorozměrech charakteristické rozvětvenou trojrozměrnou strukturou. [4] Díky svému větvení se dendrimery někdy označují jako "hvězdicovité" polymery. Skládají se ze stěny a jádra (Obrázek 3), na který jsou radiálně navázány vnitřní vrstvy opakujících se podjednotek (dendronů). [6] Mají jednotnou molekulovou strukturu o velikosti 5-20 nm. [1]

Výhodou dendrimerů je jejich vysoká funkčnost, kontrolovatelná struktura a velikost. Díky jejich malé velikosti jsou vylučovány renální cestou. [4] Je možné do nich uzavřít molekuly aktivních látek, které se k nim poutají nekovalentními vazbami a mohou tak tvořit vhodný mezičlánek ke kovalentním polymerním konjugátům s léčivými na jedné straně a k fyzikálně uzavřeným léčivům v částicích na straně druhé. [1] Mezi nevýhody dendrimerních nanostruktur je však jejich toxicita. [4]



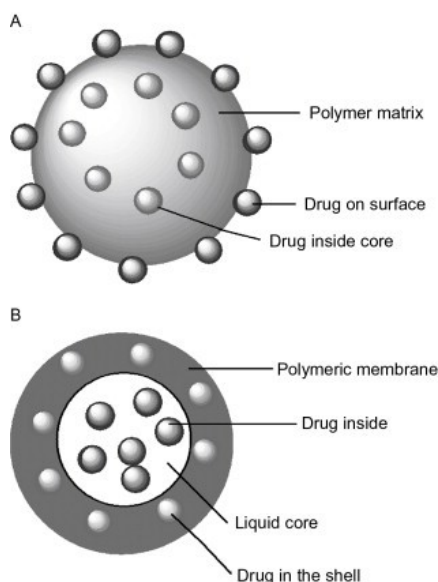
Obrázek 3: Struktura dendrimeru [4]

5.2.4 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice lze definovat jako koloidní systémy, jejichž velikost se obvykle pohybuje v rozmezí 5 nm až po horní hranici velikosti 1000 nm, ačkoliv velikost obvykle dosahuje rozmezí 100-500 nm. Polymerní nanočástice je souhrnný termín používaný pro jakýkoli typ polymerních částic o velikosti nano, konkrétně pro polymerní nanosféry a nanotobolky (obrázek 4), které se liší svojí morfologií. [7]

Nanotobolky se skládají z lipofilního jádra, v němž je obvykle rozpuštěno léčivo, obklopeného polymerním obalem, který řídí profil uvolňování léčiva z jádra. [8] Nanosféry mají matricovou strukturu s léčivem, které je zde dispergováno nebo je léčivo naadsorbováno na povrchu částice. [1] Tyto dva typy polymerních nanočástic rozeznávané jako zásobníkový systém (nanotobolky) a matricový systém (nanosféry) a jsou znázorněny na obrázku 4. [8]

Výhody polymerních nanočástic jako systémů pro podávání účinných látek patří vysoká účinnost enkapsulace léčiva, vyšší stabilita enkapsulovaných účinných látek a kompatibilita s tkáněmi a buňkami, pokud jsou připraveny z biopolymerů, které jsou biokompatibilní nebo biodegradovatelné. Polymerní nanočástice mohou být navrženy tak, aby účinně doručily léčivo do cílového místa, a tím zvýšily terapeutické výsledky a minimalizovaly vedlejší účinky. [7]



Obrázek 4: (A) Polymerní nanočástice nebo polymerní nanosféry. (B) Polymerní nanokapsle [7]

5.2.4.1 Typy polymerů pro přípravu

Do procesu přípravy lze zapojit dva typy polymerů, a to jak přírodní, tak odvozené syntézou. Obecně platí, že většina přírodních polymerů je biologicky odbouratelná, zatímco některé syntetické polymery odbouratelné nejsou. [7]

Přirozeně se vyskytující biodegradovatelné polymery jsou široce využívány díky jejich biokompatibilitě a také nízké toxicitě. Patří mezi ně polymery na bázi bílkovin, jako je albumin, želatina, sója, kolagen, a polysacharidy, například chitosan, agaróza, dextran, kyselina hyaluronová, alginát, karagenan a cyklodextrin. Nejpoužívanějším přírodním polymerem je chitosan díky snadné modifikaci povrchu spolu s nižší toxicitou a neimunogenním chováním vykazujícím značnou kompatibilitu s tkáněmi a buňkami. Chitosan ve spojení s foláty působí jako vynikající nosič léčiv, mimo jiné specificky zaměřený na kolorektální karcinom. [9]

Syntetické polymery jsou dobře známé lepší kontrolou fyzikálně chemických vlastností během přípravy. [10] Mezi běžné syntetické polymery pro přípravu polymerních nanočástic patří polyethylenglykol (PEG), kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA), polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrolidon (PVP) a polyethylen (PE). [7] V rámci praktické části se pracovalo s kopolymerem PLGA, který bude popsán v následující kapitole.

5.2.4.1.1 Kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA)

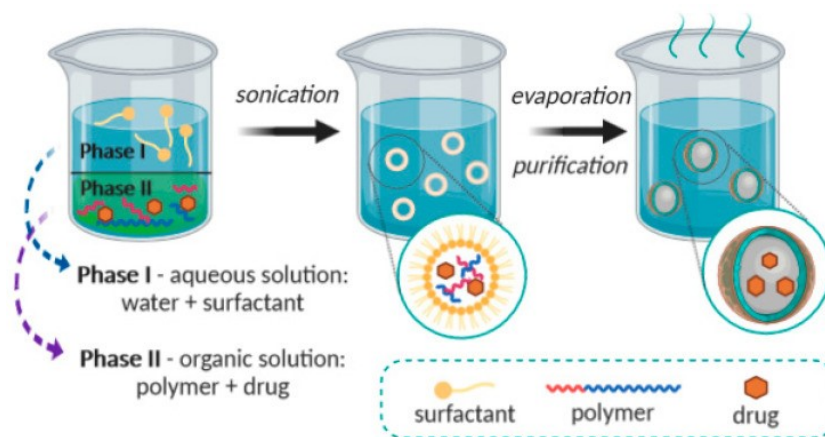
Kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) je kopolymer syntetizovaný náhodnou polymerací dvou různých monomerů kyseliny glykolové a kyseliny mléčné. Jedná se o široce používaný polymer, který se v těle snadno metabolizuje. [11] PLGA se *in vivo* hydrolyzuje na kyselinu mléčnou a glykolovou a dále se metabolizuje na vodu a oxid uhličitý prostřednictvím citrátového cyklu, a nakonec se eliminuje z těla ven. [12] Výsledkem je tedy minimální systémová toxicita. Typy PLGA se obvykle charakterizují podle poměru použitých monomerů. Například pro PLGA 50:50 označuje kopolymer, jehož složení je 50 % kyseliny mléčné a 50 % kyseliny glykolové. Kyselina mléčná je více hydrofobní než kyselina glykolová, a proto PLGA kopolymery obsahující více kyseliny mléčné jsou méně hydrofilní, absorbují méně vody a následně je jejich degradace zpomalena. [11]

5.3 Způsoby přípravy polymerních nanočástic

5.3.1 Odpařování rozpouštědla

Jedná se o první metodu vyvinutou pro přípravu polymerních nanočástic z předem připraveného polymeru. [8] Při této metodě se roztoky polymerů připravují v roztoku těkavých rozpouštědel za tvorby emulze. [13]

Zpočátku je nutná příprava emulze olej ve vodě (o/v), což vede k výrobě nanosfér. Celý proces je znázorněn na obrázku číslo 5. Nejprve se připraví organická fáze sestávající z nepolárního s vodou nemísitelného organického rozpouštědla, v němž se rozpustí polymer a účinná látka. V minulosti se hojně používaly dichlormethan a chloroform, ale vzhledem k jejich toxicitě byly nahrazeny ethylacetátem, ten vykazuje lepší toxikologický profil, a proto je vhodnější pro biomedicínské aplikace. Vodná fáze obvykle obsahuje povrchově aktivní látku (např. částečně hydrolyzovaný polyvinylacetát; PVA). Organický roztok se emulguje ve vodné fázi s povrchově aktivní látkou a poté se obvykle zpracovává pomocí vysokorychlostní homogenizace nebo ultrazvuku, čímž vzniká disperze nanokapek. Odpařením polymerního rozpouštědla vzniká suspenze polymeru, která může difundovat kontinuální fázi emulze. Rozpouštědlo se odpařuje buď kontinuálním mícháním při laboratorní teplotě nebo pomalým procesem za sníženého tlaku. Po odpaření rozpouštědla lze vzniklé nanočástice promýt a shromáždit odstředěním, po němž následuje lyofilizace pro dlouhodobé skladování. Tato metoda umožňuje vytvářet nanosféry. [8]

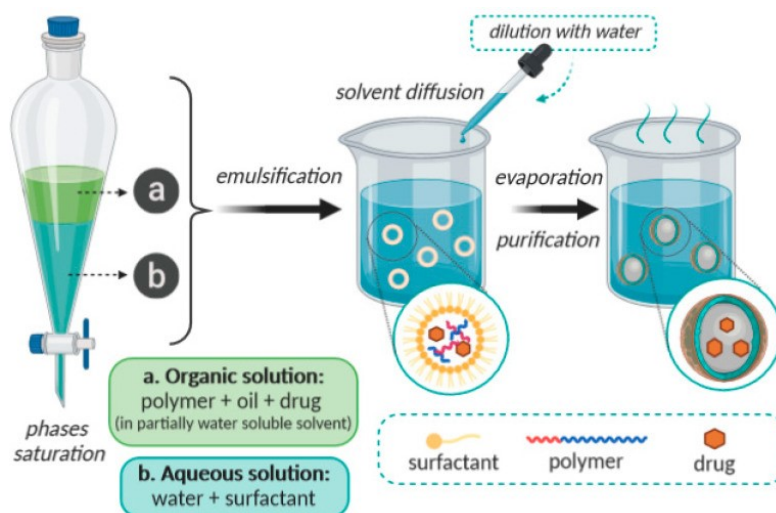


Obrázek 5: Metoda odpařování rozpouštědla [8]

5.3.2 Emulgace s difúzí rozpouštědla

Jedná se o modifikovanou verzi metody odpařování rozpouštědla. [13] Tato metoda (Obrázek 6) spočívá ve vytvoření emulze o/v mezi částečně vodou mísitelným rozpouštědlem obsahujícím polymer a léčivo a vodným roztokem s povrchově aktivní látkou. [8] Tato technika představuje několik výhod, jako je vysoká účinnost enkapsulace, obvykle větší než 70 %, není třeba homogenizace, vysoká účinnost mezi jednotlivými dávkami, reprodukovatelnost a jednoduchost provedení. [13]

Obecně se tato metoda používá k výrobě nanosfér. Nanokapsle lze připravit také, pokud se do organické fáze přidá malé množství oleje (např. triglyceridy: C6, C8, C10, C12). Díky této metodě je možné získat polymerní nanočástice o rozměrech od 80 do 900 nm. [8]



Obrázek 6: Emulgace s difúzí rozpouštědla [8]

5.3.3 Vysolování

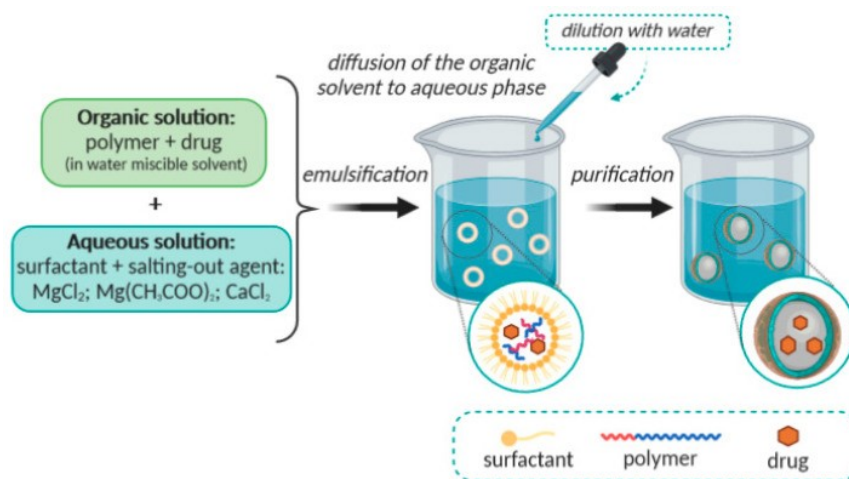
Hlavní rozdíl oproti předchozí metodě je v emulzi, která je vytvořena vodou mísitelného polymerního rozpouštědla, jako je aceton a vodné fáze obsahující vysolovací činidlo a koloidní stabilizátor. Vhodná vysolovací činidla zahrnují elektrolyty, jako je chlorid hořečnatý, chlorid vápenatý nebo octan hořečnatý a neelektrolyty, například sacharosa. Mísitelnost acetonu a vody se snižuje nasycením vodné fáze, což umožňuje vytvoření emulze o/v z jinak mísitelných fází. [10] Emulze o/v se připravuje za intenzivního míchání při laboratorní teplotě.

Následně se emulze zředí pomocí příslušného objemu deionizované vody nebo vodného roztoku, aby nastala difúze organického rozpouštědla do vnější fáze, vysrážení

polymeru a následně tvorba nanosfér. [8] Zbývající rozpouštědlo polymeru a vysolovací činidlo se odstraní např. křížovou průtokovou filtrací. Podmínka úplné mísitelnosti mezi organickým rozpouštědlem a vodou není nezbytná, ale zjednodušuje proces provedení. Pokud tomu tak není, je třeba při tvorbě nanočástic zajistit větší objemový poměr vody a rozpouštědla. Jedinou podmínkou, která by měla být splněna, je nutnost dvoufázového systému v přítomnosti vysolovacího činidla.

Hlavní výhodou metody vysolování je absence používání chlorovaných rozpouštědel, která jsou nebezpečná pro životní prostředí i pro fyziologické systémy. Největšími nevýhodami je výhradní použití lipofilních léčiv při enkapsulaci a nutnost intenzivních purifikačních kroků v důsledku použití solí. Tato skutečnost může být příčinou toho, že v posledních letech bylo publikováno jen málo zpráv, které citují metodu vysolování. [10]

Tato metoda je schematicky znázorněna na obrázku 7. Rozměry nanosfér získaných touto metodou se pohybují mezi 170 a 900 nm. [8]

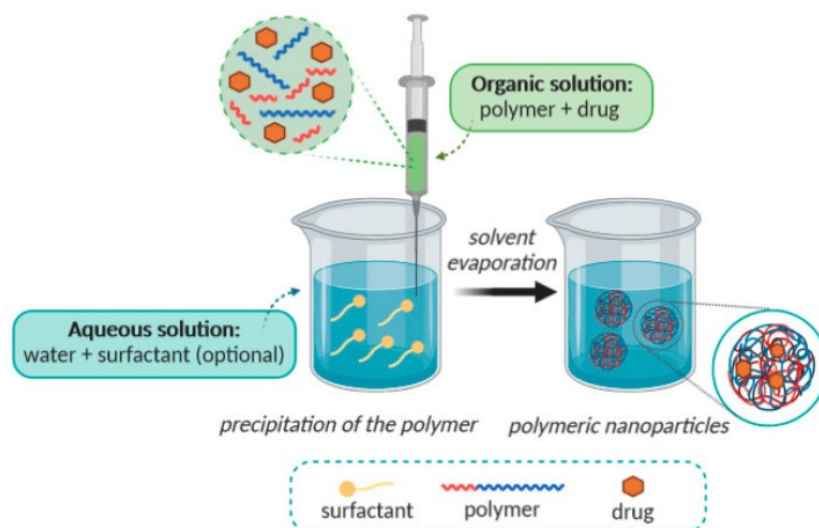


Obrázek 7: Metoda vysolování [8]

5.3.4 Nanoprecipitace

Tato metoda, označovaná též jako metoda vytěsnění rozpouštědla (Obrázek 8), vyžaduje dvě mísitelná rozpouštědla. [8] Základní princip této techniky je založen na mezifázovém usazování polymeru po vytěsnění organického rozpouštědla z organického roztoku do vodné fáze. Obecně se organická fáze přidává do vodné, ale způsob přípravy může být také obrácený, aniž by byla ohrožena tvorba nanočástic. Nejčastěji používaným organickým rozpouštědlem je aceton, protože je mísitelný s vodou a snadno se odstraňuje odpařováním. Lze však použít i etanol a směsi binárních rozpouštědel, jako je aceton s

malým množstvím vody, etanolu nebo metanolu. [10] Polymer se rozpustí s vodou mísitelným semipolárním rozpouštědlem a následně se přidává po kapkách do vodného roztoku za stálého míchání. Vzhledem k rychlé spontánní difúzi roztoku polymeru do vodné fáze se nanočástice tvoří okamžitě vytěsněním rozpouštědla. Jakmile rozpouštědlo difunduje z nanokapek, polymer se vysráží ve formě nanokapslí nebo nanosfér. Obvykle lze do procesu zahrnout povrchově aktivní látky, aby byla zaručena koloidní stabilita suspenze, ačkoli jejich přítomnost není nutná k zajištění tvorby nanočástic. Získané nanočástice se obvykle vyznačují dobře definovanou velikostí a úzkou distribucí velikosti, které jsou lepší než u částic vzniklých emulgačním postupem odpařováním rozpouštědla. Nanoprecipitace je metoda často používaná pro přípravu polymerních nanočástic o rozměrech kolem 170 nm. [8]



Obrázek 8: Metoda nanoprecipitace [8]

5.4 Charakterizace polymerních nanočástic

Charakterizace nanočástic je velice důležitá pro důkladné pochopení jejich vlastností a pro další vývoj ve farmaceutické nanotechnologii. Jednou z důležitých vlastností je velikost nanočástic. Ta je významná nejen při určování profilu uvolňování a způsobu degradace léčiv, ale také při určování účinnosti terapeutické látky v organismu z hlediska průniku do tkání a vstupu do buněk. Molekulová hmotnost polymeru ovlivňuje velikost nanočástic, účinnost enkapsulace a rychlost degradace polymeru. Kromě toho struktura řetězce a molekulární architektura odráží hydrofilitu nebo lipofilitu polymeru. Prodloužením délky řetězce pro biodegradovatelné polyestery jako je PLGA se zvyšuje lipofilita a snižuje se rychlost degradace polymeru. Z toho vyplývá, že změnou molekulové hmotnosti se rychlost degradace snižuje. Je důležité stanovit i fyzikální stav léčiva a polymeru, aby se určil vliv na vlastnosti uvolňování léčiva *in vitro* a *in vivo*. Zeta potenciál může ovlivnit stálost nanočástic a mukoadhezi, jakož i intracelulární obchodování s částicemi v závislosti na pH. Hydrofobicita určuje distribuci nanočástic v těle po jejich podání. Hydrofilní částice mají tendenci zůstat v krvi po delší dobu. [14, 51]

5.4.1 Velikost nanočástic a index polydisperzity

Velikost částic hraje klíčovou roli pro vlastnosti nanočástic, a proto je nezbytné tento parametr určit. Velikost a distribuce částic lze určit pomocí mnoha komerčně dostupných přístrojů.[15] Obecně platí, že polymerní nanočástice mohou dosahovat různých velikostí (5-1000 nm), v případě této práce byly ideálně v rozmezí 100 až 300 nm. Tato velikost je vhodná pro targeting do jaterních makrofágů k léčbě zánětlivých onemocněních.

Index polydisperzity (PDI) můžeme definovat jako rozložení velikostí jednotlivých částic ve vzorku. Jedná se o bezrozměrné číslo v rozmezí hodnot 0-1. Polydisperzita by měla být co nejnižší, v ideálním případě téměř nulová a distribuce velikosti unimodální. Pokud by hodnoty byly vyšší, přítomnost polydisperzního systému by mohlo vést k nežádoucím změnám vlastností těchto částic. [8, 16]

Velikost nanočástic lze měřit různými technikami, z nichž nejčastěji se používá dynamický (DLS) a statický (SLS) rozptyl světla, ale často se používá také elektronová mikroskopie jak transmisní (TEM) tak skenovací (SEM). Měření velikosti se může lišit v závislosti na použité metodě, například elektronová mikroskopie poskytuje obraz částice

izolované od okolí, zatímco DLS umožňuje stanovit hydrodynamický poloměr suspendovaných částic.

DLS je navíc důležitým doplňkem TEM, jelikož dokáže měřit větší rozměry a poskytuje informace o stavu agregace nanočástic v roztoku stanovením změn v distribuci velikosti částic. [8]

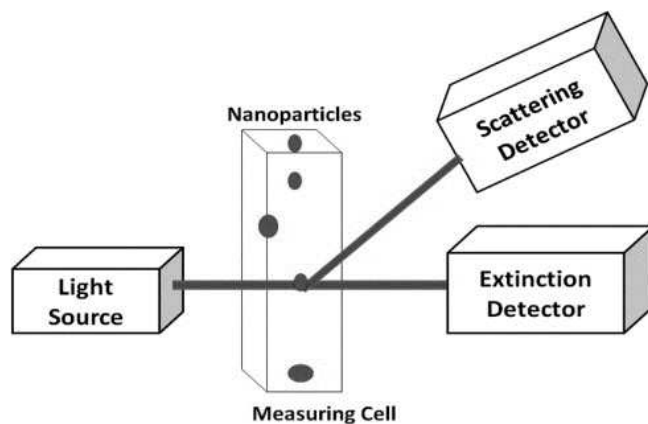
5.4.1.1 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla (DLS), nazývaný také fotonová korelační spektroskopie (PCS), je rychlá metoda pro stanovení střední velikosti, distribuce velikosti a indexu polydisperzity (PDI) vzorku. Tato metoda je dobře přizpůsobena pro rutinní měření. Na základě interakce se světlem se určí velikost nanočástic nebo molární hmotnost polymeru obvykle při pozorovacím úhlu 90°. [17] DLS využívá autokorelační spektroskopii rozptýleného monochromatického laserového světla ke stanovení jeho časově závislé fluktuaci, která je důsledkem Brownova pohybu částic v suspenzi. Intenzita světla rozptýleného pod daným úhlem je detekována fotonásobičem, jehož výstupní proud je přenášen do autokorelátoru, který určuje rychlost difúze nebo Brownova pohybu částic a analyzuje časovou závislost a tím i jejich velikost. [18]

Jednou z hlavních výhod DLS je, že poskytuje informace o celé populaci částic v krátké době trvání experimentu. Má však omezenou použitelnost při určování tvaru částic, protože DLS předpokládá, že všechny částice jsou kulovité povahy. Dalším úskalím mohou být větší částice, jelikož rozptylují více světla než menší částice, proto i malé množství agregátů nebo prachových částic může posunout distribuci velikosti částic k větším hodnotám. [10]

Výsledky je třeba interpretovat s určitým nadhledem, protože údaje mohou ovlivnit několik parametrů, jako je viskozita nebo pH suspenzního média, teplota, koncentrace a sedimentace částic. [17] Výsledná velikost nanočástic je obvykle objemově ekvivalentní nebo Stokesův průměr založený na intenzitě rozptýleného světla, což je hodnota získaná přímo z korelační funkce. [10] Metoda navíc nemusí být spolehlivá při analýze polydisperzních vzorků. Metoda DLS je určena pro koloidní částice, a proto není vhodná pro částice větší než 1 μm , s výjimkou případů, kdy se analyzuje unimodální populace s úzkou distribucí velikosti a pomalou rychlostí sedimentace. [17] Výsledky DLS by měly být doplněny zobrazovací technikou, jako je mikroskopie atomárních sil

(AFM) nebo TEM, což je užitečné při řešení nejasností spojených s oběma technikami. [10]



Obrázek 9: Typické uspořádání techniky rozptylu světla pro měření velikosti nanočástic [19]

5.4.1.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Mezi další mikroskopickou techniku pro charakterizaci tvaru a velikosti patří transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Jedná se o dvourozměrný obraz TEM a je vytvořen z elektronů prošlých vzorkem. Subnanometrové rozlišení TEM poskytuje informace o struktuře vnitřních částic nanonosičů a je velmi cenné pro měření polymerní stěny nanotobolek. Jednou z nevýhod TEM je, že ideální tloušťka vzorku by měla být < 100 nm. Kromě toho může u organických vzorků dojít k poškození struktury v důsledku lokálního zahřátí kinetickou energií elektronů absorbovanou vzorkem. Tento problém lze obejít použitím kryo-TEM, která zkoumá strukturu nanočástic ve zmrazeném hydratovaném stavu s minimálními úpravami vzorku. [10]

5.4.1.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) je široce používaná metoda pro zobrazování povrchů s vysokým rozlišením, kterou lze využít i k charakterizaci materiálů v nanorozměrech. SEM je schopna dosáhnout rozlišení až 1 nm. [20]

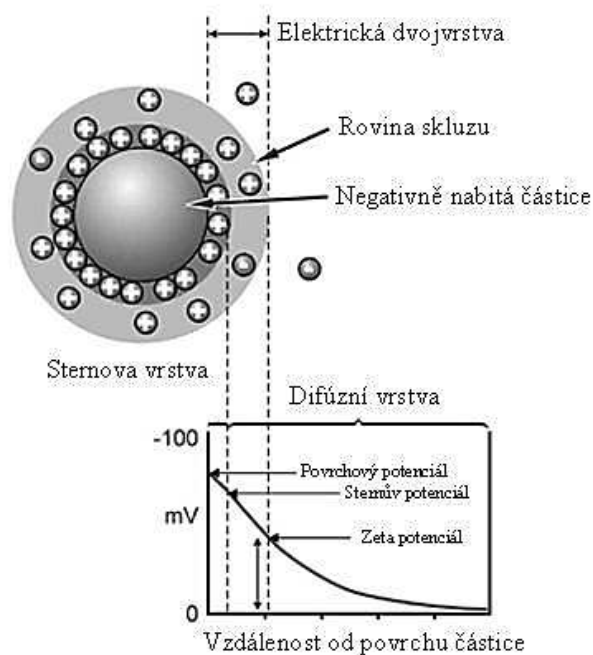
Jedná se o typ elektronového mikroskopu, který využívá svazek fokusovaných elektronů s relativně nízkou energií jako elektronovou sondu, která je pravidelně skenována nad vzorkem. Působením elektronového svazku stimuluje emisi vysokoenergetických zpětně rozptýlených elektronů a nízkoenergetických sekundárních elektronů z povrchu vzorku. [21]

SEM lze provozovat i v transmisním režimu, tj. technikou zvanou "transmisní skenovací elektronový mikroskop" (T-SEM). V transmisním režimu lze provádět pokročilou analýzu nanočástic. T-SEM umožňuje rychlé zkoumání tvaru nanočástic, i když jeho rozlišení je omezeno na nanočástice o velikosti do 5-10 nm. Pokud porovnáme TEM a SEM, tak TEM poskytuje snímky s lepší kvalitou, přičemž T-SEM lze snadno kombinovat s energeticko-disperzní rentgenovou analýzou (EDX) pro rychlou kontrolu velikosti a složení nanočástic. Hodoroaba a spol. dokázali, že zobrazení T-SEM poskytuje distribuci velikosti, která je o něco širší než distribuce získaná TEM. [20]

5.4.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál (ζ) (Obrázek 10) je definován jako elektrický potenciál mezi vnitřní difúzní vrstvou v blízkosti povrchu částice a objemovou kapalinou, v níž je částice suspendována. Je to parametr, který vyjadřuje náboj částice a udává potenciální stabilitu koloidního systému. [22] Je ovlivněn změnami na rozhraní s disperzním prostředím v důsledku disociace funkčních skupin na povrchu částic nebo v důsledku adsorpce iontových forem přítomných ve vodném disperzním prostředí a také solvatačním efektem. [8] Pokud mají všechny částice v suspenzi velký záporný nebo kladný zeta potenciál, mají tendenci se vzájemně odpuzovat a nemají tendenci k flokulaci. Pokud však mají částice nízké hodnoty zeta potenciálu a nebylo použito stabilizujících pomocných látek, pak neexistuje síla, která by zabránila jejich flokulaci. Hodnota zeta potenciálu je užitečná pro pochopení a předvídání interakcí mezi částicemi v suspenzi a je také důležitá pro buněčnou adhezi, která zase souvisí s vlastnostmi povrchového náboje. [22]

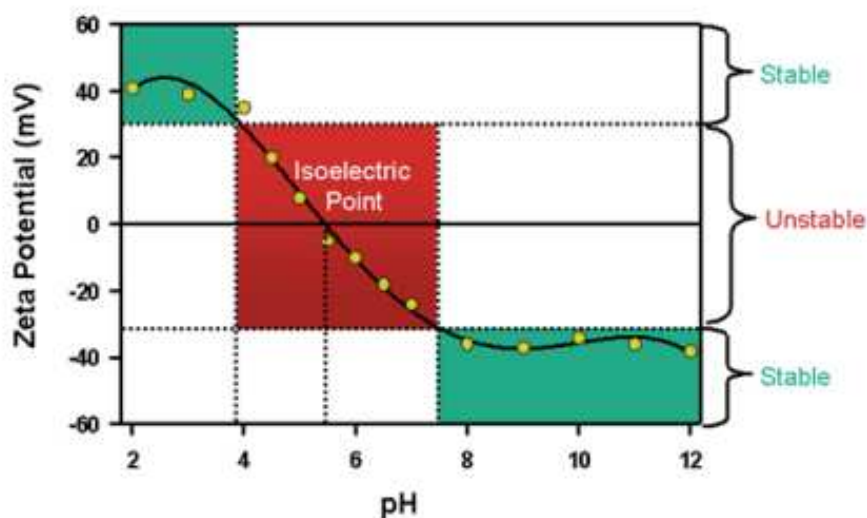
Tento parametr se určuje pomocí dopplerovské techniky měření rychlosti částic v závislosti na napětí, a zeta potenciál se tak vypočítá z elektroforetické pohyblivosti částic v příslušném rozpouštědle. Fosfolipidy, poloxamery a polymery jsou hlavními složkami polymerních nanočástic a po jejich přítomnosti ve formulacích jsou schopny ovlivnit zeta potenciál. Hodnota zeta potenciálu zaručující elektrostaticky zprostředkovanou stabilitu disperzí je uváděna jako $|30|$ mV. Odpuzivé síly mají tendenci bránit agregaci v důsledku občasných srážek se sousedními nanočásticemi. Zeta potenciál polymerních nanočástic lze tedy přizpůsobit pro konkrétní aplikaci zavedením povrchově aktivních látek nebo jiných povrchů, např. polyethylenglykolu (PEG) s různou molekulovou hmotností. [8]



Obrázek 10: Zeta potenciál [23]

Na rozdíl od velikosti částic nebo molekulové hmotnosti je zeta potenciál ovlivněn i dalšími faktory jako jsou například pH prostředí, konduktivita, koncentrace a formulace částic. Ve vodném prostředí je pH vzorku jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují zeta potenciál. Izoelektrický bod je hodnota pH roztoku, při které má amfoterní látka nulový náboj, a tedy nulovou pohyblivost v elektrickém poli. Je velmi důležitý z praktického hlediska. Obvykle je to bod, kde dochází nejpravděpodobněji k agregaci, a proto je koloidní systém nejméně stabilní.

Typický graf závislosti zeta potenciálu na pH je znázorněn na obrázku 11. V tomto příkladu je izoelektrický bod vzorku přibližně při pH 5,5. Kromě toho může graf předpovědět, že vzorek by měl být stabilní při hodnotách pH nižších než 4, jelikož je zde přítomen dostatečný kladný náboj a při hodnotách pH vyšších než 7,5, je zde přítomen dostatečný záporný náboj. Problémy se stabilitou disperze by se daly očekávat při hodnotách pH mezi 4 a 7,5, protože hodnoty zeta potenciálu se pohybují mezi +30 a -30 mV. [24]



Obrázek 11: Typický graf závislosti zeta potenciálu na pH, který ukazuje polohu izoelektrického bodu a hodnoty pH v zelených sektorech, kde by disperze měla být stabilní. [24]

5.4.3 Enkapsulační efektivita a drug loading

Pro takové částice, které se nejčastěji využívají ve farmacii tedy nosiče léčiv, je třeba charakterizovat i jejich schopnost zapouzdřit do sebe léčivou látku. Enkapsulační efektivita (EE %) je definována koncentrací zapouzdřeného materiálu (např. účinných látek, léčiv, vonných látek, proteinů, pesticidů, antimikrobiálních látek atd.) zjištěnou v přípravku v porovnání s počáteční koncentrací použitou k výrobě přípravku. V rámci diplomové práce se pracovalo s účinnou látkou kurkuminem. EE nám tedy udává, kolik procent celkového množství kurkuminu se enkapsulovalo do vytvořených nanočástic. [25]

Enkapsulační efektivita je vypočtena podle následující rovnice: [25]

$$EE [\%] = \frac{\text{celkové množství enkapsulovaného léčiva (mg)}}{\text{celkové množství léčiva přidaného původně během přípravy (mg)}} \times 100$$

Rovnice 1: Enkapsulační efektivita [25]

Dalším důležitým parametrem je drug loading (DL), který je kritickým parametrem při vývoji nanočástic s léčivem. Udává, kolik procent představuje enkapsulovaná účinná látka v nanočásticích a je definován následovně.

$$DL [\%] = \frac{\text{Enkapsulované množství léčiva (mg)}}{\text{celková hmotnost nanočástic (mg)}} \times 100$$

Rovnice 2: Drug loading [25]

EE a DL se obvykle stanovují pomocí vhodné analytické metody pro stanovení enkapsulované látky jako je například spektrofotometrie či HPLC. V diplomové práci probíhalo stanovení enkapsulovaného množství kurkuminu pomocí metody spektrofotometrie. Tato spektrální metoda je založena na měření intenzity záření, které je absorbováno homogenním roztokem zkoumané látky. Absorpce je závislá na vlnové délce, síle vrstvy, struktuře a koncentraci analyzované látky. Pro měření absorpčních spekter se používají dvoupaprskové registrační spektrofotometry. Spektrofotometr je přístroj, který se skládá vždy ze čtyř hlavních částí, jedná se o zdroj světla, monochromátor, zóna pro kyvetu se vzorkem a detektor dopadajících fotonů. Funkcí monochromátoru je propouštět na vzorek světlo pouze o konkrétní vlnové délce, nejčastěji se jedná o systém vstupní a výstupní štěrby mezi nimiž leží disperzní prvek. Vkládaná kyveta se vzorkem má standardizovaný rozměr 1 cm. Detektor zaznamenává fotony prošlé vzorkem a signál se pak díky převodnímu systému převádí na výslednou číselnou hodnotu. [26]

Před každým měřením je nutné vytvořit novou kalibrační řadu. Pomocí spektrofotometru je zjištěna absorbance při vlnové délce odpovídající maximu dané látky s použitím rozpouštědla jako slepého vzorku. Z hodnot absorbance se poté stanoví průměrná hodnota. Dále se vynese do grafu kalibrační křivka jako závislost průměrů absorbance na koncentraci dané látky, v našem případě kurkuminu v roztoku. Body kalibrační křivky se proloží přímkou a jsou popsány lineární funkcí a hodnotou spolehlivosti R^2 . Podle Lambert-Beerova zákona je poté z rovnice vypočítána koncentrace vzorků a z ní vypočtena dosažená hodnota EE a DL. [27]

5.5 Cílená distribuce nanočástic

Nanočástice lze využít k cílené distribuci léčiv neboli také targetingu. Cílenou distribucí se rozumí dodání léčivé látky a její uvolnění v místě působení bez dalších nespecifických interakcí. Cílená biodistribuce má hned několik výhod, dokáže zajistit místně specifické podání účinné látky, snížit podávané dávky, omezit systematické působení, prodloužit působení a chránit účinnou látku před metabolickou biodegradací. [28] Toho se využívá hlavně v terapii nádorových onemocnění.

Hlavním cílem targetingu chemoterapeutik na nádorové buňky je maximalizovat účinek na jejich usmrcení a minimalizovat vedlejší účinky. Vědci neustále hledají možnosti, jak vyvinout modifikace několika léčiv pomocí nanonosičů, které by selektivně zasáhly nádorové buňky. Nanočástice připojují nebo adsorbují léčivo na svůj povrch, čímž zvyšují schopnost cílení léčiva. Díky své malé velikosti mohou nanočástice také snadno proniknout do rychle rostoucí nádorové masy a mohou se v místě akumulovat, což umožňuje dostupnost léčiva po delší dobu. Cílení na nádorové buňky prostřednictvím nanočástic zahrnuje dva různé mechanismy, a to pasivní a aktivní targeting. [29]

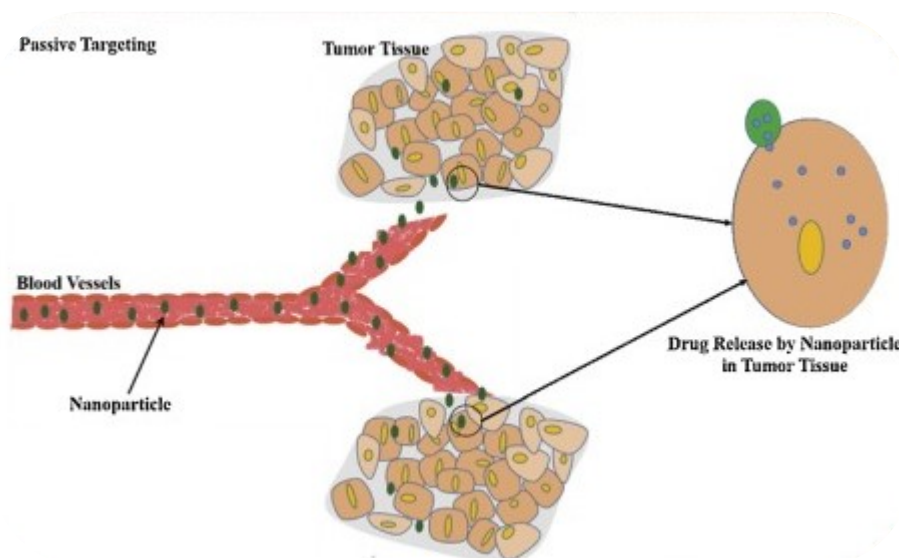
5.5.1 Pasivní targeting

Pasivní targeting (Obrázek 12) je založen na mechanismu, který využívá fyzikálně chemických vlastností nosiče, a tedy vlastních nanočástic pro specifickou biodistribuci. [30]

Nejčastěji se využívá tzv. efekt zvýšené permeability a retence (EPR). Je to vlastnost částic a molekul určitých velikostí jako jsou polymerní nanočástice vedoucí k akumulaci v nádorové tkáni. Tento efekt je charakterizován zvýšenou propustností krevních kapilár v postižených tkáních. Zánětlivá nebo nádorová tkáň má fenestraci kapilárního epitelu až 200-500 nm. Částice, které jsou menší, než je fenestrace cévního epitelu v místě nádoru jsou schopny extravazace právě ve tkáni se zvýšenou fenestrací. Díky absenci lymfatické drenáže pak dochází k retenci v nádorové tkáni. [28]

Pasivní targeting lze využít u nádorových onemocnění, kde závisí hlavně na fyziologických vlastnostech nádoru, které pomáhají při akumulaci nanočásticových systémů. Rychle rostoucí nádory se zvýšenou cévní propustností a s absencí lymfatické drenáže často vedou ke zlepšení účinnosti podávaných léčiv vzhledem EPR efektu nanosystémů u nádorových onemocnění. Tento efekt kromě menších částic (20-500 nm) napomáhá také akumulaci sloučenin s vyšší molekulovou hmotností uvnitř nádoru.

Pasivní targeting závisí především na velikosti nanočástic. Nanočástice v rozmezí velikostí 40-200 nm poskytují prodlouženou dobu cirkulace, zvýšenou akumulaci uvnitř nádorové tkáně a sníženou eliminaci nanočástic ze systému. Efekt EPR je hlavním cestou, jak se sloučeniny s molekulovou hmotností větší než 50 kDa jako jsou například konjugáty s protilátkami nebo polymerními nosiči spolu s nanočásticemi specificky akumulují v cílovém místě. [29]



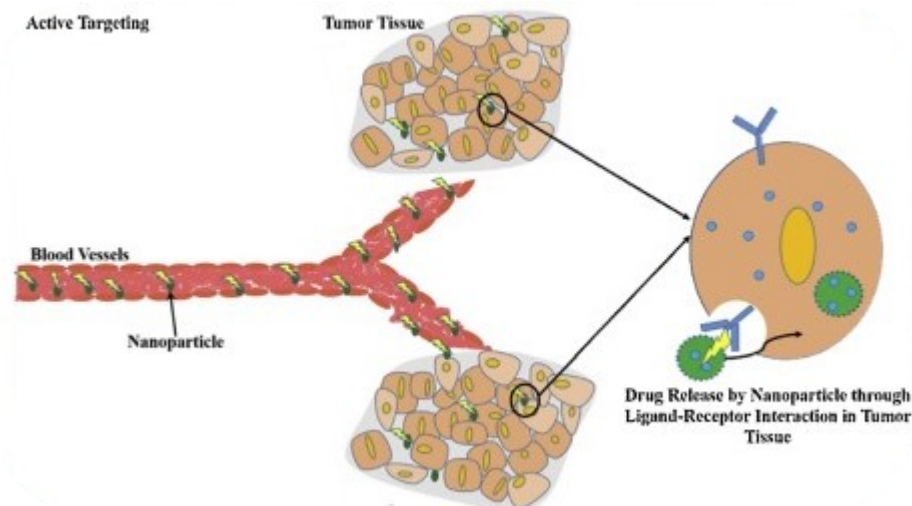
Obrázek 12: Pasivní targeting. Nanoléčiva hromadí se v nádorových tkáních prostřednictvím jedinečných patofyziologických vlastností nádorových cév. [29]

5.5.2 Aktivní targeting

Aktivní targeting (Obrázek 13) spočívá ve specifické interakci mezi cílicí molekulou a cílovou strukturou. [28] Využívá vysoce exprimovaných povrchových receptorů na cílových, typicky nádorových buňkách tím, že jsou nosiče dekorovány cílicími ligandy. Tyto ligandy se mohou snadno navázat na receptory exprimované na nádorových buňkách a mohou zprostředkovat navázání na buněčný povrch a akumulaci nanočástic uvnitř místa nádoru prostřednictvím endocytózy zprostředkované cílovými receptory. Poté se může léčivo uvolnit do cílové tkáně a dosáhnout terapeutického účinku. [29] Příkladem takových ligandů pro cílenou distribuci mohou být folátové receptory, protilátky a lektiny. [28]

Jedním z často používaných ligandů pro nádorová onemocnění je folátový receptor. Kyselina listová je nezbytná pro syntézu purinů a pyrimidinů a váže se na folátové receptory. Folátové receptory jsou exprimovány v malé míře u většiny fyziologických buněk, ale u nádorové tkáně jsou výrazně zvýšeny, v některých případech

až o dva řády. Po vazbě na receptor je nosič rychle dopraven do nitra buňky cestou receptorem zprostředkované endocytózy. Folátový receptor je nadměrně exprimován u rakoviny vaječníků, plic, mozku, hlavy a krku, ledvin a prsu. Tyto ligandy jsou široce využívány pro cílení pro jejich nízkou cenu, neimunogenitu, nízkou toxicitu, stabilitu a vysokou afinitu. [28, 31]



Obrázek 13: Aktivní targeting. Aktivní targeting umožňující vychytávání nanočástic prostřednictvím endocytózy zprostředkované receptory [29]

5.5.3 Biologické bariéry cíleného podání

Organismus je vybaven obrannými systémy pro odstranění neznámých objektů ze systému retikuloendoteliálního (RES) a mononukleárního fagocytického systému (MPS). [28]

Oponizace je proces, při kterém se cizí organismus nebo částice pokryje opsoninovými proteiny, čímž se z ní stane pro fagocytující buňky viditelnější. Po opsonizaci obvykle velmi rychle dojde k fagocytóze, což je pohlcení a případné zničení buněk nebo odstranění cizorodých látek z krevního oběhu. Společně tyto dva procesy tvoří hlavní clearance mechanismus pro odstraňování nežádoucích složek z krve. V případě polymerních nanočástic, které nemohou být normálně zničeny fagocyty, dochází obvykle k sekvestraci v orgánech MPS. Pokud polymerní nanočástice nejsou biologicky rozložitelné, může dojít ke kumulaci částic v těchto orgánech, nejčastěji v játrech a slezině a vést k toxicitě a dalším negativním vedlejším účinkům. [32]

5.6 Nanočástice v léčbě zánětlivých onemocnění

Zánět je hlavní proces, kterým tělo napravuje poškození tkáně a brání se proti cizorodým látkám. Akutní zánět je obvykle způsoben vnějším chemickým, mechanickým nebo patogenním působením, má relativně krátkou dobu trvání (hodiny až dny) a je nezbytným ochranným nástrojem. Chronický zánět nevyžaduje žádný vnější podnět a může způsobit řadu bolestivých a vysilujících příznaků. Makrofágové buňky jsou klíčovou složkou MPS a hrají řadu důležitých rolí v boji proti zánětu, včetně fagocytózy, prezentace antigenu a produkce antigenů, různých cytokinů a imunitních regulátorů. MPS obsahuje monocyty, které cirkulují v krvi a po dozrání se stávají makrofágy, které mohou dozrávat v celou řadu fenotypů. [33]

Příkladem takového zánětlivého onemocnění může být nealkoholická steatohepatitida (NASH), která je celosvětově nejčastější příčinou cirhózy a častým důvodem k transplantaci jater. Makrofágy jsou důležitou buněčnou složkou zánětlivého prostředí u NASH. Zánětlivé a profibrotické mediátory produkované makrofágy způsobují významné poškození tkání u mnoha zánětlivých onemocnění. Inhibice zánětlivých makrofágů by proto byla slibným přístupem ke zmírnění NASH. [34]

Právě pomocí nanočástic probíhá cílená biodistribuce přímo na makrofágy během zánětu a tím tak zabraňují dalšímu rozvoji onemocnění. Pomocí nich také dochází ke zlepšení biologické dostupnosti léčiv, ochraně léčiv před biodegradací a zvýšení absorpce. Kromě toho jsou nanočástice navrženy tak, aby se hromadily v požadované tkáni, jako jsou játra, snižovaly clearance léčiva, snižovaly akumulaci léčiva v jiných tkáních než v játrech a zvyšovaly buněčně specifické vylučování v játrech. [35]

Játra se skládají z hepatocytů, Kupfferových buněk (KC), sinusoidálních endoteliálních buněk (LSEC) a jaterních hvězdčovitých buněk (Itovy buňky, HSC). Kupfferovy buňky, rezidentní populace makrofágů v játrech, jsou známy tím, že fagocytují cizorodé částice. Většina nanočástic je v játrech obvykle vylučována Kupfferovými buňkami, které přednostně interagují s negativně nabitými nanočásticemi. Kupfferovy buňky jsou zodpovědné za imunitní a zánětlivé reakce a regulují jaterní onemocnění, včetně NAFLD (nealkoholické ztukovatění jater). Hepatocyty, což jsou specializované epitelové buňky, také interagují s nanočásticemi, byť v menší míře než makrofágy. Aktivují ostatní jaterní buňky a rovněž se podílejí na imunitních a zánětlivých reakcích. Na rozdíl od Kupfferových buněk se příjem nanočástic hepatocyty zvyšuje

s pozitivním zeta potenciálem. Jaterní endotelové buňky (LSEC) jsou specializované endotelové buňky, které tvoří rozhraní mezi krevními a jaterními buňkami. Otevřené fenestrace a absence bazální lamely LSEC vytvářejí síťovitou strukturu, která vede k zachycení větších částic v játrech. Hvězdicovité buňky jsou buňky ukládající tuk, které hrají klíčovou roli při fibróze jater. [35] Nacházejí se v perisinusoidálním prostoru, známý jako Disseův prostor. U zdravých jedinců ukládají v játrech vitamin A. V průběhu jaterního onemocnění podléhají diferenciaci na myofibroblasty, které jsou vysoce proliferativní a produkují velké množství proteinů. Příkladem takových proteinů může být kolagen typu I a III. To může vést k nadměrné produkci jaterní pojivové tkáně, označované jako fibróza, a ke snížení funkčnosti jater. [36]

Zánětlivé cytokiny uvolňované makrofágy (jako jsou KC) lze rozdělit do kategorií od prozánětlivých až po protizánětlivé. Po aktivaci makrofágů, tzv. polarizaci dochází k jejich diferenciaci na dva podtypy v závislosti na cytokinovém prostředí. Jedná se o prozánětlivé buňky M1 a protizánětlivé buňky M2. Změny v rovnováze mezi oběma podtypy se objevují u různých onemocnění. Makrofágy jsou typicky vychýleny směrem k podtypu M1 u prozánětlivých onemocnění, zatímco buňky M2 se objevují u rakoviny, alergie a v pozdních stádiích zánětu. Interleukin 1 β (IL1 β) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) jsou dva základní prozánětlivé cytokiny, které ovlivňují téměř každé zánětlivé onemocnění. Protizánětlivé cytokiny přímo potlačují prozánětlivé mediátory, nejdůležitější protizánětlivý cytokin interleukin 10 (IL10) potlačuje produkci IL6 a TNF- α . [36]

Makrofágy lokalizované v játrech (především KC) a jejich polarizace je klíčovým faktorem inzulinové rezistence a NAFLD/NASH. I když tedy v současné době neexistuje zavedená léčba, která by zvrátila NAFLD, vyvíjí se několik slibných postupů zaměřených na aktivaci a polarizaci KC v játrech u NAFLD. Právě polarizace makrofágů pomocí nanočástic směrem k M2 buňkám by mohlo být jedním z terapeutických cílů, který mohl vést k léčbě NAFLD. [36, 37]

5.6.1 NAFLD a NASH

Nealkoholické ztukovatění jater (NAFLD) zahrnuje celou řadu onemocnění od prosté steatózy přes nealkoholickou steatohepatitidu (NASH) až po fibrózu, která může nakonec vést k nevratné cirhóze. [38]

Na patogenezi NAFLD se podílí více faktorů. Ke vzniku NAFLD mohou přispívat geny, hormony a v neposlední řadě i výživa. Je prokázáno, že hromadění jaterního tuku souvisí s inzulínovou rezistencí, což vede k rozvoji steatózy. Patogeneze NAFLD a NASH (nealkoholické steatohepatitidy) je založena na teorii, která zahrnuje dva kroky. V první části dochází k akumulaci triglyceridů v játrech. Další krok, který může způsobit, že NAFLD přejde v závažné poškození jater, je zprostředkován několika faktory, včetně oxidačního stresu, cytokinů a mitochondriální dysfunkce. [35]

Jedním z hlavních znaků NAFLD, zejména NASH, je zvýšený oxidační stres a chronický zánět. Za klíčový prozánětlivý cytokin, který hraje zásadní roli při zprostředkování zánětu, je považován TNF α . Aktivace Kupfferových buněk cytokiny nebo poškozením hepatocytů dochází ke zvyšování exprese TNF- α a IL-6, což zvyšuje jaterní i systémové hladiny prozánětlivých faktorů cytokinů. Ty posilují zánět a inzulínovou rezistenci (IR) tukové tkáně i jater. [38]

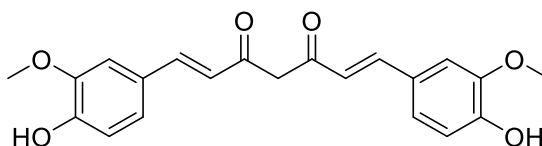
Jak už bylo zmíněno, dalším faktorem vedoucím k progresi NAFLD je oxidační stres. Oxidační stres a mitochondriální dysfunkce spolu úzce souvisejí a oba přispívají k poškození jater. Mitochondrie jsou hlavním místem tvorby volných radikálů v játrech. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou fyziologickými vedlejšími energetickými produkty z rozkladu glukózy a β -oxidace volných mastných kyselin (FFA) a jsou kontrolovány endogenním systémem vychytávání radikálů. Avšak ve stavu inzulínové rezistence (IR) dochází ke zvýšení přísunu FFA do hepatocytů, což vede ke vzniku ROS, které jsou mimo kontrolu inzulínu endogenních antioxidantů. ROS pak aktivují zánětlivé dráhy prostřednictvím stimulované produkce TNF- α a iniciují peroxidaci lipidů, která je škodlivá pro mitochondrie a která způsobuje buněčnou smrt buď signalizací apoptózy, nebo podporou nekrózy. Právě apoptóza hepatocytů způsobená peroxidací nadbytečných triglyceridů je kritickým krokem při progresi od prosté steatózy k NASH a cirhóze. [38]

5.7 Kurkumin

V rámci diplomové práce se v experimentální části pracovalo s účinnou látkou kurkuminem. Kurkuma (*Curcuma longa*), také známá jako „*Curcuma domestica*“, je trvalá bylina z čeledi zázvorníkovité (*Zingiberaceae*). Má více než 300 aktivních komponent, mezi ně patří látka zvaná kurkumin získaná z kořene, pro kterou je typickým rysem žlutý nebo oranžový pigment. Jedná se o hlavní biologicky aktivní složku tvořící základ pro léčivé vlastnosti této rostliny. [39]

Kurkumin (Obrázek 14) je lipofilní molekula s fenolovými skupinami a konjugovanými zdvojenými vazbami polyfenolového charakteru. Vysoká lipofilní vlastnost kurkuminu může napomoci jeho průniku lipidovou strukturou membrány. Velmi nízká rozpustnost kurkuminu ve vodě však vede k jeho nízké biologické dostupnosti. [40, 41]

Ze strukturního hlediska se v molekule nachází dva aromatické kruhové systémy obsahující o-methoxyfenolové skupiny spojené sedmiuhlíkatým řetězcem tvořeným α,β -nenасыcenou β -diketonovou částí. Diketo skupina vykazuje keto-enolový tautomerismus, což znamená, že kurkumin může existovat v rovnovážném stavu mezi keto a enolovým tautomerem. [42] V neutrálním nebo kyselém prostředí převládá ketoforma a v zásaditém prostředí převažuje konzistentní enolová forma. [43] Studie nukleární magnetické rezonance (NMR) provedené na různých rozpouštědlech však dospěly k závěru, že enolová forma kurkuminu je v podstatě jedinou formou této molekuly v roztoku. [42]



Obrázek 14: Struktura kurkuminu

Teplota tání kurkuminu se pohybuje v rozmezí 176-177 °C. [44] Kurkumin je termolabilní látka, která se po dlouhodobém působení mikrovlnného záření rozkládá. [45] Má relativně nízkou toxicitu a je obecně považován za bezpečný. [44]

Je to vysoce pleiotropní molekula, u které byla poprvé prokázána antibakteriální aktivita v roce 1949. Od té doby se ukázalo, že tento polyfenol má protizánětlivé, hypoglykemické, antioxidační, hojivé a antimikrobiální účinky. [46] Jak už bylo řečeno, kurkumin vykazuje antioxidační aktivitu a inhibuje takové mediátory zánětu jako cyklooxygenázu-2 (COX-2), lipooxygenázu (LOX) a inducibilní syntázu oxidu

dusnatého. Jeho pozitivní účinky u nemocí (Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida, cirhóza jater či rakovina) jsou dány inhibicí transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) a fibrinogeneze. Z výše uvedeného plyne, že kurkumin by při cíleném podání do jaterní tkáně mohl mít pozitivní vliv na vývoj onemocnění jako je NASH [40]

5.7.1 Polymerní nanočástice jako nosiče kurkuminu

Pomocí polymerních nanočástic byla zaznamenána lepší perorální biologická dostupnost kurkuminu zapouzdřeného nanočásticemi PLGA. Xie a spol. [3] vyrobili metodou odpařování rozpouštědla nanočástice PLGA s obsahem kurkuminu (CUR-PLGA-PN) o velikosti částic přibližně 200 nm. Obsah léčiva činil 5,75 % a účinnost enkapsulace byla 91,96 %. Kromě toho byla rozpustnost CUR-PLGA-PN 4,35 mg/ml, což bylo mnohem více než rozpustnost volného kurkuminu (6,79 $\mu\text{g/ml}$). Ve farmakokinetické studii *in vivo* byly potkanům perorálně podávány CUR-PLGA-PN a volný kurkumin v dávce 100 mg/kg. Výsledky ukázaly, že PLGA nanočástice zlepšují perorální biologickou dostupnost kurkuminu 5,6krát a mají delší poločas ve srovnání s volným kurkuminem. Autoři se domnívali, že lepší perorální biologická dostupnost souvisí se zvýšenou rozpustností ve vodě, vyšší rychlostí uvolňování, lepší absorpcí a prodlouženou dobou pobytu v gastrointestinálním traktu. [3]

6 Experimentální část

6.1 Použité přístroje

- Analytické váhy Ohaus Discovery (Ohaus, Greifensee, Švýcarsko), max. 210g, d=0,1mg)
- Centrifuga (MPW 260R, Medical Instruments, Polsko)
- Dialyzační membrána Dialysis tubing Fisher brand, Fisher Scientific (Hampton, USA) – MWCO 6000
- Magnetická míchačka Variomag telesystem, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Mini Vortexer (Heathrow Scientific, USA)
- Pipety Finnpiptette F2, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Spektrofotometr Specord 205 (Jena Analytik, Německo)
- Třepací vodní lázeň GFL 1083, GFL (Burgwedel, Německo)
- Ultrazvuková sonda Microspitze MS73 (Bandelin Electronic, Německo)
- Váhy Kern 440-53N (Kern, Německo) max. 400 g, d = 0,01 g
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Spojené Království)

6.2 Použité suroviny

- Aceton (Penta, ČR)
- Čištěná voda (připravená reverzní osmózou, FaF UK)
- DMSO (Penta, ČR)
- Ethylacetát (Penta, ČR)
- Kurkumin (Merck, ČR)
- Kopolymer **PLGA A2** větvený na 2% kyselině polyakrylové – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (1:1), $M_w = 14400$ g/mol) (FaF UK, Katedra farmaceutické technologie, doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.)
- Lineární kopolymer **PLGA 5/5**, Purasorb® PDLG 5002A – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (1:1), $M_w = 17000$ g/mol) (Corbion, Holandsko)
- Lineární kopolymer **PLGA E 5/5**, Purasorb® PDLG 5002E – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (1:1), $M_w = 17000$ g/mol) (Corbion, Holandsko)
- Lineární kopolymer **PLGA 7/3**, Purasorb® PDLG 7502A – (kyselina mléčná:kyselina glykolová (75:25), $M_w = 17000$ g/mol) (Corbion, Holandsko)

- Poloxamer 407, Pluronic® F-127 (Merck, Německo)
- Polyvinylalkohol (Merck, ČR)
- Polysorbát 20, Tween® 20 (Merck, Německo)

6.3 Použité metody

6.3.1 Příprava nanočástic-metoda nanoprecipitace

6.3.1.1 Příprava vodné fáze

Příprava vodné fáze spočívala v rozpuštění surfaktantu v čištěné vodě. Nejprve se na analytických vahách navážil surfaktant, konkrétně se jednalo o Pluronic® F127 či Polyvinylalkohol do odměrné baňky. Navážený surfaktant se doplnil čištěnou vodou na požadovanou koncentraci (Pluronic® F127 0,1%, PVA 1% roztok). Takto připravený roztok se nechal míchat v digestoři na magnetické míchačce při laboratorní teplotě do úplného rozpuštění. Po kompletním rozpuštění se doplnila odpařená voda do původní hmotnosti.

6.3.1.2 Příprava organické fáze

Organická fáze se připravila rozpuštěním účinné látky (kurkumin) a polymeru v příslušném rozpouštědle. Nejprve se do vialek na analytických vahách navážil kurkumin o hmotnosti 30 mg a polymer o hmotnosti 1,5 mg pomocí kopistky. Do vialek bylo následně přidáno 2 ml acetonu pomocí pipety a následně rozpuštěno v ultrazvukové lázni. V pozdějším experimentu se měnila organická fáze, kde se využívala směs solventů acetonu a etanolu v poměrech AC: EtOH (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5).

6.3.1.3 Proces nanoprecipitace

Automatickou pipetou do 10 ml vodné fáze (vzorek A, B v duplikátech), která se míchala na magnetické míchačce, bylo v jednom kroku napipetováno 1 ml organické fáze. Okamžitě došlo k vytvoření zákalu či opalescence způsobené vzniklými nanočásticemi. Kádinka s obsahem surové nanosuspenze byla umístěna v digestoři, kde za stálého míchání (300 ot./min) během alespoň 1,5 hodin došlo k úplnému odpaření organického rozpouštědla. Po odpaření organického rozpouštědla byla nanosuspenze přefiltrována pomocí stříkačkového filtru o velikosti pórů 1,2 µm. V tomto kroku bylo nutné se vyvarovat bublinám, aby nedocházelo k ucpání filtru. Následně se takto přefiltrované vzorky alikvotně rozdělily do 4 mikrozkušavek (celkem 16 vzorků).

6.3.2 Příprava nanočástic-Emulzní odpařovací metoda

6.3.2.1 Příprava vodné fáze

Jelikož výsledky byly nepatrně lepší po předchozích experimentech s Pluronicem® F127 0,1%, tak se pro tuto metodu využíval právě tento surfaktant. Roztok surfaktantu byl připraven navážením a rozpuštěním v potřebném množství čištěné vody. Takto připravený roztok se nechal míchat v digestoři na magnetické míchače při laboratorní teplotě do úplného rozpuštění. Po kompletním rozpuštění se doplnila odpařená voda do původní hmotnosti.

6.3.2.2 Příprava organické fáze

Organická fáze se připravila rozpuštěním účinné látky (kurkumin) a polymeru v etylacetátu. Nejprve se do vialek na analytických vahách navážil polymer o hmotnosti 30 mg a kurkumin o hmotnosti 1,5 mg. Navážený polymer a kurkumin byl v čase potřeby rozpuštěn v 1 ml etylacetátu.

6.3.2.3 Proces ultrasonifikace

Nejprve se připravila kádinka, kam bylo pomocí automatické pipety přeneseno 5 ml vodné fáze. Ta byla následně umístěna na magnetickou míchačku v digestoři a byla míchána za laboratorní teploty. Do druhé kádinky se přeneslo rovněž 5 ml vodné fáze. Do této vodné fáze také přidal 1 ml organické fáze a tím došlo k vytvoření surové emulze. Následně byla použita ultrazvuková vysokofrekvenční sonda k vytvoření energie. Sonifikace probíhala v rozmezí 80 % výkonu přístroje po dobu 1 minuty za chlazení na ledové lázni. Takto vzniklá nanoemulze se přidala ke zbylým 5 ml vodné fáze v digestoři a byla míchána do odpaření organického rozpouštědla. Další kroky byly totožné s předchozí metodou (6.3.3.1).

6.3.3 Centrifugace

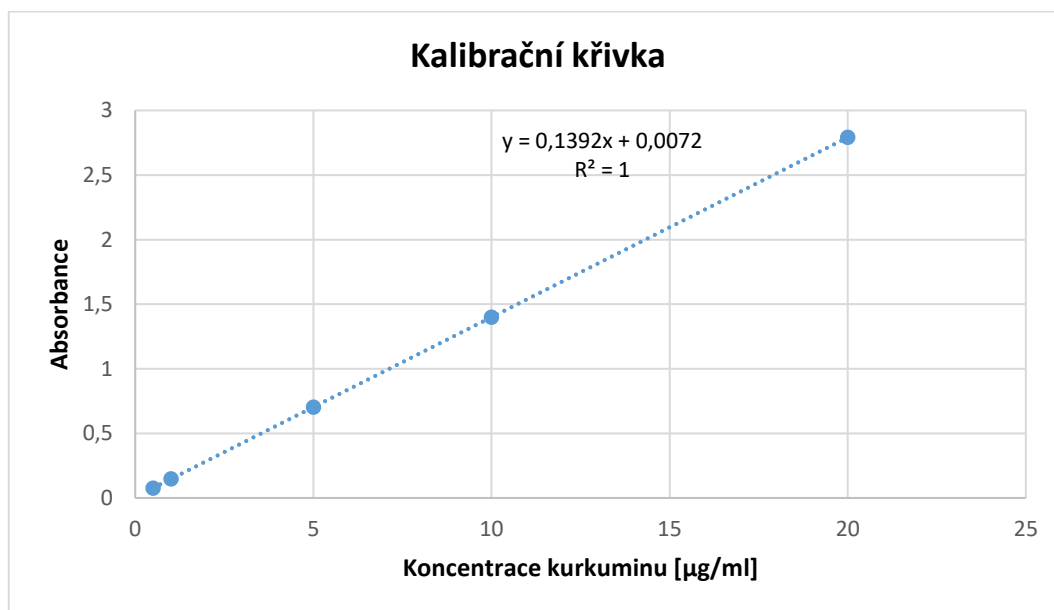
Mikrozkumavky se rozdělily do centrifugy vždy naproti sobě, poté se upevnil rotor šroubem a byly nastaveny parametry: rotor 11461, RCF 21 000, teplota: 21 °C, čas: 15 min. Po ukončení centrifugace byly vzorky opatrně vyjmuty. Na vzorcích bylo patrné, že došlo k oddělení vzniklých nanočástic (sediment na dně mikrozkumavky a supernatant). Supernatant jsme opatrně pomocí automatické pipety odsály tak, aby nedošlo ke smísení se sedimentem na dně mikrozkumavky. Zbylý sediment se následně vortexoval a rozpustil v DMSO 1,5 ml. Poté se vzorek zředil v poměru 1:10 DMSO. Takto připravený vzorek se změřil na spektrofotometru.

6.3.4 Kvantifikace enkapsulovaného kurkuminu

Před samotným měřením byla sestavena kalibrační křivka pomocí spektrofotometru s použitím DMSO jako slepého vzorku. Nejprve se navážil kurkumin a přidáním DMSO se připravila kalibrační řada, která obsahovala následující body kalibrační křivky:

Tabulka 1: Body kalibrační křivky, různé koncentrace kurkuminu v DMSO

Vzorek	Koncentrace kurkuminu v DMSO ($\mu\text{g/ml}$)	A
1	0,5	0,07603
2	1	0,14782
3	5	0,70233
4	10	1,39901
5	20	2,79132



Graf 1: Kalibrační křivka, různé koncentrace kurkuminu v DMSO při 434,5 nm

Po zředění suspenze nanočástic, jak bylo popsáno v předchozím bodě (viz centrifugace), byl vzorek přenesen do borosilikátové kyvety a na spektrofotometru byla změřena absorbance. Měření probíhalo při absorpčním maximu roztoku kurkuminu v DMSO,

jednalo se o hodnotu 434,5 nm. Naměřené hodnoty absorbance se dosadily do rovnice kalibrační křivky a poté byla odečtena hodnota koncentrace kurkuminu v supernatantu ($\mu\text{g/ml}$). Výpočtem pak bylo zjištěno celkové množství enkapsulovaného kurkuminu v nanočásticích.

$$y = 0,1392x + 0,0072$$

Rovnice 3: Vztah mezi absorbancí kurkuminu v DMSO změřený při vlnové délce 434,5 nm a jeho koncentrací, kde y je naměřená absorbance a x je koncentrace enkapsulovaného kurkuminu

Následně byly vypočítané hodnoty enkapsulační efektivity (EE) a drug loadingu (DL).

$$EE [\%] = \frac{\text{enkapsulované množství kurkuminu}}{\text{celkové množství léčiva přidaného původně během přípravy (mg)}} \times 100$$

Rovnice 4: Vzorec pro výpočet EE

$$DL [\%] = \frac{\text{Enkapsulované množství léčiva (mg)}}{\text{celková hmotnost nanočástic (mg)}} \times 100$$

Rovnice 5: Vzorec pro výpočet DL

6.3.5 Měření velikosti a PDI

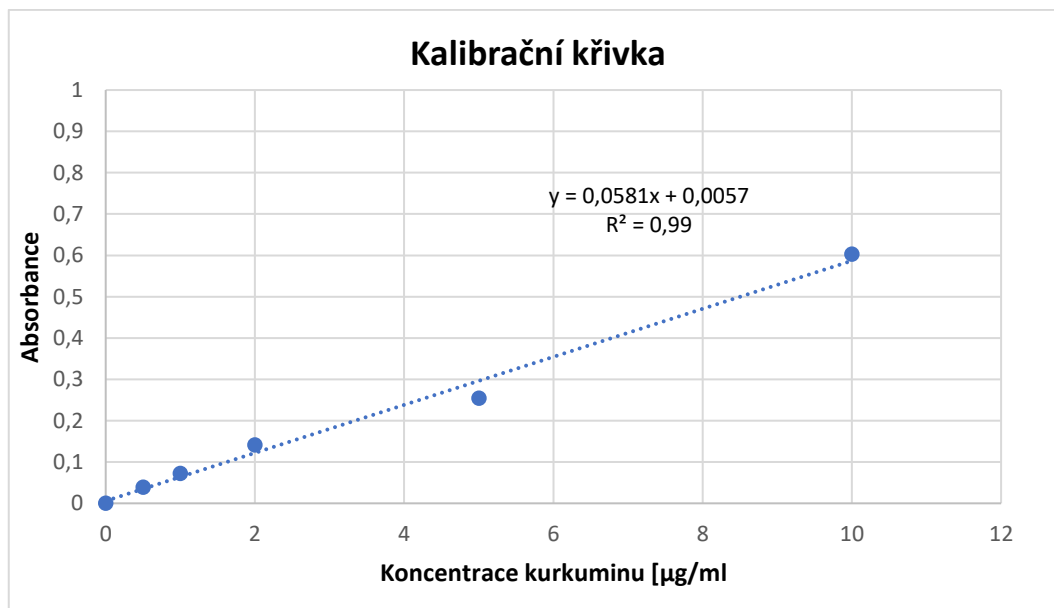
K měření velikosti částic a PDI byl použit přístroj Zetasizer. Za pomoci automatické pipety bylo do plastové kyvety přeneseno 100 μl vzorku a následně tento vzorek byl naředěn čištěnou vodou do celkového objemu 1 ml. Kyveta byla umístěna do přístroje výrobcem doporučeným způsobem a vzorek byl proměřen. Intenzita rozptýleného světla byla detekována pod úhlem 173° . Velikost a PDI nanočástic byly vypočítány podle distribuce velikosti na základě intenzity rozptýleného světla. Viskozita disperzního média byla nastavena jako viskozita čištěné vody. Každé měření bylo opakováno třikrát.

6.4 Disoluce

Příprava nanočástic probíhala totožně jako v předchozích metodách. Nejprve se připravila vodná fáze (čištěná voda, Pluronic® F127), která se nechala míchat v digestoři. Pro přípravu organické fáze se použily dva typy polymerů PLGA E 5/5 a PLGA 7/3. Po odpaření acetonu následovala filtrace vzorků pomocí stříkačkového filtru o velikosti pórů 1,2 μm . Připravené vzorky se rozdělily do mikrozkušavek stejným dílem. Následovala centrifugace a promytí čištěnou vodou, která probíhala ve dvou cyklech. První purifikace probíhala po dobu 15 minut, RCF 8 000, při 15°C. Následovalo odebrání supernatantu za pomoci automatické pipety, který se následně opět centrifugoval při RCF 10 000 po dobu 15 minut. Opět se odebral supernatant tak, aby nedošlo k poškození sedimentu. Do každé mikrozkušavky se sedimentem bylo napipetováno disoluční médium 0,5 % složené z čištěné vody a Tweenu 20, který v tomto experimentu plnil roli solubilizátoru pro uvolněný kurkumin.

Takto připravené duplikáty (celkem 4 vzorky) byly vpraveny pomocí automatické pipety do dialyzační membrány (10 cm), která byla následně zalepena pomocí akrylátového lepidla. Připravené membrány byly vloženy do lékovek, kam se napipetovalo 10 ml disolučního média a následně byly vloženy do třepací lázně vyhřáté na teplotu 37 °C.

V průběhu disoluce byly pipetou odebírány vzorky o objemu 2 ml v předem stanovených časech – 0,5 hodiny, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 8 hodin, 18 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin. Po odebrání celého objemu disolučního média ve stanoveném čase se objem znovu doplnil čistým disolučním médiem pro zachování sinkových podmínek. Tento postup se opakoval u každého stanoveného času až do posledního času odebrání (72 hodin). Vzorky byly následně hodnoceny spektrofotometricky při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu roztoku kurkuminu v disolučním médiu ($\lambda = 424 \text{ nm}$).



Graf 2: Kalibrační křivka, různé koncentrace kurkuminu v 0,5% roztoku Tweenu při 424 nm

Pro výpočet byla použita rovnice:

$$y = 0,0581x + 0,0057$$

Rovnice 6. kde x je hodnota koncentrace kurkuminu v µ/ml a y představuje hodnotu absorbance.

7 Výsledky a diskuze

V rámci praktické části byly připraveny polymerní nanočástice s enkapsulovaným kurkuminem. K přípravě nanočástic se používaly čtyři typy polymerů, které jsou popsány níže. Při přípravě nanočástic byla využita metoda nanoprecipitace a emulzní odpařovací metoda. Během experimentální části se pracovalo s konstantní hmotností PLGA (30 mg), tak i kurkuminu (1,5 mg).

Nejprve se připravily nanočástice pomocí metody nanoprecipitace. V první části byly nanočástice složené z organické fáze za využití acetonu jako rozpouštědla a z vodné fáze, která se v průběhu přípravy měnila. Konkrétně se zde zkoumal vliv použitého surfaktantu, zejména se jednalo o Pluronic® F127 0,1% a Polyvinylalkohol (PVA) 1%. V další části se soustředilo na vliv organické fáze, kde se k původnímu acetonu (AC) přidal i etanol (EtOH) a jako stabilizátor zde byl použit PVA 1%. Pracovalo se s různými poměry AC: EtOH (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5). K přípravě těchto nanočástic byl využit pouze PLGA A2, který vykazoval nejlepší hodnoty EE a DL.

Další metodou přípravy nanočástic byla emulzní odpařovací metoda. Zde byl použit k přípravě pouze surfaktant Pluronic® F127 0,1% a etylacetát jako rozpouštědlo, opět se pracovalo se všemi kopolymery PLGA.

V poslední části byl proveden disoluční test, kde byly použity tyto dva kopolymery: PLGA 7/3 a PLGA E 5/5. Disoluce probíhala po dobu 72 hod a hodnotilo se kolik kurkuminu z částic se uvolní za jednotku času. Každý vzorek byl připraven v duplikátech a výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota těchto dvou měření. Hlavní srovnávané parametry byla EE a DL, velikost a PDI a disoluční profil.

7.1 Nanočástice připravené pomocí metody nanoprecipitace

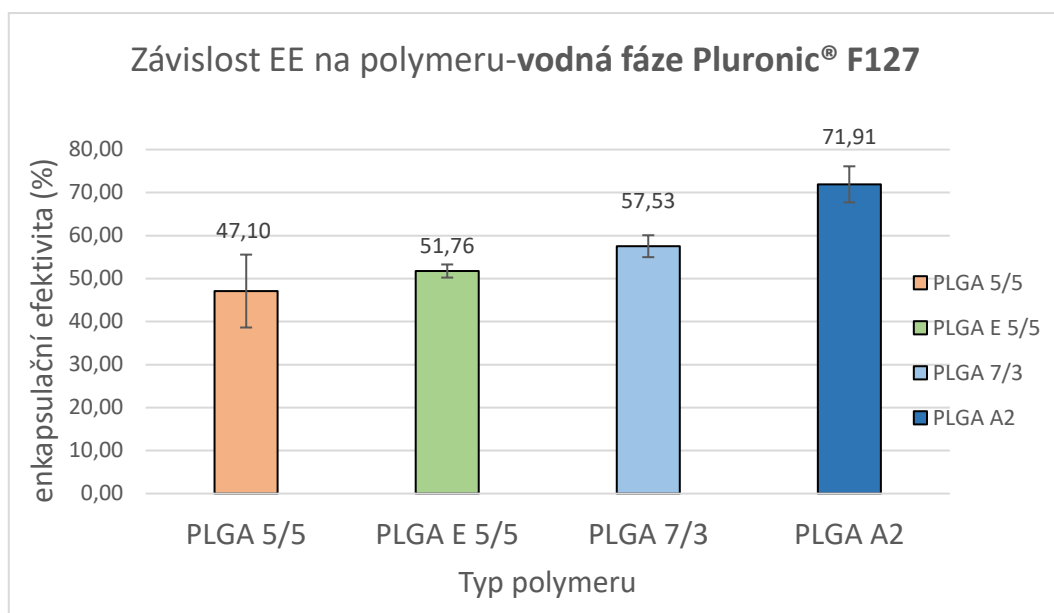
Pomocí metody nanoprecipitace se porovnávaly celkem čtyři typy PLGA s různým poměrem kyseliny mléčné (LA) a kyseliny glykolové (GA), kde se v průběhu experimentů měnila jak vodná fáze, tak i organická fáze. V první části šlo zejména o porovnání nanočástic s různým typem polymeru a také zkoumání vlivu zvoleného surfaktantu na parametry (EE, DL, PDI a velikost). V další části se zaměřilo na vliv organické fáze, kde se kombinovala směs solventů, konkrétně směs acetonu a etanolu. Během těchto experimentů byly použity všechny čtyři typy kopolymerů (PLGA E 5/5, PLGA 5/5, PLGA A2 a PLGA 7/3).

Cílem bylo najít vhodné podmínky pro další přípravu nanočástic. Zvolit tedy takové rozpouštědlo a stabilizátor, jež by vykazovaly vhodnou velikost pro targeting do jaterních makrofágů (100–300nm) a index polydisperzity by dosahoval téměř nulových hodnot. A najít vhodný kopolymer PLGA, který by poskytl nanočástice s maximální EE a zároveň s co možná nejvyšší hodnotou DL, aby byla zajištěna terapeutická efektivita.

7.1.1 Nanočástice připravené za přítomnosti surfaktantu Pluronic® F127- sledování vlivu PLGA

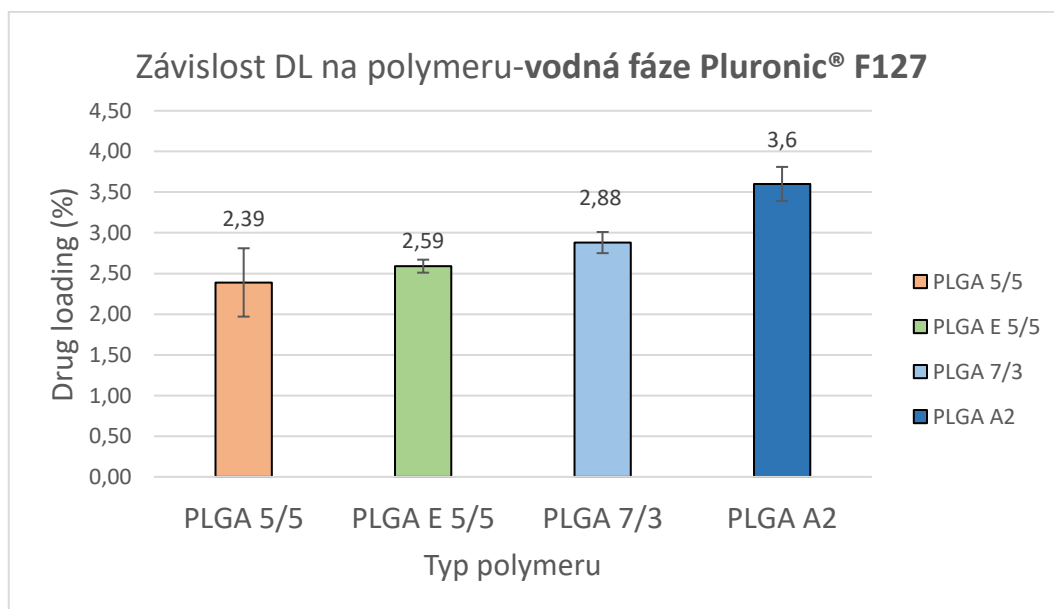
Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny v grafech 3–5 a tabulce 2. Nejprve byly připraveny vzorky o stejném hmotnostním poměru mezi kurkuminem a PLGA (w/w) 5 %. V průběhu přípravy nanočástic byla hmotnost PLGA (30 mg) a kurkuminu (1,5 mg) konstantní. Nanočástice byly připraveny za pomoci surfaktantu Pluronicu® F127. Zde se konkrétně zkoumal vliv zvoleného PLGA na určované parametry.

a) Enkapsulační efektivita



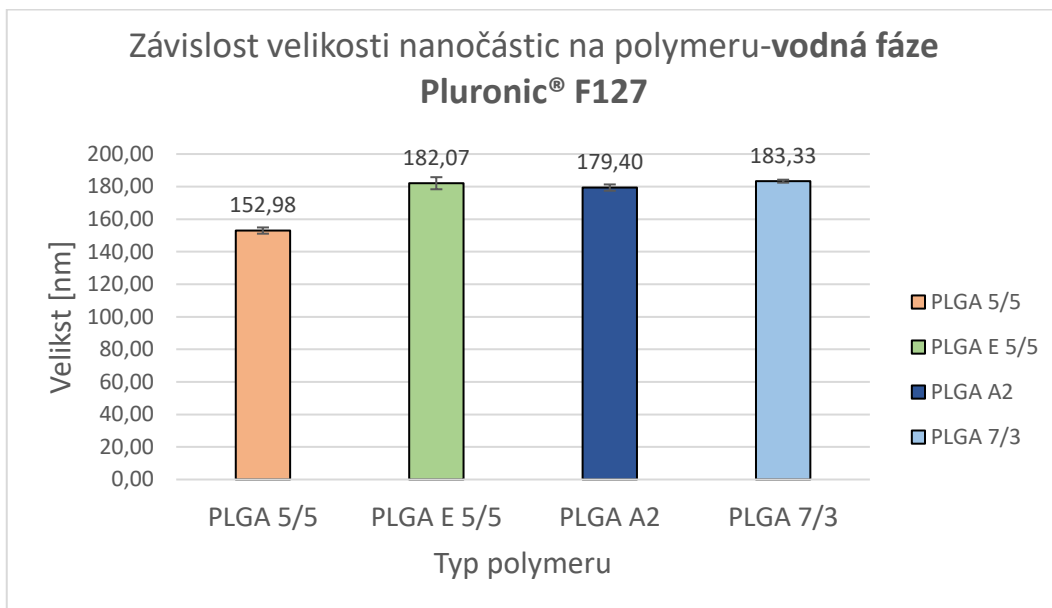
Graf 3: Metoda nanoprecipitace, závislost EE na použitém typu polymeru za využití Pluronicu® F127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

b) Drug loading



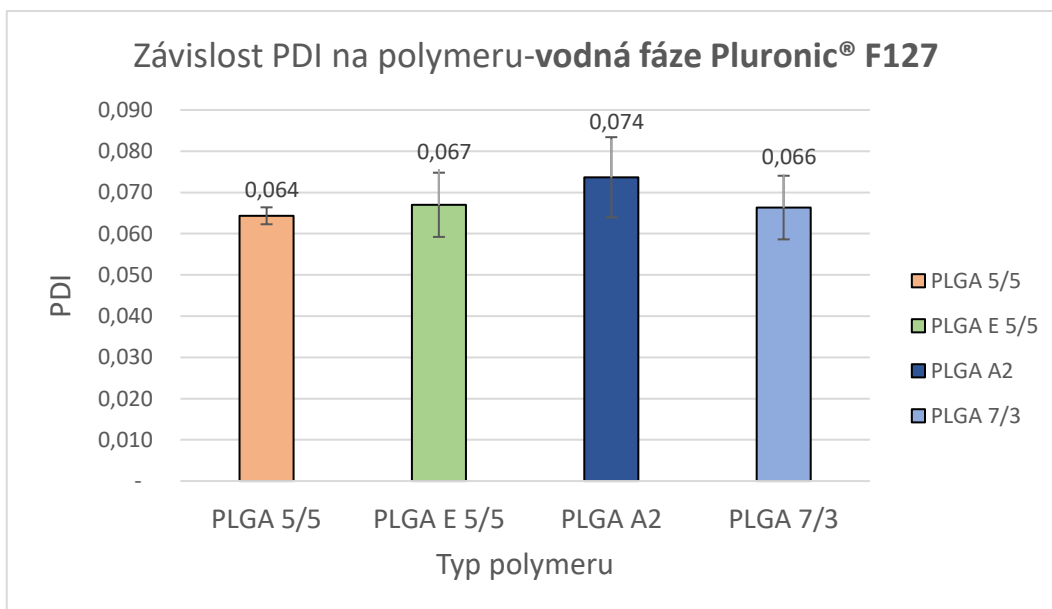
Graf 4: Metoda nanoprecipitace, závislost DL na použitém typu polymeru za využití Pluronicu® F127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

c) Velikost



Graf 5: Metoda nanoprecipitace, závislost velikosti nanočástic na použitém typu polymeru za využití Pluronicu® F127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

d) PDI



Graf 6: Metoda nanoprecipitace, závislost PDI na použitém polymeru za využití Pluronicu® F127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

7.1.1.1 Hodnocení parametrů (Velikost, PDI, EE, DL)

Tabulka 2: Výsledky zkoumaných parametrů, metoda nanoprecipitace, surfaktant Pluronic® F127

Kopolymer	Velikost (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)
PLGA 5/5	152,98	0,064	47,10	2,39
PLGA E 5/5	182,07	0,067	51,76	2,59
PLGA 7/3	183,33	0,066	57,53	2,88
PLGA A2	179,40	0,074	71,91	3,6

Z uvedené tabulky 2 a grafu 5 vyplývá, že velikost nanočástic je v rozmezí 153-183 nm. Vhodná velikost nanočástic pro targeting do jaterních makrofágů činí 100-300 nm, což výsledné hodnoty splňují.

PDI je měřítkem rovnoměrnosti distribuce velikosti částic. Hodnota PDI blízka 0 označuje homogenní disperzi, zatímco hodnota PDI blízka 1 popisuje zcela heterogenní disperzi. Hodnoty PDI všech nanočástic byly nízké ($<0,1$), což svědčí o úzké distribuci velikosti částic. [47]

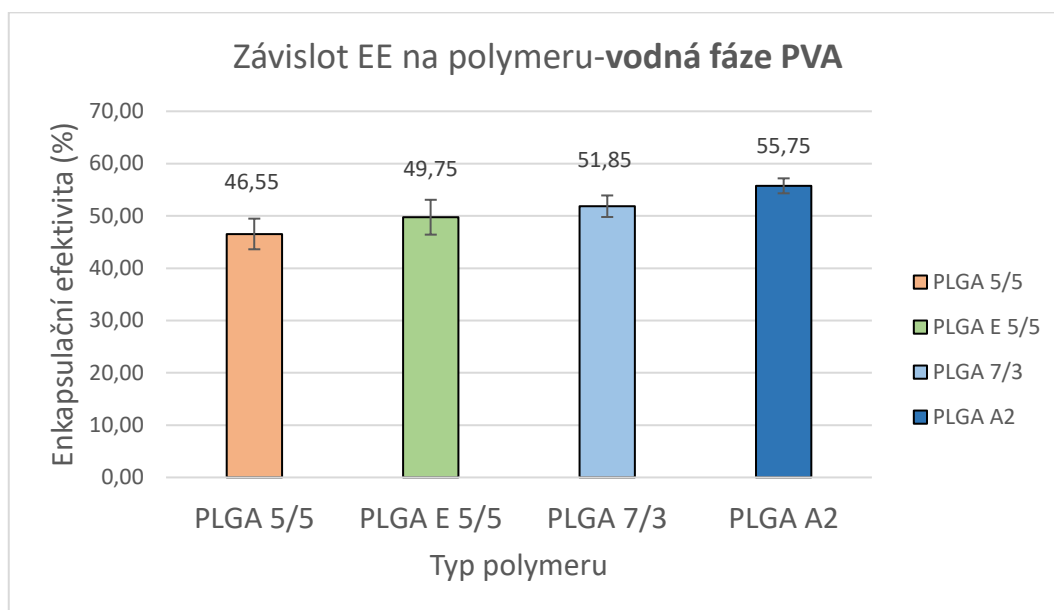
Nejvyšší hodnotu EE dosahoval PLGA A2, která činila 71,91 %. To může být dáno strukturou PLGA A2, která je rozvětvená na kyselině polyakrylové a tím může zadržet více účinné látky ve svých intra- a intermolekulárních prostorách. Také PLGA 7/3 dosahoval vysokých hodnot EE (57,53 %). Jedná se o lipofilní polymer, který obsahuje v poměru 75:25 (LA:GA). Nejmenších hodnot EE dosahoval PLGA E 5/5 a PLGA 5/5. Z uvedených výsledků můžeme usoudit, že je zde spojitost mezi silně lipofilní účinnou látkou, tedy kurkuminem a lipofilitou PLGA. Vzhledem k tomu, že i výsledky PLGA kopolymerů s ekvimolárním množstvím obou monomerů dosáhly z hlediska enkapsulační efektivity uspokojivých výsledků, zdá se, že stěžejní vlastností pro enkapsulaci léčiv typu kurkuminu je struktura, molekulární architektura a molární hmotnost použitého nosiče.

Také u DL můžeme pozorovat vyšších hodnot u PLGA A2 (3,6 %) a naopak nejnižší hodnoty dosahoval kopolymer PLGA 5/5 (2,39 %), to může být zapříčiněno opět strukturou daného polymeru a jeho nižší afinitou ke kurkuminu, jak je popsáno výše.

7.1.2 Nanočástice připravené za přítomnosti surfaktantu PVA-sledování vlivu PLGA

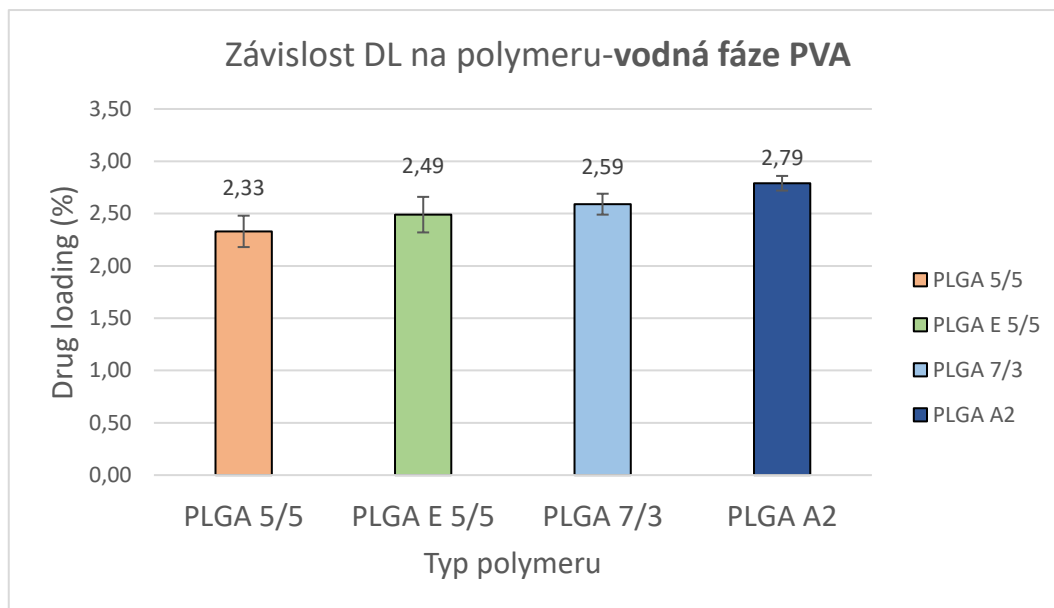
V této kapitole jsou prezentovány výsledky, kde se měnila vodná fáze. Namísto Pluronicu® F127 byl využit Polyvinylalkohol (PVA) 1% (w/v) jako stabilizátor ve vodné fázi. Porovnávaly se opět stejné typy PLGA jako v předchozím experimentu. V následující části jsou uvedeny grafy 7-10 s hodnotami zkoumaných parametrů.

a) Enkapsulační efektivita



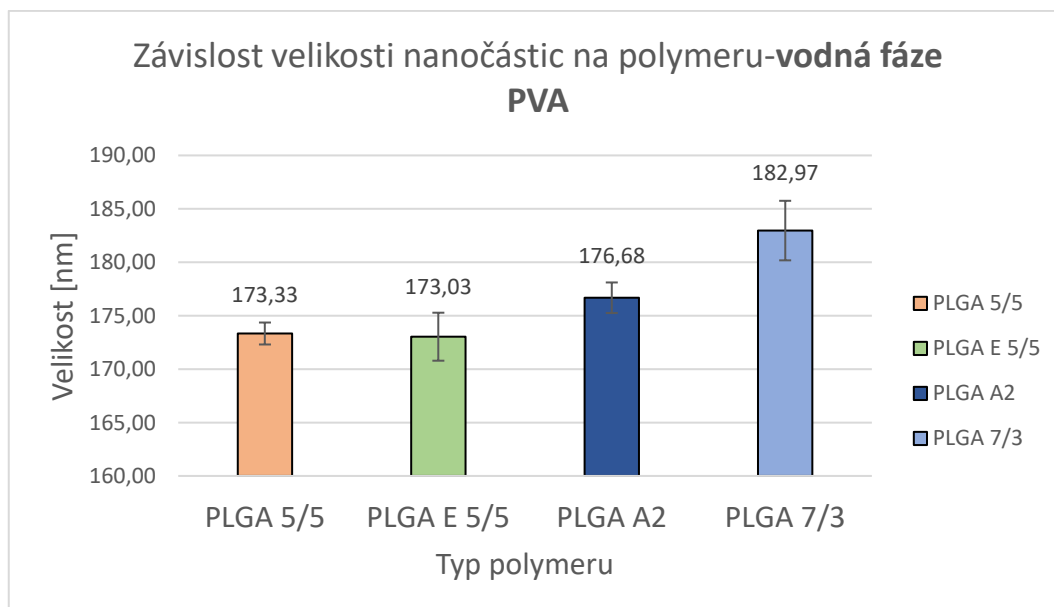
Graf 7: Metoda nanoprecipitace, závislost EE na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

b) Drug loading



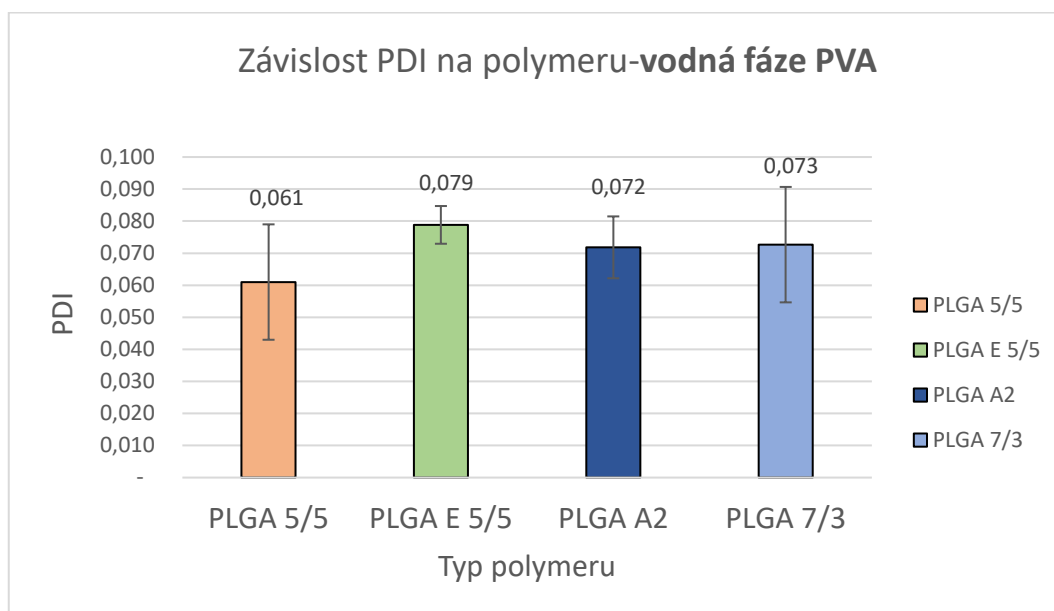
Graf 8: Metoda nanoprecipitace, závislost DL na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

c) Velikost



Graf 9: Metoda nanoprecipitace, závislost velikosti nanočástic na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

d) PDI



Graf 10: Metoda nanoprecipitace, závislost PDI na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

7.1.2.1 Hodnocení parametrů (Velikost, PDI, EE, DL)

Tabulka 3: Výsledky zkoumaných parametrů, metoda nanoprecipitace, surfaktant PVA

Kopolymer	Velikost (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)
PLGA 5/5	173, 33	0,061	46, 55	2, 33
PLGA E 5/5	173, 03	0,079	49, 75	2, 49
PLGA 7/3	182, 97	0,073	51, 85	2, 59
PLGA A2	176, 68	0,072	55, 75	2, 79

Z výsledků, které jsou zobrazené v tabulce 3 můžeme konstatovat, že velikost nanočástic se pohybuje v rozmezí 170–180 nm. Tato velikost je výhodná pro terapii NAFLD, jelikož částice mohou být kumulovány v makrofázích MFS v játrech. Index polydisperzity (PDI) se pohyboval v rozmezí 0,061–0,079. Tyto hodnoty jsou žádoucí, PDI by se měl blížit k co nejnižším hodnotám, což svědčí o monodisperzní populaci částic.

Dalším důležitým hodnoceným parametrem je enkapsulační efektivita. Z uvedené tabulky 3 a grafu 7 je zřejmé, že kopolymer PLGA A2 opět dosahoval nejvyšších hodnot EE (55,75 %). To je zapříčiněno strukturou PLGA A2, která je rozvětvená a tím pádem může zadržet více kurkuminu ve svých intra- a intermolekulárních prostorech. Vysokých hodnot dosáhl i kopolymer PLGA 7/3 (51,85 %), což lze odůvodnit vyšší lipofilitou tohoto kopolymeru. Nejmenších hodnot nabývaly kopolymery s ekvimolárním množstvím obou monomerů, tedy PLGA 5/5 (46,55 %) a PLGA E 5/5 (49,75 %). Z uvedených výsledků můžeme usoudit, že se zde opět projevuje spojitost mezi silně lipofilním kurkuminem a lipofilitou PLGA. Také rozvětvenost PLGA hraje významnou roli ve výsledných hodnotách EE. Výsledky v tomto experimentu do značné míry korelují s těmi, které byly získány pro nanočástice připravené za použití Pluronic® F127. Závěrem můžeme říci, že výsledky EE všech čtyř kopolymerů jsou uspokojivé (pohybují se okolo 50 %), ale přesto zde můžeme popsat rozdíly v hodnocených parametrech, ty mohou být dány strukturou a molekulární hmotností daného PLGA.

Hodnoty DL vykazují stejný trend jako u hodnot EE, kdy nejvyšších hodnot dosahuje PLGA A2, a naopak nejnižších hodnot dosahuje PLGA 5/5. Z výsledků experimentu lze usoudit, že v korelaci s hodnotami EE, nejvyšších DL hodnot nabýval

kopolymer PLGA A2. To je dáno nepravidelnou strukturou jeho molekul s větším množstvím mezimolekulárních prostor.

7.1.3 Porovnání nanočástic za využití surfaktantů: Pluronic® F127, PVA

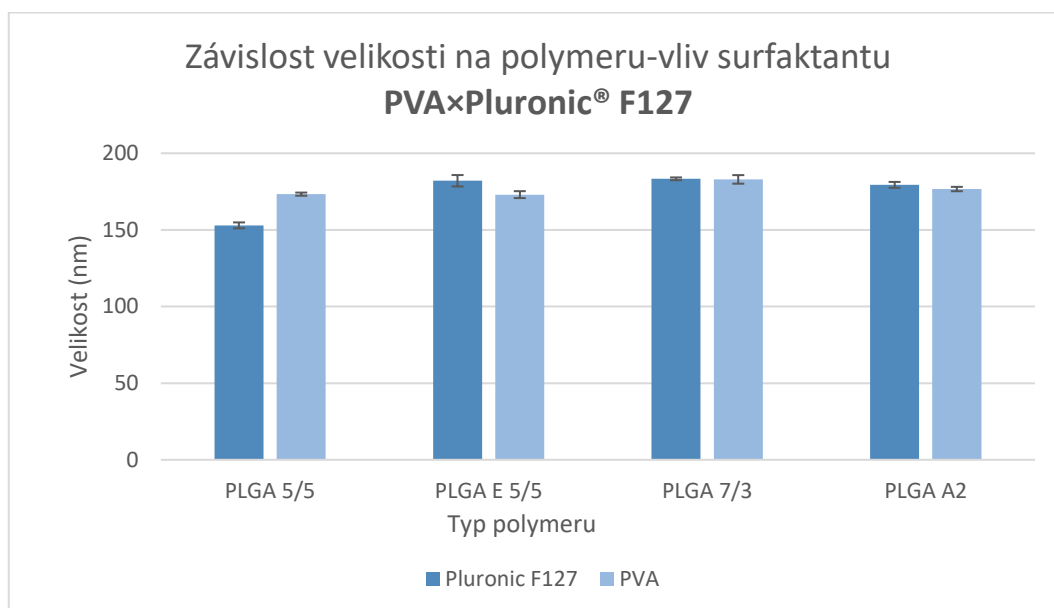
Zde se konkrétně zaměříme na vliv zvoleného surfaktantu na vlastnosti nanočástic. Při nanoprecipitaci působí jako stabilizátory vodné fáze. Jak už bylo zmíněno, během přípravy se používal Pluronic® F127 0,1% a PVA 1%.

Naším cílem bylo zvolit, co nejvýhodnější surfaktant a polymer pro další přípravu nanočástic. V následující tabulce 4 a v grafech 11–14 je shrnutí všech zjišťovaných parametrů za využití metody nanoprecipitace.

Tabulka 4: Metoda nanoprecipitace, shrnutí výsledků, Pluronic ® F127×PVA

Parametry	EE (%)		DL (%)		Velikost (nm)		PDI	
	Pluronic	PVA	Pluronic	PVA	Pluronic	PVA	Pluronic	PVA
PLGA 5/5	47,1	46,55	2,39	2,33	152,98	173,33	0,064	0,061
PLGA E 5/5	51,76	49,75	2,59	2,49	182,07	173,03	0,067	0,079
PLGA A2	71,91	55,75	3,6	2,79	179,4	176,68	0,074	0,072
PLGA 7/3	57,53	51,85	2,88	2,59	183,33	182,97	0,066	0,073

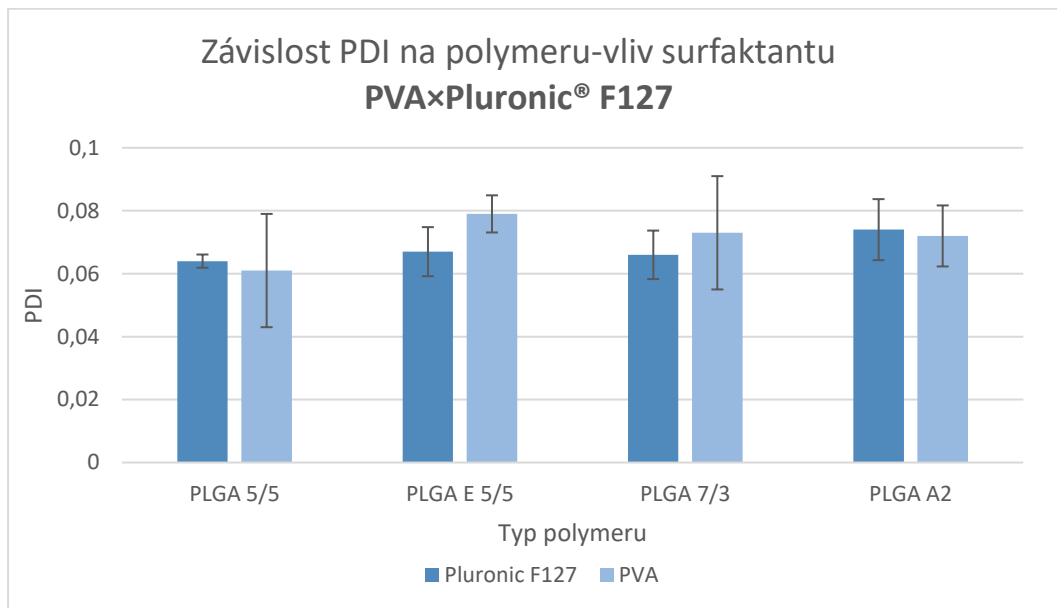
a) Velikost



Graf 11: Závislost velikosti na polymeru vliv surfaktantu PVA×Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace

Během přípravy nanočástic se používal roztok surfaktantu k tomu, aby docházelo k vytvoření adekvátně velkých částic s nízkou hodnotou PDI. Z uvedeného grafu je patrné, že výsledné velikosti se nijak zásadně neliší a daný surfaktant nemá velký vliv na velikost částic. Velikost molekul je teda zřejmě determinována použitou metodou, koncentrací polymeru, rychlostí přidávání organické fáze do vodné a použitým rozpouštědlem, jak ve své práci popsala Daniela Kozáčková. [27]

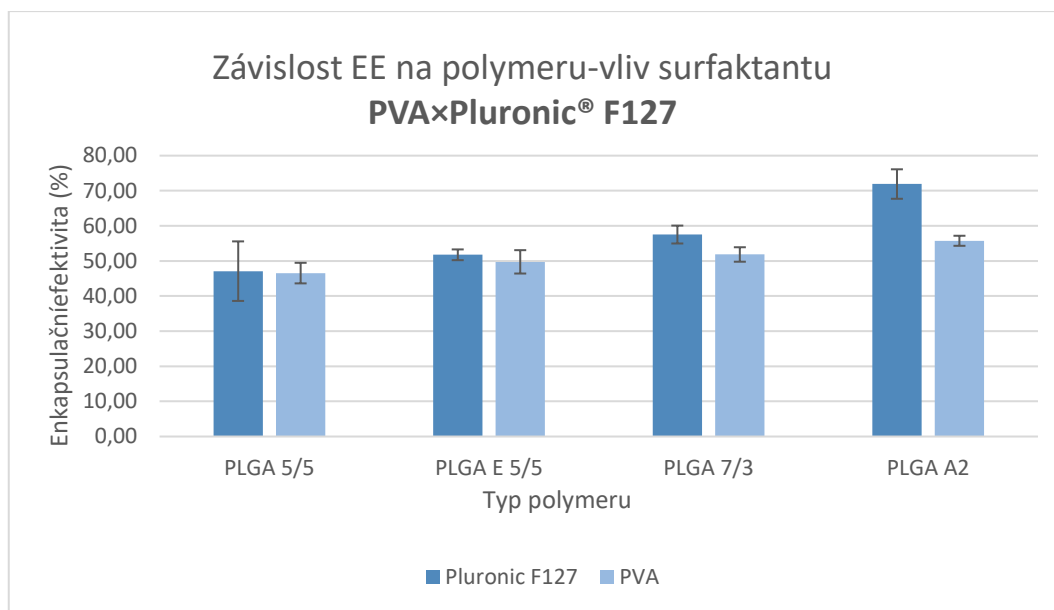
b) PDI



Graf 12: Závislost PDI na polymeru vliv surfaktantu PVA×Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace

Výsledky ukazují, že dané surfaktanty nevykazují rozdílné hodnoty PDI. Základním požadavkem bylo dosáhnout hodnot pod 0,2, aby nanočástice byly monodisperzní, což splňují oba dva surfaktanty. Výsledky jsou ve shodě s dostupnou literaturou, kde se např. Murakami a kolektiv popsali, že metoda nanoprecipitace je charakteristická unimodální populací výsledných částic [52].

c) Enkapsulační efektivita

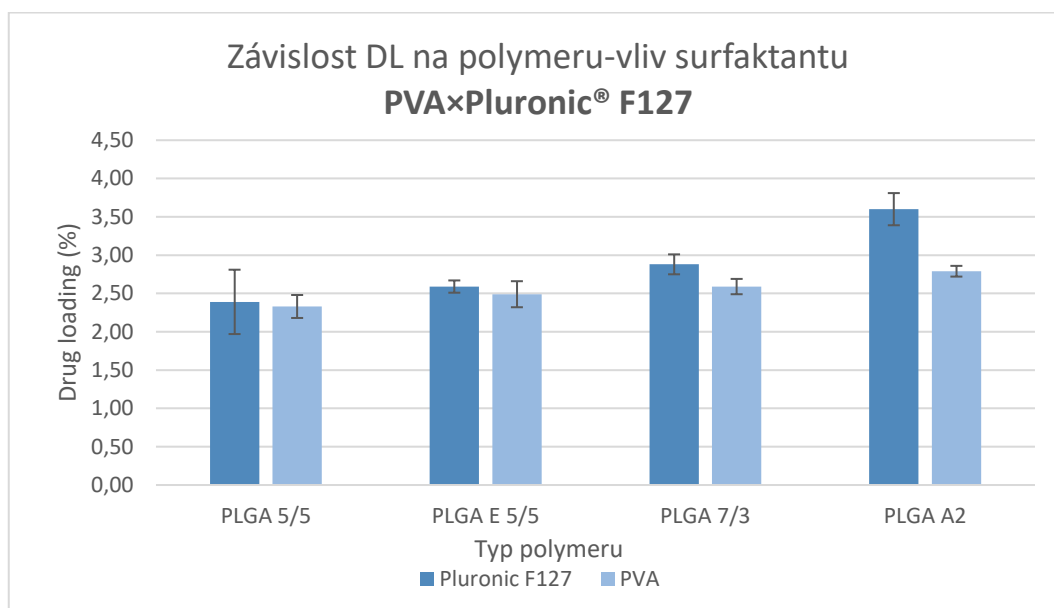


Graf 13: Závislost EE na polymeru vliv surfaktantu PVA×Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace

Jedním z nejdůležitějších zjišťovaných parametrem byla enkapsulační efektivita, která je definována koncentrací zapouzdřené účinné látky, v případě této práce kurkuminu, zjištěnou ve finální formulaci, v porovnání s počáteční koncentrací použitou k přípravě částic.

Pokud se zaměříme na výběr surfaktantu, můžeme konstatovat pouze nevýznamné rozdíly ve výsledcích za využití PVA 1% a Pluronicu® F127 0,1%. Výjimkou jsou výsledky dosažené s větveným polymerem PLGA A2, kde bylo za použití Pluronicu® F127 dosaženo významně vyšších hodnot EE (Graf 13) Vyšších hodnot enkapsulační efektivita nabýval surfaktant Pluronic® F127 u všech typů PLGA oproti PVA. Nicméně lze konstatovat, že volba stabilizátoru se nezdá být z hlediska EE klíčovým parametrem pro přípravu kurkuminem medikovaných nanočástic.

d) Drug loading



Graf 14: Závislost DL na polymeru vliv surfaktantu PVA a Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace

Drug loading je parametr, který je definován poměrem hmotnosti enkapsulované účinné látky a hmotnosti nanočástic. Nejlepší výtěžnost můžeme vidět u PLGA A2 za využití Pluronicu® F127. Co se týká porovnání dvou surfaktantů použitých v této práci, tak opět nelze konstatovat markantní rozdíly v hodnotách. Obecně však vyšších hodnot EE a DL dosahoval surfaktant Pluronic® F127.

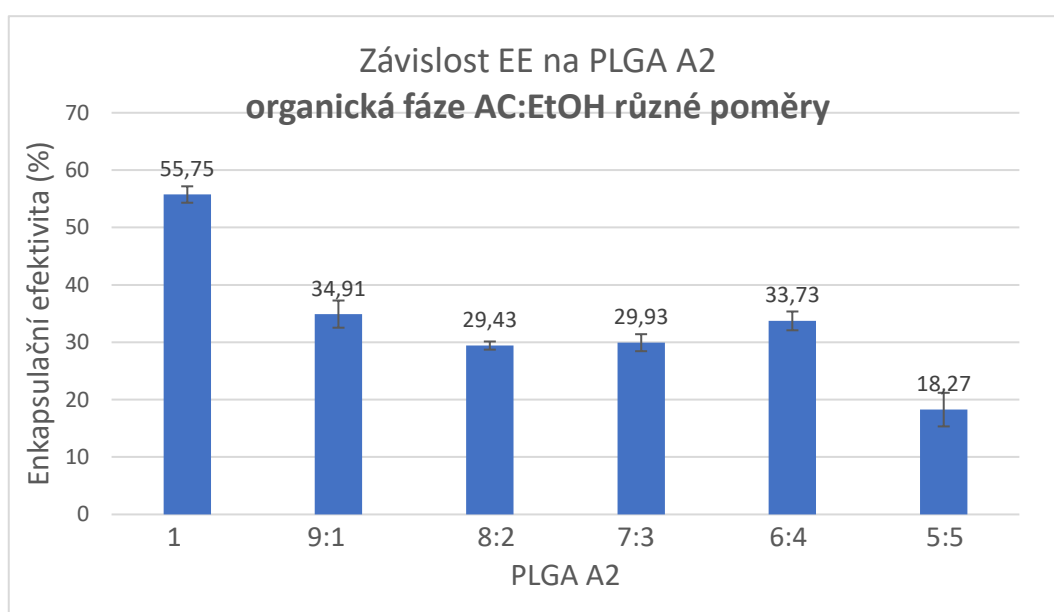
Z publikované práce, kde byly rovněž připraveny nanočástice s enkapsulovaným kurkuminem za použití kopolymeru PLGA A2 a acetonu jako organické fáze a kde se zaměřovalo na porovnání druhu a koncentrace surfaktantu vyšlo, že vyšších hodnot EE dosahovaly nanočástice za použití 0,1% Pluronicu® F127 (20,1 %) než za využití 1% PVA (18,3%). Rozdíly ve výsledných hodnotách jsou rovněž minimální, to nám potvrzuje fakt, že volba stabilizátoru se nezdá být z hlediska EE klíčovým parametrem pro přípravu kurkuminem medikovaných nanočástic. Z citované práce Daniely Kozáčkové se zdá být stěžejní koncentrace surfaktantu než jeho samotná volba. [27]

7.1.4 Nanočástice připravené za přítomnosti různých poměrů AC:EtOH

V tomto experimentu byl použit kopolymer PLGA A2, který v předchozích experimentech vykazoval nejvyšší hodnoty. Vodná fáze byla složena z 1% roztoku PVA. Organická fáze byla po dobu experimentu měněna v následujících poměrech acetonu a etanolu: 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5.

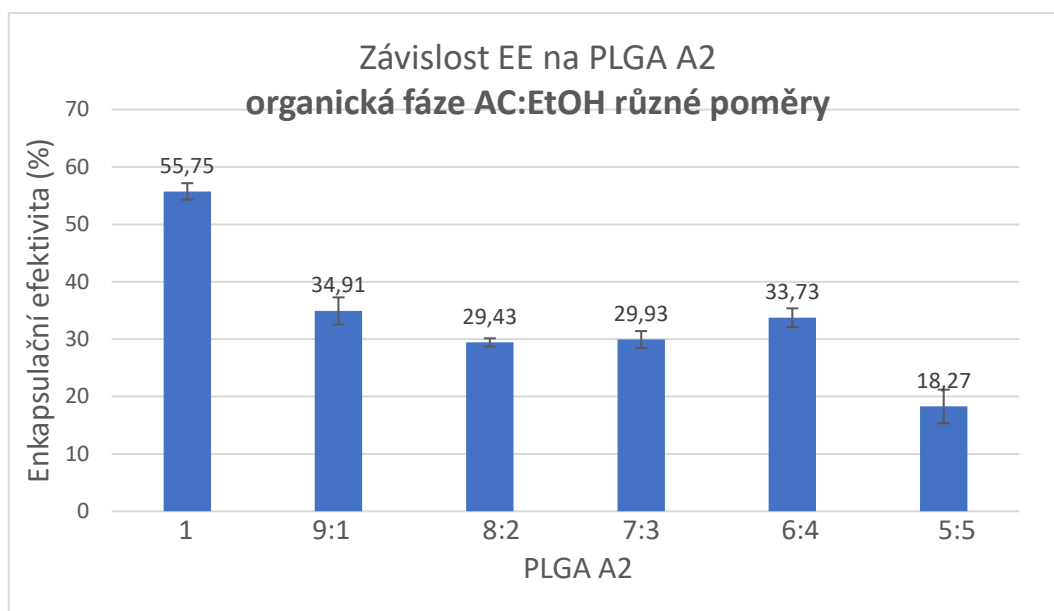
V následujících grafech jsou uvedeny výsledky měření, zejména šlo o EE a DL.

a) Enkapsulační efektivita



Graf 15: Metoda nanoprecipitace, závislost EE na polymeru PLGA A2 za využití PVA jako vodné fáze, organická fáze AC:EtOH v různých poměrech, účinná látka kurkumin

b) Drug loading



Graf 16: Metoda nanoprecipitace, závislost DL na polymeru PLGA A2 za využití PVA jako vodné fáze, organická fáze AC:EtOH v různých poměrech, účinná látka kurkumin

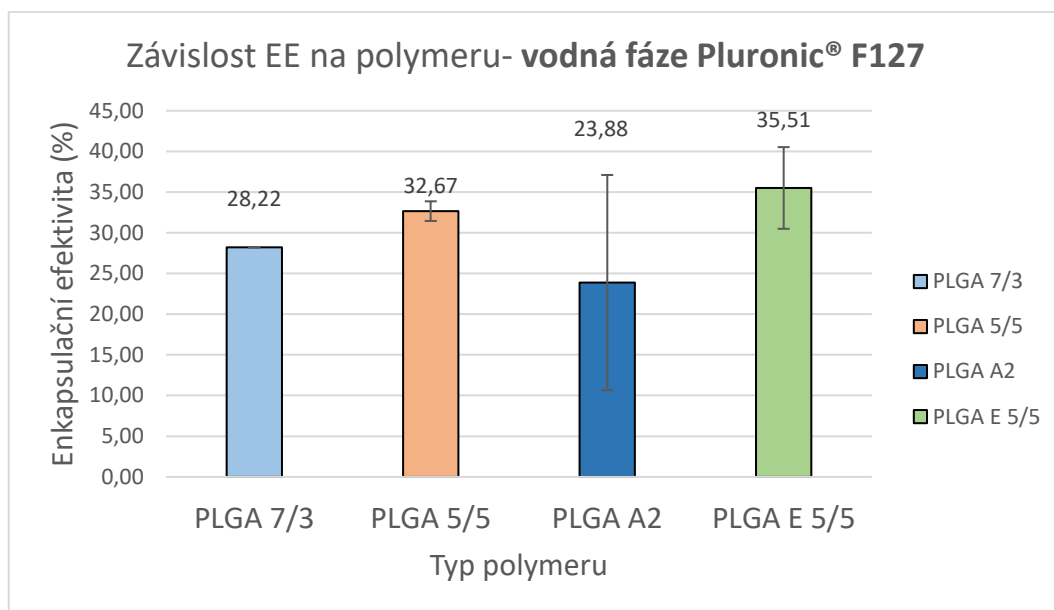
V tomto experimentu byl pozorován vliv organické fáze za využití metody nanoprecipitace na určované parametry. Z grafů můžeme vyčíst, že dosahované hodnoty jsou výrazně nižší než u předchozího experimentu za využití acetonu. Pozoroval se rovněž vliv různých poměrů AC:EtOH. Jako stabilizátor byl zvolen PVA. Z dostupné literatury je patrné, že aceton má vyšší afinitu k PLGA než k PVA zatímco u etanolu je tomu naopak. [52] Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, zda rychlejší difuze etanolu z nanokapeček během precipitace povede k vyšší EE. Tento předpoklad se bohužel nepodařilo potvrdit. Nejvyšších hodnot EE dosahoval PLGA A2 za využití poměru AC: EtOH (9:1), kde hodnota činí 34,91 % a naopak nejmenších hodnot (18,27 %) nabýval poměr AC: EtOH (5:5). Z výsledků můžeme vyvodit závěr, že s přibývajícím množstvím etanolu, klesá i EE a rychlost tvorby suspenze je tedy nepřímou úměrnou míře enkapsulace kurkuminu. Pro dosažení vyšších hodnot enkapsulace je tedy zřejmě třeba rychlost precipitace zpomalit, ale v literatuře se nepodařilo dohledat relevantní zdroj a z časových důvodů nebyl tento experiment proveden.

Rovněž i hodnoty DL dosahují výrazně nižších hodnot oproti čistému acetonu. Z uvedených výsledků je tedy patrné, že se není vhodné použít směs s vyšším podílem etanolu.

7.2 Nanočástice připravené za pomoci emulzní odpařovací metody

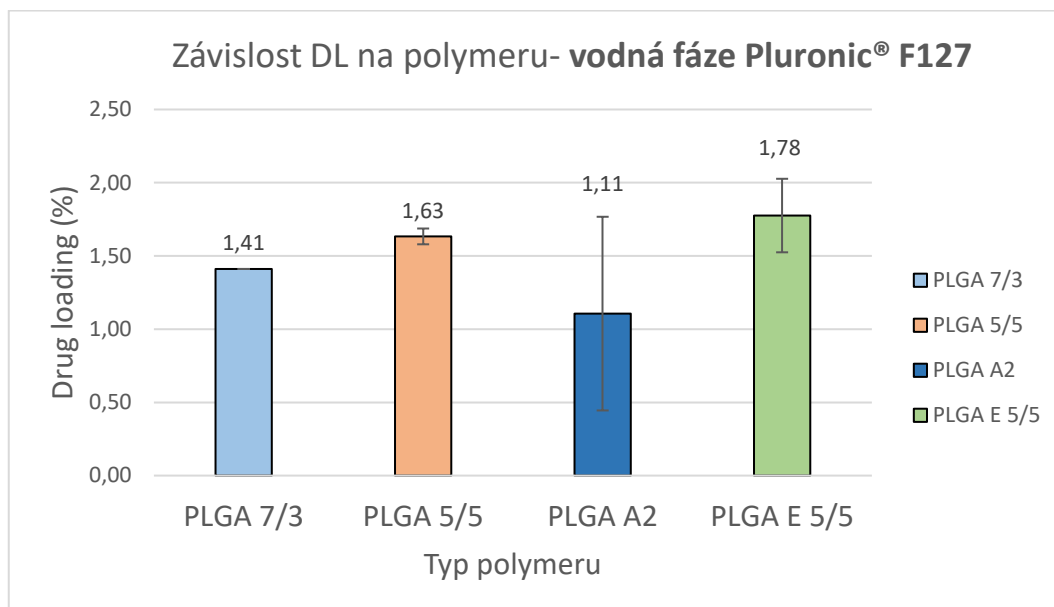
Během experimentální části se porovnával také vliv přípravy nanočástic na hodnocené parametry. Z předchozích výsledků se vyhodnotil Pluronic® F127 0,1% jako vhodnější surfaktant pro přípravu nanočástic, a právě z tohoto důvodu byl využit i nyní. Nanočástice byly připravovány pomocí emulzní odpařovací metody viz 6.3.2. V následujících grafech 17–20 jsou prezentovány výsledky.

a) Enkapsulační efektivita



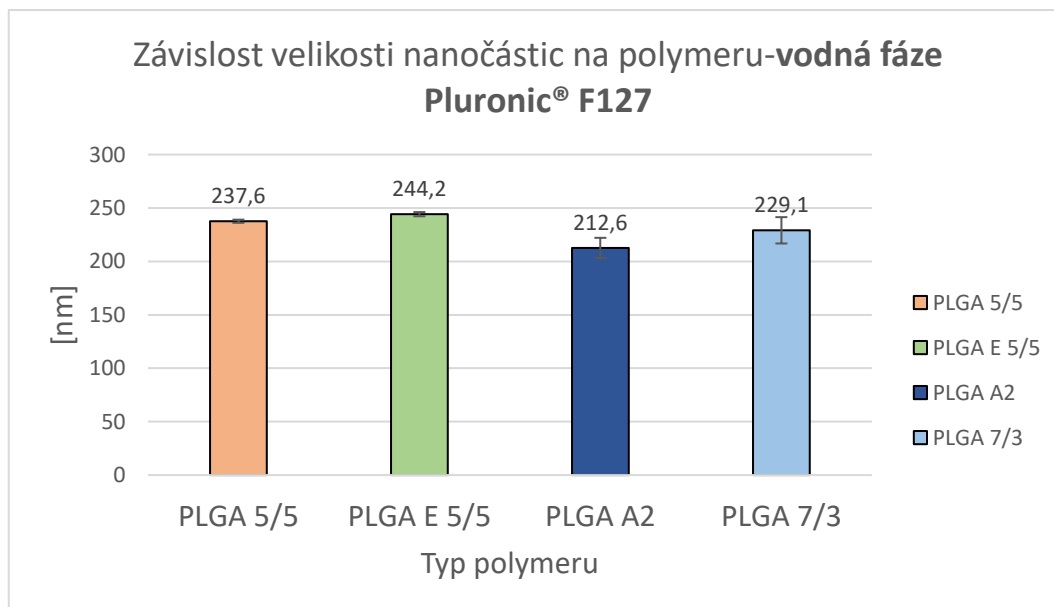
Graf 17: Emulzní odpařovací metoda, závislost EE na použitém typu polymeru za využití Pluronicu® F127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

b) Drug loading



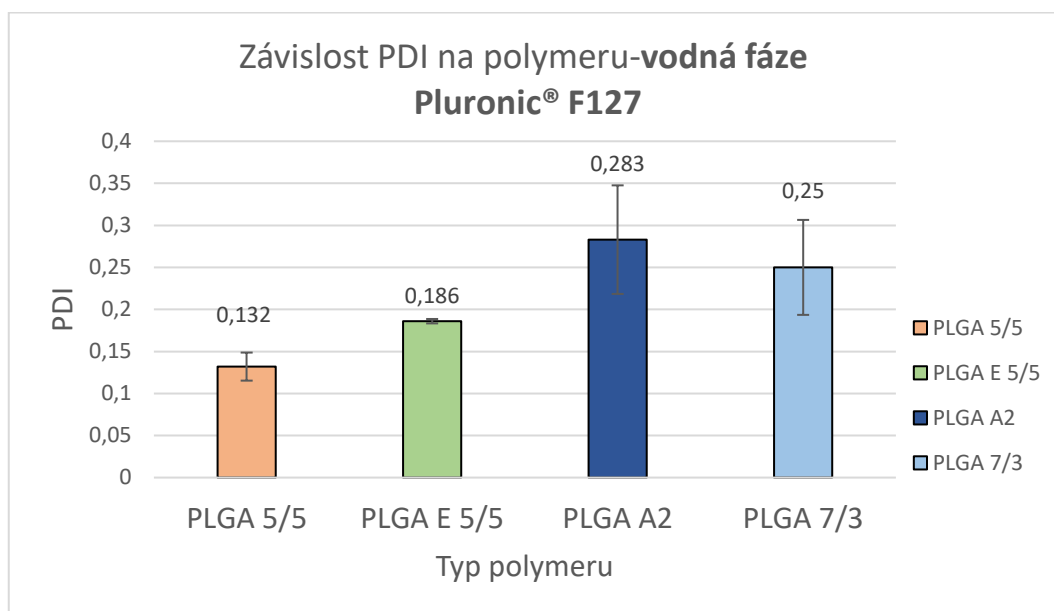
Graf 18: Emulzní odpařovací metoda, závislost DL na použitém typu polymeru za využití Pluronicu ®F 127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

c) Velikost nanočástic



Graf 19: Emulzní odpařovací metoda, závislost velikosti nanočástic na použitém typu polymeru za využití Pluronicu ®F 127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

d) PDI



Graf 20: Emulzní odpařovací metoda, závislost PDI na použitém typu polymeru za využití Pluronicu® F 127 jako vodné fáze, organická fáze aceton, účinná látka kurkumin

7.2.1 Hodnocení parametrů (Velikost, PDI, EE, DL)

Tabulka 5: Shrnutí výsledků, emulzní odpařovací metoda, Pluronic® F127

Parametry	EE [%]	DL [%]	Velikost [nm]	PDI
PLGA 5/5	32,67	1,63	237,6	0,132
PLGA E 5/5	35,51	1,78	244,2	0,186
PLGA A2	23,88	1,11	212,6	0,283
PLGA 7/3	28,22	1,41	229,1	0,25

Z uvedených hodnot v tabulce 5 je patrné, že velikost nanočástic přesahuje 200 nm. To může být zapříčiněno metodou přípravy, kdy mohlo docházet k tvorbě aglomerátů. Jak bylo zmíněno v předchozích hodnoceních, tak i tyto hodnoty splňují velikost 100-300 nm, která je potřebná pro cílenou distribuci do MFS.

Index polydisperzity se pohybuje v rozmezí (0,132 až 0,283). U kopolymerů obsahujících stejný poměr monomerů, tedy PLGA 5/5 a PLGA E 5/5 můžeme považovat hodnoty za monodisperzní. Ostatní hodnoty, kopolymer PLGA A2 a PLGA 7/3, jsou nevyhovující, což značí nerovnoměrné rozložení velikosti částic ve vzorku a polydisperzité. To by mohlo vést k nežádoucím změnám vlastností nanočástic, které by přímo ovlivňovaly jejich interakci s cílovými buňkami a jejich endocytózu.

Hodnoty EE nejsou příliš uspokojivé a jsou nižší než ty, kterých bylo dosaženo za využití nanoprecipitace. Nejvyšších výsledků EE nabýval kopolymer PLGA E 5/5 (35,51 %). Nejmenší hodnotu dosahoval PLGA A2 (23,88 %). Vysvětlení pravděpodobně spočívá v použité metodě přípravy, kdy může docházet k úniku léčiva z vnitřní fáze ve fázi emulgace, když je navíc soustava vystavena vysokoamplitudovému ultrazvuku, který napomáhá solubilizaci kurkuminu ve vodné fázi. K dalšímu úniku léčiva může docházet i ve fázi odpařování emulze.

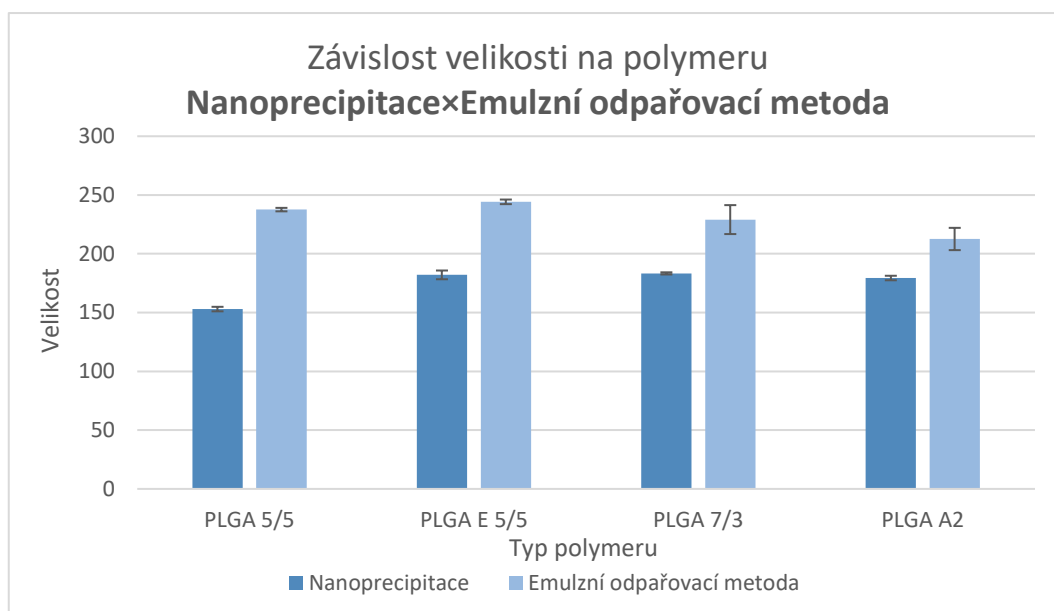
7.2.2 Porovnání nanočástic za využití metod: Nanoprecipitace (NPM), Emulzní odpařovací metoda (ESE)

Tato kapitola je zaměřena na porovnání metod, pomocí nichž byly nanočástice připraveny. Jedná se o metodu nanoprecipitace a emulzní odpařovací metodu, jejichž popis najdeme v kapitolách 6.3.1. a 6.3.2. Konkrétně se jedná o nanočástice připravených za pomoci surfaktantu Pluronic® F127. Opět byly porovnávány parametry jako je EE, DL, PDI a velikost. Hodnoceny byly všechny čtyři typy kopolymerů. V následující tabulce 6 jsou uvedeny výsledné hodnoty těchto parametrů.

Tabulka 6: Nanoprecipitace (NPM)× Emulzní odpařovací metoda (ESE)

Parametry	EE (%)		DL (%)		Velikost (nm)		PDI	
	NPM	ESE	NPM	ESE	NPM	ESE	NPM	ESE
PLGA 5/5	47,1	32,67	2,39	1,63	152,98	237,6	0,064	0,132
PLGA E 5/5	51,76	35,51	2,59	1,78	182,07	244,2	0,067	0,186
PLGA A2	71,91	23,88	3,6	1,11	179,4	212,6	0,074	0,283
PLGA 7/3	57,53	28,22	2,88	0,92	183,33	229,1	0,066	0,25

a) Velikost

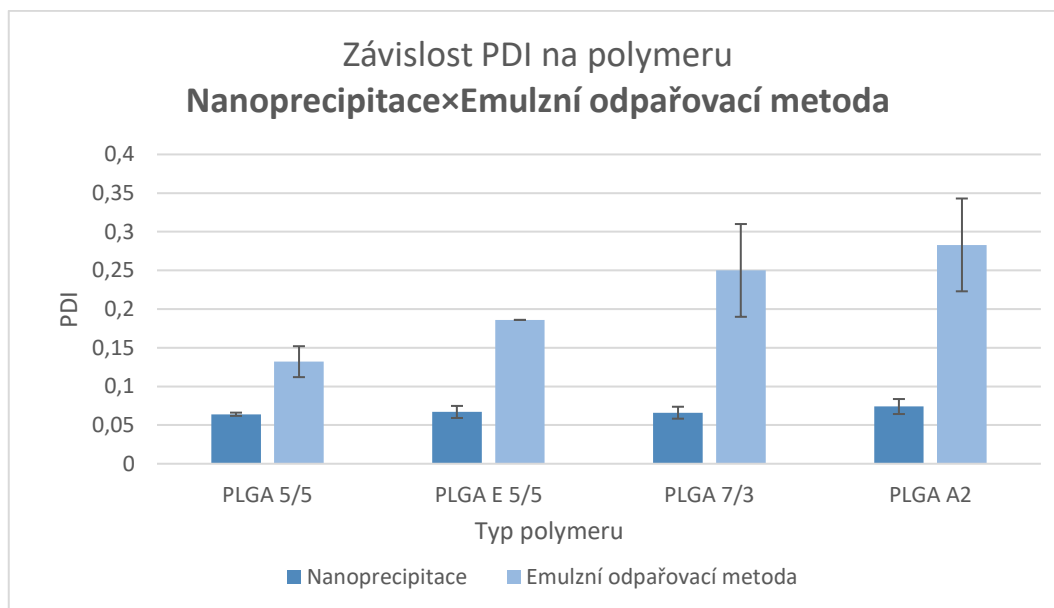


Graf 21: Závislost velikosti na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda

Z uvedeného grafu 21 je patrné, že vyšších hodnot velikosti dosahovaly nanočástice připravené za pomoci emulzní odpařovací metody. Během emulzní odpařovací metody mohlo dojít k tvorbě aglomerátů zejména v primární fázi emulze a tím tak ovlivnit výsledky velikosti.

To mohlo zapříčinit také fakt, že během tvorby emulze je důležité stabilizovat fázové rozhraní po delší dobu než u metody nanoprecipitace, kde se částice téměř vytvoří okamžitě. Zvýšením koncentrace použitého surfaktantu by mohlo být řešením, jelikož by mohlo dojít ke snížení povrchového napětí mezi fázemi a tím i tvorby menších částic.

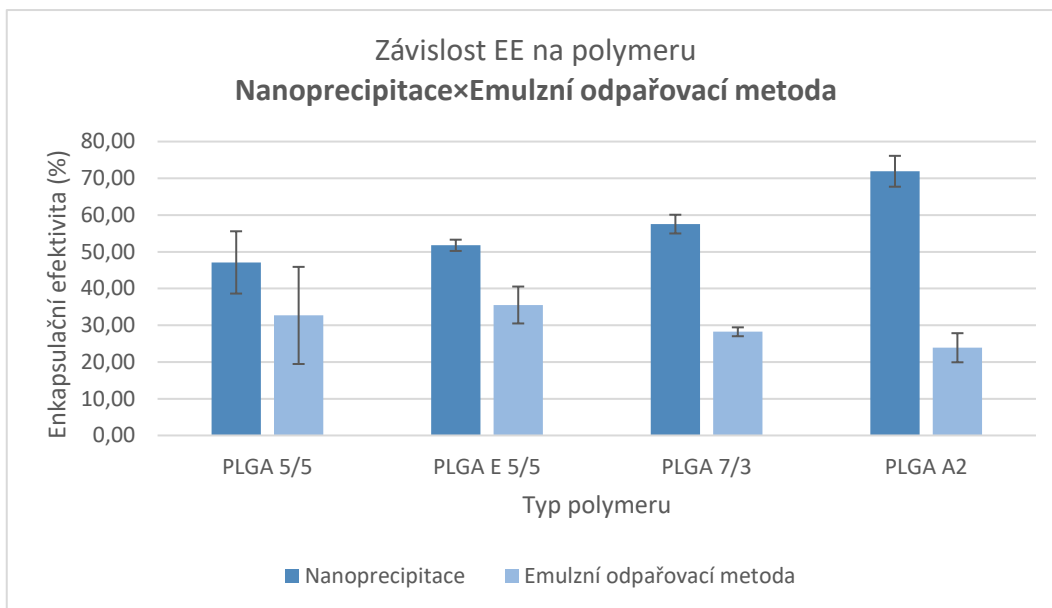
b) PDI



Graf 22: Závislost PDI na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda

Oproti metodě nanoprecipitace zde vidíme nárůst i hodnot PDI. Hodnoty polydisperzity (Graf 22) se pohybovaly u emulzní odpařovací metody v rozmezí (0,132 až 0,283). U PLGA 5/5 a PLGA E 5/5 můžeme hodnoty považovat za monodisperzní, u nevyhovujících vzorků (hodnota vyšší než 0,2) mohlo dojít rovněž k agregaci vzniklých částic zejména ve fázi primární emulze.

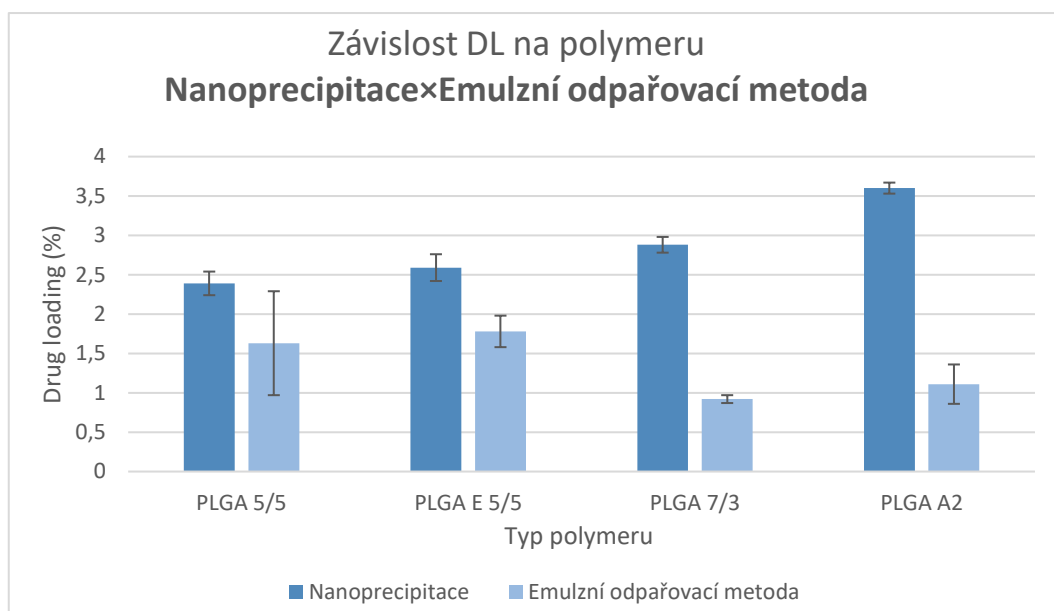
c) Enkapsulační efektivita



Graf 23: Závislost EE na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda

Rovněž i hodnoty EE (Graf 23) jsou i o více než 50 % nižší než u metody nanoprecipitace. Nejvyšší hodnota byla dosažena u PLGA E 5/5 (35,51 %). Naopak u metody nanoprecipitace dosahoval nejvyšších hodnot PLGA A2 (71,91 %). Tyto výsledky mohly být ovlivněny několika faktory jako je již zmíněná struktura polymeru, molekulární hmotnost a rovněž v tomto konkrétním případě i metoda přípravy nanočástic, která zde hrála stěžejní roli.

d) Drug loading



Graf 24: Závislost DL na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda

Hodnoty DL, které jsou znázorněny v grafu 24, jsou rovněž nízké oproti metodě nanoprecipitace. Toto je pravděpodobně způsobeno únikem léčiva z emulzního systému, kdy právě kapalná povaha vnitřní fáze snáze umožňuje enkapsulovaným léčivům přecházet do vnější fáze. Závěrem můžeme říci, že emulzní odpařovací metoda není natolik vhodná jako metoda nanoprecipitace. Může zde docházet k tvorbě aglomerátů a tím pádem i k negativnímu ovlivnění výsledků.

Z publikované práce na přípravu nanočástic s kurkuminem, kde se porovnávaly rovněž tyto dvě metody přípravy (ESE a NPM) a používaly se tři typy kopolymeru PLGA (PLGA 5/5, PLGA A2 a PLGA 7/3), můžeme zjistit, že nanočástice vytvořené NPM jsou výrazně menší než připravené ESE metodou, rovněž jejich PDI je menší. Hodnoty EE a DL také dosahovaly menších hodnot za využití metody ESE. Rozdíly spočívaly v porovnání kopolymerů PLGA, kde v této práci dosahoval nejvyšších hodnot EE PLGA 7/3 u obou metod příprav, a naopak nejmenších hodnot dosahoval PLGA A2. Z výsledných hodnot můžeme usoudit, že metoda ESE je méně vhodnější na přípravu nanočástic s enkapsulovaným kurkuminem než metoda NPM.

V jiné práci se cílilo na porovnání kopolymerů PLGA A2 a PLGA 5/5, kde se v průběhu práce měnila nejprve hmotnost kurkuminu a pak také kopolymeru.

Z uvedených výsledků v dané práci vždy dosáhl vyšších hodnot EE kopolymer PLGA A2. To je vysvětleno rozvětvenou strukturou kopolymeru PLGA A2. [48]

V další práci zaměřující se na porovnání těchto dvou kopolymerů rovněž dosahuje vyšších hodnot EE a DL PLGA A2 (cca 60 %). Opět se tento jev vysvětluje strukturou polymeru, která je větvená. Tato větvená struktura je zřejmě schopná zadržet větší množství kurkuminu než struktura lineární u PLGA 5/5. [49]

Závěrem tohoto experimentu můžeme říct, že vhodnou metodou pro tvorbu nanočástic s kurkuminem je metoda nanoprecipitace. Ze všech čtyř používaných kopolymerů vychází, že nejvyšších hodnot EE dosahuje kopolymer PLGA A2 díky své rozvětvené struktuře za využití Pluronic® F127. Zdá se, že volba stabilizátoru nemá velký vliv na určované parametry, velkým faktorem je zde spíše struktura a molekulární hmotnost kopolymeru. Naproti tomu výběr rozpouštědla a metody přípravy hraje významnou roli ve výsledcích. Ukázalo se, že nahrazení acetonu směsí rozpouštědel acetonu a ethanolu nemá pozitivní vliv na parametry, konkrétně na enkapsulační efektivitu a drug loading.

7.3 Disoluce

Během disoluce se hodnotily dvě formulace připravené pomocí nanoprecipitace, které dosáhly uspokojivých výsledků a se kterými je počítáno do *in vitro* experimentů (PLGA 7/3 a PLGA E 5/5). K uvolňování kurkuminu docházelo v disolučním médiu 0,5% roztoku Tweenu 20. Během disoluce se odebíralo 2 ml disolučního média v předem stanovených časech (½ hodiny, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 8 hodin, 18 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin). Cílem bylo zjistit celkové uvolněné množství kurkuminu v % ve stanovený čas.

Tabulka 7: Vzorky připravené pro disoluci

Kopolymer	w/w (%)	m kurkumin (mg)	m PLGA (mg)
PLGA 7/3	5	1,5	30
PLGA E 5/5	5	1,5	30

Následující tabulky uvádějí celkové procentuální množství uvolněného kurkuminu z obou polymerů vztažených na EE.

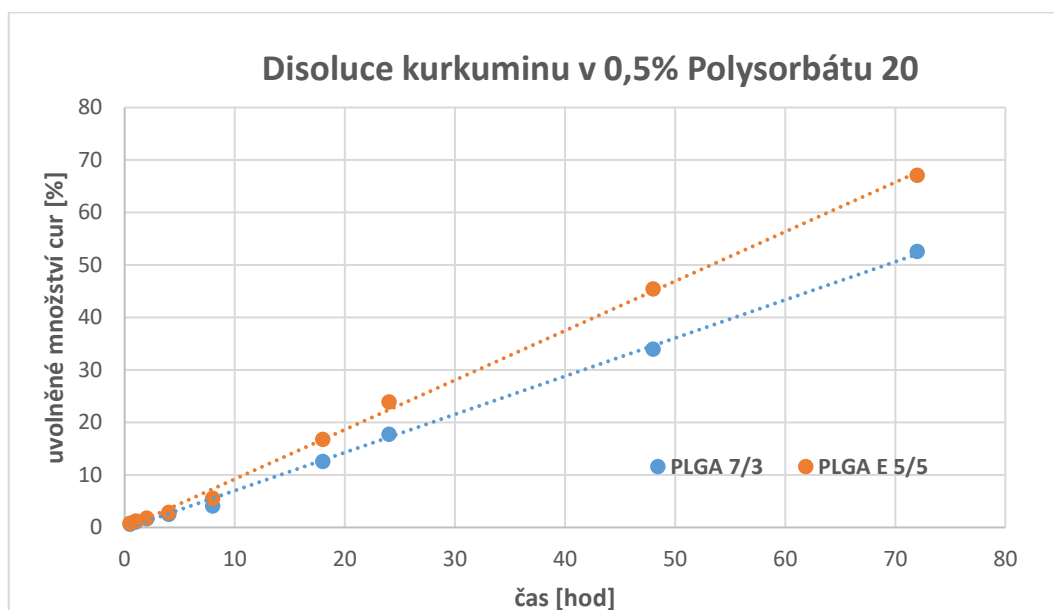
Tabulka 8: Průběh disoluce nanočástic z PLGA E 5/5, disoluční médium: 0,5 % roztok Tweenu 20, účinná látka kurkumin

Čas [hod]	m za čas [mg]	celkové uvolněné množství v %
0,5	0,0059	0,81
1	0,0088	1,21
2	0,013	1,78
4	0,0212	2,9
8	0,0405	5,54
18	0,1226	16,76
24	0,1748	23,89
48	0,3324	45,44
72	0,4908	67,1

Tabulka 9: Průběh disoluce nanočástic z PLGA 7/3, disoluční médium: 0,5 % roztok Tweenu 20, účinná látka kurkumin

Čas [hod]	m za čas [mg]	celkové uvolněné množství v %
0,5	0,0042	0,64
1	0,0068	1,04
2	0,011	1,68
4	0,0163	2,49
8	0,0268	4,09
18	0,0821	12,55
24	0,1161	17,74
48	0,2223	33,96
72	0,344	52,55

Z hodnot v tabulce 8 a 9 byla sestrojena kumulativní disoluční křivka:



Graf 25: Disoluční profily nanočástic z PLGA 7/3 a PLGA E 5/5

Experiment uvolňování kurkuminu z polymerních nanočástic byl proveden za účelem zjištění vlivu polymeru na kinetiku uvolňování. Oba polymery vykazují stejnou kinetiku uvolňování kurkuminu, jedná se o kinetiku nultého řádu. [50]

Z uvedeného grafu 25 je patrné, že uvolňování kurkuminu probíhalo rychleji z PLGA E 5/5, kdy po 72 hodinách dojde k uvolnění až 67 % kurkuminu. Afinita mezi polymerem a kurkuminem je u PLGA E 5/5 nižší, zatímco u PLGA 7/3 vyšší. To vzájemně souvisí s hodnotami EE, které ukazují, že míra interakcí mezi PLGA E 5/5 a kurkuminem je nižší než u PLGA 7/3. Vyšší afinita kurkuminu k PLGA 7/3 je dána tím, že se jedná o více lipofilní polymer díky vyššímu zastoupení kyseliny mléčné v porovnání s PLGA E 5/5. Uvolňování kurkuminu z lipofilnějšího polymeru tedy celkem očekávatelně probíhá pomaleji.

8 Závěr

Diplomová práce se zabývala polymerními nanočásticemi jako platformou pro dodání ve vodě špatně rozpustných léčiv. Jako modelové léčivo byl zvolen kurkumin, který je protizánětlivý a má velký potenciál k využití léčbě zánětlivých onemocnění. Posuzovanými parametry byla velikost, index polydisperzity, enkapsulační efektivita, drug loading a disoluce léčiva.

Účelem bylo najít optimální podmínky, tedy najít takové nanočástice, které by splňovaly rozmezí velikosti 100–300 nm pro targeting do jaterních makrofágů, PDI nižší než 0,2, aby se zajistila monodisperzita částic a rovněž dosáhnout vysokých hodnot EE a DL pro zajištění terapeutické efektivity.

Ukázalo se, že během experimentů všechny připravené nanočástice splňují požadavek velikosti pro targeting do jaterních makrofágů. Index polydisperzity dosahuje téměř ve všech případech nízkých hodnot ($\leq 0,2$), částice lze považovat tedy za monodisperzní. Nevyhovujících výsledků PDI se docílilo během přípravy emulzní odpařovací metodou, kde došlo ke zvýšení hodnoty PDI nad 0,2. To je vysvětleno vznikem aglomerátů během tvorby primární emulze. Hodnoty EE jsou rovněž ve všech případech uspokojivé. Nejlepších výsledků EE (71,91 %) dosahuje PLGA A2 pomocí metody nanoprecipitace, to je vysvětleno rozvětvenou strukturou tohoto kopolymeru. Z výsledků, kde se zkoumal vliv použitých surfaktantů lze dojít k závěru, že druh použitého surfaktantu nemá výraznou roli na výsledné hodnoty určovaných parametrů. Z pozorování vlivu organické fáze na enkapsulační efektivitu a drug loading vyplývá, že s rostoucím množstvím etanolu klesá EE. Předpoklad, že rychlost tvorby částic bude pozitivní pro sledované parametry se nepodařilo potvrdit. Prokázalo se, že zásadní vliv na EE a DL má zvolený kopolymer. Zejména struktura a molekulární hmotnost daného PLGA je stěžejní vlastností pro výsledné hodnoty. Rozvětvené molekuly jsou tedy ideálními kandidáty jako nosiče léčiva.

V závěru byla použita emulzní odpařovací metoda, kde výsledky jasně ukazují, že tato metoda je méně vhodná pro přípravu nanočástic než metoda nanoprecipitace. Hodnoty EE nabývají až o polovinu menších hodnot.

Během experimentální části se rovněž prováděl test disoluce, kde se porovnávaly dva typy polymerů (PLGA E 5/5, PLGA 7/3). Z provedených disolučních testů vyplývá,

že pro řízené uvolňování je lepší polymer PLGA 7/3, ze kterého se léčivo uvolňuje pomaleji, vysvětlením může být vyšší afinita kurkuminu k lipofilnějšímu polymeru.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura liposomu [4].....	12
Obrázek 2: Micely na bázi lipidů vs. polymerní micely [4]	13
Obrázek 3: Struktura dendrimeru [4].....	13
Obrázek 4: (A) Polymerní nanočástice nebo polymerní nanosféry. (B) Polymerní nanokapsle [7].....	14
Obrázek 5: Metoda odpařování rozpouštědla [8].....	16
Obrázek 6: Emulgace s difuzí rozpouštědla [8].....	17
Obrázek 7: Metoda vysolování [8]	18
Obrázek 8: Metoda nanoprecipitace [8].....	19
Obrázek 9: Typické uspořádání techniky rozptylu světla pro měření velikosti nanočástic [19].....	22
Obrázek 10: Zeta potenciál [23]	24
Obrázek 11: Typický graf závislosti zeta potenciálu na pH, který ukazuje polohu izoelektrického bodu a hodnoty pH v zelených sektorech, kde by disperze měla být stabilní. [24].....	25
Obrázek 12: Pasivní targeting. Nanoléčiva hromadí se v nádorových tkáních prostřednictvím jedinečných patofyziologických vlastností nádorových cév. [29]	28
Obrázek 13: Aktivní targeting. Aktivní targeting umožňující vychytávání nanočástic prostřednictvím endocytózy zprostředkované receptory [29]	29
Obrázek 14: Struktura kurkuminu	33

10 Seznam grafů

Graf 1: Kalibrační křivka, různé koncentrace kurkuminu v DMSO při 434,5 nm	38
Graf 2: Kalibrační křivka, různé koncentrace kurkuminu v 0,5% roztoku Tweenu při 424 nm	41
Graf 3: Metoda nanoprecipitace, závislost EE na použitém typu polymeru za využití Pluronicu® F127 jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin (c = 1,5 mg/ml).....	44
Graf 4: Metoda nanoprecipitace, závislost DL na použitém typu polymeru za využití Pluronicu F127 jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin	44
Graf 5: Metoda nanoprecipitace, závislost velikosti nanočástic na použitém typu polymeru za využití Pluronicu® F127 jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin.....	45
Graf 6: Metoda nanoprecipitace, závislost PDI na použitém polymeru za využití Pluronicu F127 jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin	45
Graf 7: Metoda nanoprecipitace, závislost EE na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin.....	47
Graf 8: Metoda nanoprecipitace, závislost DL na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin.....	48
Graf 9: Metoda nanoprecipitace, závislost velikosti nanočástic na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin....	48
Graf 10: Metoda nanoprecipitace, závislost PDI na použitém typu polymeru za využití PVA jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin.....	49
Graf 11: Závislost velikosti na polymeru vliv surfaktantu PVA×Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace	52
Graf 12: Závislost PDI na polymeru vliv surfaktantu PVA×Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace	53
Graf 13: Závislost EE na polymeru vliv surfaktantu PVA×Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace	54
Graf 14: Závislost DL na polymeru vliv surfaktantu PVA a Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace	55
Graf 15: Metoda nanoprecipitace, závislost EE na polymeru PLGA A2 za využití PVA jako vodné fáze, org. fáze AC:EtOH v různých poměrech, účinná látka kurkumin	56

Graf 16: Metoda nanoprecipitace, závislost DL na polymeru PLGA A2 za využití PVA jako vodné fáze, org. fáze AC:EtOH v různých poměrech, účinná látka kurkumin	57
Graf 17: Emulzní odpařovací metoda, závislost EE na použitém typu polymeru za využití Pluronicu.....	58
Graf 18: Emulzní odpařovací metoda, závislost DL na použitém typu polymeru za využití Pluronicu ®F 127 jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin	59
Graf 19: Emulzní odpařovací metoda, závislost velikost nanočástic na použitém typu polymeru za využití Pluronicu ®F 127 jako vodné fáze, org. fáze aceton, účinná látka kurkumin.....	59
Graf 20: Emulzní odpařovací metoda, závislost PDI na použitém typu polymeru za využití Pluronicu ®F 127 jako vodné fáze, org. Fáze aceton, účinná látka kurkumin	60
Graf 21: Závislost velikosti na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda	63
Graf 22: Závislost PDI na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda	64
Graf 23: Závislost EE na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda.....	65
Graf 24: Závislost DL na polymeru, Pluronic® F127, metoda nanoprecipitace vs emulzní odpařovací metoda.....	66
Graf 25: Disoluční profily nanočástic z PLGA 7/3 a PLGA E 5/5.....	69

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Body kalibrační křivky, různé koncentrace kurkuminu v DMSO	38
Tabulka 2: Výsledky zkoumaných parametrů, metoda nanoprecipitace, surfaktant Pluronic® F127.....	46
Tabulka 3: Výsledky zkoumaných parametrů, metoda nanoprecipitace, surfaktant PVA	50
Tabulka 4: Metoda nanoprecipitace, shrnutí výsledků, Pluronic ® F127×PVA	51
Tabulka 5: Shrnutí výsledků, emulzní odpařovací metoda, Pluronic ® F127	61
Tabulka 6: Nanoprecipitace (NPM)× Emulzní odpařovací metoda (ESE).....	62
Tabulka 7: Vzorky připravené pro disoluci	68
Tabulka 8: Průběh disoluce nanočástic z PLGA E 5/5, disoluční médium: 0,5 % roztok Tweenu 20, účinná látka kurkumin.....	68
Tabulka 9: Průběh disoluce nanočástic z PLGA 7/3, disoluční médium: 0,5 % roztok Tweenu 20, účinná látka kurkumin.....	69

12 Seznam rovnic

Rovnice 1: Enkapsulační efektivita [25].....	25
Rovnice 2: Drug loading [25]	26
Rovnice 3: Vztah mezi absorbancí kurkuminu v DMSO změřený při vlnové délce 434,5 nm a jeho koncentrací	39
Rovnice 4: Vzorec pro výpočet EE.....	39
Rovnice 5: Vzorec pro výpočet DL	39
Rovnice 6	41

13 Literatura

- [1] RABIŠKOVÁ, Miloslava. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*. 2007, 17: 495-501.
- [2] WILCZEWSKA, Agnieszka Z., Katarzyna NIEMIROWICZ, Karolina H. MARKIEWICZ a Halina CAR. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports* [online]. 2012, 64(5), 1020-1037 [cit. 2023-08-26]. ISSN 17341140. Dostupné z: doi:10.1016/S1734-1140(12)70901-5
- [3] CHEN, Yan, Yao LU, Robert J LEE a Guangya XIANG. Nano Encapsulated Curcumin: And Its Potential for Biomedical Applications . *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2020, 15, 3099-3120 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S210320
- [4] KAMALI, Hossein, Rahim NOSRATI a Bizhan MALAEKEH-NIKOUEI. Nanostructures and their associated challenges for drug delivery. In: *Hybrid Nanomaterials for Drug Delivery* [online]. Elsevier, 2022, s. 1-26 [cit. 2023-08-26]. ISBN 9780323857543. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-85754-3.00015-0
- [5] PATRA, Jayanta Kumar, Gitishree DAS, Leonardo Fernandes FRACETO, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2018, 16(1) [cit. 2023-08-26]. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-018-0392-8
- [6] AYUB, Ahsan a Shawn WETTIG. An Overview of Nanotechnologies for Drug Delivery to the Brain. *Pharmaceutics* [online]. 2022, 14(2) [cit. 2023-08-26]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14020224

- [7] LU, Xiao-Yun, Dao-Cheng WU, Zheng-Jun LI a Guo-Qiang CHEN. Polymer Nanoparticles. In: *Nanoparticles in Translational Science and Medicine* [online]. Elsevier, 2011, s. 299-323 [cit. 2023-08-26]. Progress in Molecular Biology and Translational Science. ISBN 9780124160200. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3
- [8] ZIELIŃSKA, Aleksandra, Filipa CARREIRÓ, Ana M. OLIVEIRA, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* [online]. 2020, **25**(16) [cit. 2023-08-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163731
- [9] GEORGE, Archana, Priyanka A. SHAH a Pranav S. SHRIVASTAV. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2019, **561**, 244-264 [cit. 2023-08-26]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.03.011
- [10] CRUCHO, Carina I.C. a Maria Teresa BARROS. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **80**, 771-784 [cit. 2023-08-26]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.06.004
- [11] TABATABAEI MIRAKABAD, Fatemeh Sadat, Kazem NEJATI-KOSHKI, Abolfazl AKBARZADEH, et al. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [online]. 2014, 2014-01-30, **15**(2), 517-535 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1513-7368. Dostupné z: doi:10.7314/APJCP.2014.15.2.517
- [12] SU, Yue, Bolun ZHANG, Ruowei SUN, Wenfang LIU, Qubo ZHU, Xun ZHANG, Rongrong WANG a Chuanpin CHEN. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application. *Drug Delivery* [online]. 2021, 2021-01-01, **28**(1), 1397-1418 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2021.1938756

- [13] YADAV, Hemant Kumar. *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles*. 2012. Dostupné také z: @inproceedings{Yadav2012DIFFERENTTF, title={DIFFERENT TECHNIQUES FOR PREPARATION OF POLYMERIC NANOPARTICLES-A}, author={Hemant Kumar Yadav}, year={2012}, url={https://api.semanticscholar.org/CorpusID:33413145} }
- [14] TABATABAEI MIRAKABAD, Fatemeh Sadat, Kazem NEJATI-KOSHKI, Abolfazl AKBARZADEH, et al. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [online]. 2014, 2014-01-30, **15**(2), 517-535 [cit. 2023-08-27]. ISSN 1513-7368. Dostupné z: doi:10.7314/APJCP.2014.15.2.517
- [15] AKBARI, B., M. ZANDRAHIMI a M. PIRHADI TAVANDASHTI. Particle size characterization of nanoparticles - a practical approach. *Iranian Journal of Materials Science and Engineerin.* 2011. Dostupné také z: <http://ijmse.iust.ac.ir/article-1-341-en.html>
- [16] CARTAXO, Ana Luísa. *Nanoparticles types and properties – understanding these promising devices in the biomedical area* [online]. [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:189955782>
- [17] GAUMET, Marie, Angelica VARGAS, Robert GURNY a Florence DELIE. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2008, **69**(1), 1-9 [cit. 2023-08-26]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2007.08.001
- [18] LOURENCO, C. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1996, 1996-07-12, **138**(1), 1-12 [cit. 2023-08-26]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(96)04486-9

- [19] BRAR, Satinder K. a M. VERMA. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, **30**(1), 4-17 [cit. 2023-08-26]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2010.08.008
- [20] MOURDIKLOUDIS, Stefanos, Roger M. PALLARES a Nguyen T. K. THANH. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* [online]. 2018, **10**(27), 12871-12934 [cit. 2023-08-26]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/C8NR02278J
- [21] JOY, David C., Savile BRADBURY a Brian J. FORD. Scanning electron microscope. *Encyclopedia Britannica* [online]. [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope>
- [22] SINGH, Suman, Amardeep BHARTI a Vijay Kumar MEENA. Structural, thermal, zeta potential and electrical properties of disaccharide reduced silver nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* [online]. 2014, **25**(9), 3747-3752 [cit. 2023-08-26]. ISSN 0957-4522. Dostupné z: doi:10.1007/s10854-014-2085-x
- [23] Zeta potenciál zeta [online]. [cit. 2020-04-22]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfklosa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [24] MALVERN. *Zeta potential - An introduction in 30 minutes* [online]. Malvern Instruments Limited [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>

- [25] PIACENTINI, Emma. Encapsulation Efficiency. In: DRIOLI, Enrico a Lidietta GIORNO, ed. *Encyclopedia of Membranes* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, s. 706-707 [cit. 2023-08-26]. ISBN 978-3-662-44323-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-44324-8_1945
- [26] LABGUIDE. Spektrofotometrie. *Labguide* [online]. [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: <https://labguide.cz/spektrofotometrie/>
- [27] KOZÁČKOVÁ, Daniela. *Polymerní částice pro cílenou terapii a zvýšení biodostupnosti*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Holas, Ondřej.
- [28] HOLAS, Ondřej. *Formulace pro cílenou biodistribuci*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Dostupné z file:///C:/Users/HP/Downloads/19-cilene-formulace.pdf
- [29] RAJ, Sibi, Sartaj KHURANA, Ramesh CHOUDHARI, et al. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2021, **69**, 166-177 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2019.11.002
- [30] CARTAXO, Ana Luísa. *Nanoparticles types and properties – understanding these promising devices in the biomedical area* [online]. [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:189955782>
- [31] BYRNE, James D., Tania BETANCOURT a Lisa BRANNON-PEPPAS. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(15), 1615-1626 [cit. 2023-08-26]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2008.08.005
- [32] OWENSIII, D a N PEPPAS. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* [online].

- 2006, 2006-01-03, **307**(1), 93-102 [cit. 2023-08-26]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
- [33] STEVENSON, Ross, Axel J. HUEBER, Alan HUTTON, Iain B. MCINNES a Duncan GRAHAM. Nanoparticles and Inflammation. *The Scientific World JOURNAL* [online]. 2011, **11**, 1300-1312 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1100/tsw.2011.106
- [34] 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 [cit. 2023-08-26]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2018.09.004
- [35] MOOSAVIAN, Seyedeh Alia, Thozhukat SATHYAPALAN, Tannaz JAMIALAHMADI, Amirhossein SAHEBKAR a Giuseppe CICCARELLA. The Emerging Role of Nanomedicine in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A State-of-the-Art Review. *Bioinorganic Chemistry and Applications* [online]. 2021, 2021-10-8, **2021**, 1-13 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1687-479X. Dostupné z: doi:10.1155/2021/4041415
- [36] BARTNECK, Matthias, Klaudia Theresa WARZECHA a Frank TACKE. *Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine* [online]. 2014 [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.02
- [37] ALISI, Anna, Guido CARPINO, Felipe L. OLIVEIRA, Nadia PANERA, Valerio NOBILI a Eugenio GAUDIO. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Mediators of Inflammation* [online]. 2017, **2017**, 1-15 [cit. 2023-08-26]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8162421

- [38] LORBEK, Gregor a Damjana ROZM. Cholesterol and Inflammation at the Crossroads of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Atherogenesis. In: PARTHASARATHY, Sampath, ed. *Atherogenesis* [online]. InTech, 2012, 2012-01-11 [cit. 2023-08-26]. ISBN 978-953-307-992-9. Dostupné z: doi:10.5772/27316
- [39] UNLU, Ahmet, Mustafa OZDOGAN, Erdinc NAYIR a Muhammed DOGUKAN KALENDEROGLU,. Curcumin (Turmeric) and cancer. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* [online]. 2016 [cit. 2023-08-26]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27837604/>
- [40] 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>
- [41] YU, Chong, Bo YANG a Masoud NAJAFI. Targeting of cancer cell death mechanisms by curcumin: Implications to cancer therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2021, 129(6), 397-415 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1742-7835. Dostupné z: doi:10.1111/bcpt.13648
- [42] DEL PRADO-AUDELO, María, Isaac CABALLERO-FLORÁN, Jorge MEZA-TOLEDO, Néstor MENDOZA-MUÑOZ, Maykel GONZÁLEZ-TORRES, Benjamín FLORÁN, Hernán CORTÉS a Gerardo LEYVA-GÓMEZ. Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases. *Biomolecules* [online]. 2019, 9(2) [cit. 2023-08-26]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9020056
- [43] HAFEZ GHORAN, Salar, Andrea CALCATERRA, Milad ABBASI, Fatemeh TAKTAZ, Kay NIESELT a Esmail BABAEI. Curcumin-Based Nanoformulations: A Promising Adjuvant towards Cancer Treatment. *Molecules* [online]. 2022, 27(16) [cit. 2023-08-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27165236

- [44] YEN, Feng-Lin, Tzu-Hui WU, Cheng-Wei TZENG, Liang-Tzung LIN a Chun-Ching LIN. Curcumin Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties of Curcumin and Effectively Enhance Its Antioxidant and Antihepatoma Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, 2010-06-23, **58**(12), 7376-7382 [cit. 2023-08-26]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf100135h
- [45] CHOPRA, Hitesh, Protity Shuvra DEY, Debashrita DAS, et al. Curcumin Nanoparticles as Promising Therapeutic Agents for Drug Targets. *Molecules* [online]. 2021, **26**(16) [cit. 2023-08-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26164998
- [46] GUPTA, Subash C., Sridevi PATCHVA a Bharat B. AGGARWAL. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *The AAPS Journal* [online]. 2013, **15**(1), 195-218 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-012-9432-8
- [47] GEBREEL, Rana M, Noha A EDRIS, Hala M ELMOFTY, Mina I TADROS, Mohamed A EL-NABARAWI a Doaa H HASSAN. Development and Characterization of PLGA Nanoparticle-Laden Hydrogels for Sustained Ocular Delivery of Norfloxacin in the Treatment of Pseudomonas Keratitis: An Experimental Study. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 2021, **15**, 399-418 [cit. 2023-08-26]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S293127
- [48] NEKOLOVÁ, Martina. *Polymerní nanočástice pro dodání ve vodě špatně rozpustných látek*. Hradec Králové, 2023. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Holas, Ondřej.

- [49] BLAŽKOVÁ, Jiřina. *Studium vlastností biodegradovatelných nanočástic na bázi polyesterů*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Holas, Ondřej.
- [50] UMERSKA, Anita, Caroline GAUCHER, Felipe OYARZUN-AMPUERO, Isabelle FRIES-RAETH, Florence COLIN, María VILLAMIZAR-SARMIENTO, Philippe MAINCENT a Anne SAPIN-MINET. Polymeric Nanoparticles for Increasing Oral Bioavailability of Curcumin. *Antioxidants* [online]. 2018, 7(4) [cit. 2023-08-26]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox7040046
- [51] SNEJDROVA, Eva, Stepan PODZIMEK, Juraj MARTISKA, Ondrej HOLAS a Milan DITTRICH. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2020, 2020-03-01, 70(1), 63-75 [cit. 2023-08-27]. ISSN 1846-9558. Dostupné z: doi:10.2478/acph-2020-0011
- [52] 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. 2023-08-27]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(99)00187-8