

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STUDIUM FYZIKÁLE CHEMICKÝCH ASPEKTŮ  
OVLIVŇUJÍCÍ VLASTNOSTI POLYMERNÍCH  
ČÁSTIC**

**Study of physicochemical aspects influencing  
the properties of polymer particles**

**Hradec Králové 2024**

**Eliška Slowíková**

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

V Hradci Králové dne 14.5.2024

Eliška Slowíková

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a podněty, příjemnou spolupráci a za ochotu i čas, který mi při zpracování této diplomové práce věnoval.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>8</b>
<b>1 ÚVOD A CÍL PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Cílená distribuce léčiv</b> .....	<b>10</b>
2.1.1 Cílená distribuce v terapii nádorových onemocnění.....	11
2.1.1.1 Enhanced permeability and retention (EPR) .....	12
2.1.1.2 Aktivní targeting nádorových onemocnění.....	14
2.1.2 Cílená distribuce v terapii zánětlivých onemocnění.....	14
2.1.2.1 Makrofágy jako regulátory zánětu a terapeutický cíl .....	15
<b>2.2 Nosiče léčiv pro cílenou distribuci</b> .....	<b>17</b>
2.2.1 Konjugáty.....	18
2.2.2 Částicové nosiče .....	19
2.2.2.1 Anorganické nanočástice .....	19
2.2.2.2 Lipidové nanočástice .....	20
2.2.2.3 Polymerní nanočástice .....	22
2.2.3 Biodegradovatelné nosiče .....	24
2.2.4 PLGA nanočástice.....	26
2.2.4.1 Využití PLGA nanočástic .....	27
2.2.4.2 Příprava PLGA nanočástic .....	29
<b>2.3 Léčiva pro cílenou distribuci</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4 Příklady léčiv pro cílenou distribuci</b> .....	<b>31</b>

2.4.1	Cytostatika .....	31
2.4.2	Antiinfektiva .....	32
2.4.3	Protizánětlivá léčiva.....	34
2.4.4	Peptidy, proteiny a geny.....	35
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Použité suroviny .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Přístrojové vybavení.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Použité metody .....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Příprava vodné fáze .....	37
3.3.2	Příprava organické fáze.....	38
3.3.3	Příprava nanočástic .....	38
3.3.4	Filtrace .....	38
3.3.5	Centrifugace.....	38
3.3.6	Měření velikosti částic a PDI.....	39
3.3.7	Měření zeta potenciálu.....	39
3.3.8	Měření enkapsulovaného dexametazonu .....	39
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Vyhodnocení enkapsulace dexametazonu do nanočástic .....	42
4.1.1.1	Enkapsulační efektivita.....	42
4.1.1.2	Drug-load.....	48
4.1.2	Vyhodnocení velikosti nanočástic.....	54
4.1.3	Vyhodnocení zeta potenciálu nanočástic .....	58
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>65</b>

# ABSTRAKT

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

**Katedra farmaceutické technologie**

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

**Posluchač:** Eliška Slowíková

**Název diplomové práce:** Studium fyzikálně chemických aspektů ovlivňujících vlastnosti polymerních částic

Polymerní bioodbouratelné nanočástice nachází uplatnění jako nosiče v cílené distribuci léčiv, zlepšují farmakokinetický profil léčiva a omezují jeho nežádoucí účinky. Na rozvoji řady zánětlivých, autoimunitních i dalších onemocnění se podílí makrofágy, které představují jeden z možných terapeutických cílů v léčbě těchto onemocnění. Z toho důvodu je věnována pozornost cílené distribuci protizánětlivých léčiv do makrofágů s pomocí polymerních nanočástic.

Pasivní targeting nanočástic do makrofágů je závislý na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Optimální je použití nanočástic se záporným povrchovým nábojem, hydrofobním charakterem a velikostí v rozmezí 100–300 nm.

V této práci byly nanoprecipitační metodou připraveny nanočástice s obsahem dexametazonu. Pro přípravu nanočástic bylo použito pět různých typů polymeru založených na polymléčné-ko-glykolové kyselině a pět různých vstupních koncentrací dexametazonu pro každý polymer. U připravených nanočástic byla hodnocena enkapsulační efektivita, velikost, polydisperzita a zeta potenciál. Zkoumal se vliv vstupní navážky dexametazonu a typu polymeru na enkapsulaci dexametazonu do nanočástic.

Bylo zjištěno, že navážka dexametazonu ovlivňuje jeho enkapsulaci do nanočástic. Nevyšší enkapsulační efektivita bylo dosaženo při navážce 0,6 mg a nejvyššího drug-load při navážce 1,5 mg dexametazonu na 30 mg polymeru. Nejlepších výsledků enkapsulace dexametazonu bylo dosaženo při použití větveného polymeru. Velikost a zeta potenciál připravených nanočástic splňovaly požadavky pro cílení do makrofágů.

# ABSTRACT

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralové**

**Department of Pharmaceutical Technology**

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

**Student:** Eliška Slowíková

**Title of thesis:** Study of physicochemical aspects influencing the properties of polymer particles

Polymeric biodegradable nanoparticles find application as carriers in targeted drug delivery, improve the pharmacokinetic profile of the drug and reduce its adverse effects. Macrophages are involved in the development of many inflammatory, autoimmune and other diseases and represent one of the potential therapeutic targets in the treatment of these diseases. For this reason, attention has been paid to the targeted delivery of anti-inflammatory drugs to macrophages using polymeric nanoparticles.

The passive targeting of nanoparticles to macrophages is dependent on their physicochemical properties. The use of nanoparticles with negative surface charge, hydrophobic character and size in the range of 100-300 nm is optimal.

In this work, dexamethasone-loaded nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method. Five different types of polymer based on polylactic-co-glycolic acid and five different initial concentrations of dexamethasone for each polymer were used to prepare the nanoparticles. The encapsulation efficiency, size, polydispersity and zeta potential were evaluated for the prepared nanoparticles. The effect of initial mass of dexamethasone and polymer type on the encapsulation of dexamethasone into nanoparticles was investigated.

It was found that the initial mass of dexamethasone affects its encapsulation into nanoparticles. The highest encapsulation efficiency was achieved at initial mass of 0.6 mg and the highest drug loading at initial mass of 1.5 mg of dexamethasone per 30 mg polymer. The best results of dexamethasone encapsulation were achieved using the branched polymer. The size and zeta potential of the prepared nanoparticles met the requirements for targeting to macrophages.

# SEZNAM ZKRATEK

ADEPT	antibody-directed enzyme prodrug therapy (protilátkou řízená enzymatická terapie pro léčivý)
AUC	plocha pod křivkou
EPR	zvýšená permeabilita a retence
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL	interleukin
MPS	mononukleárně fagocytický systém
NSAID	nesteroidní antiflogistika
PDI	index polydisperzity
PEG	polyethylenglykol
PLGA	polymléčná-ko-glykolová kyselina
PLGA 75/25	Purasorb PDLG 7002A
PLGA 50/50A	Purasorb PDLG 5002A
PLGA 50/50E	Purasorb PDLG 5002E
PLGA A2	PLGA větvená pomocí 2% přídavku kyseliny polyakrylové
PLGA T3	PLGA větvená pomocí 3% přídavku kyseliny tripentaerytritolu
RES	retikuloendoteliální systém
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy alfa



# 1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

V posledních několika dekáдах je věnována velká pozornost cílené distribuci léčiv, která umožňuje přesnější a selektivnější dodání léčiva do místa účinku. V porovnání s konvenční terapií přináší řadu výhod a zvyšuje bezpečnost terapie. Velký potenciál mají v této oblasti nanočástice jako nosiče léčiv. Enkapsulace léčiva do nanočástic může nejen zlepšovat jeho farmakologický profil, účinnost a bezpečnost, ale také umožňuje jeho distribuci do konkrétního terapeutického cíle.

Jedním z intenzivně zkoumaných terapeutických cílů jsou makrofágy, které hrají významnou roli v rozvoji řady zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Navíc buňky mononukleárně fagocytického systému mají tendenci přirozeně zachycovat terapeuticky podané nanočástice. Nanočástice s obsahem protizánětlivých léčiv tak mohou působením především na makrofágy regulovat rozvoj zánětlivých procesů.

Mezi významná protizánětlivá léčiva patří glukokortikoidy, jejichž použití je limitováno množstvím nežádoucích účinků a nevhodnými farmakokinetickými vlastnostmi. Jejich inkorporace do vhodné formulace pro cílenou distribuci by mohla pomoci tyto bariéry překonat a rozšířit možnosti jejich terapeutické aplikace.

Uplatnění jako nosiče léčiv nachází zejména biokompatibilní a bioodbouratelné nanočástice, které mohou být z organismu odstraněny prostřednictvím přirozených biologických procesů a jsou tak považovány za bezpečnější. V přípravě polymerních bioodbouratelných nanočástic je věnována značná pozornost kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové pro jeho výhodné vlastnosti jako nosiče léčiv.

Cílem této práce bylo připravit polymerní nanočástice založené na bioodbouratelných polyesterech, které by svými parametry byly vhodné pro cílené doručení imunosupresivního glukokortikoidu dexametazonu do prozánětlivých makrofágů. Tato práce se také zabývá vztahem mezi množstvím použitého dexametazonu a efektivitou procesu jeho enkapsulace v průběhu přípravy nanočástic. Dalšími hodnocenými parametry byla velikost a polydisperzita vzniklých nanočástic a jejich povrchový náboj.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Cílená distribuce léčiv

Cílená distribuce léčiv představuje způsob, jak doručit léčivo v potřebném množství do požadované cílové tkáně, orgánu, nebo skupiny buněk. Pro řadu onemocnění již byla vyvinuta léčiva, jejichž použití v praxi však často brání jejich nízká koncentrace v místě účinku, nespecifická toxicita a další faktory související s jejich působením v necílových tkáních. [1] Formulace pro cílenou distribuci přinášejí nové možnosti, jak překonat nedostatky konvenční terapie. Zaměřují se zejména na dosažení dostatečné koncentrace léčiva v požadovaném místě, bezpečnost a účinnost terapie.

Při vývoji formulace pro cílený transport léčiv je potřeba nejprve nalézt vhodnou cílovou strukturu. V závislosti na onemocnění se může jednat o orgán, tkáň, buňky nebo různé cíle na sub-celulární úrovni. Tato cílová tkáň nebo populace buněk musí být dostatečně odlišná od okolní tkáně, aby bylo možné těchto rozdílů využít pro zacílení distribuce pomocí vhodného nosiče. Je třeba, aby zvolený transportní systém zajišťoval doručení léčiva ve stabilní formě a zachoval si odolnost vůči působení imunitního systému a dalším nespecifickým interakcím během distribuce. [2]

Cíleného podání léčiv lze kromě přímé aplikace v místě účinku dosáhnout použitím vhodného nosiče. Ideální formulace pro cílenou distribuci umožňuje dosažení cílové struktury při současné minimální kumulaci v ostatních tkáních. Inkorporace léčiva do nosiče nebo navázání na něj neovlivňuje účinnost léčiva v cílové struktuře a zároveň ideální transportní systém poskytuje léčivu ochranu před vnějšími vlivy (např. imunitní systém, pH, enzymy), které by mohly vést k jeho předčasné inaktivaci nebo degradaci. Kromě toho by enkapsulované nebo konjugované léčivo nemělo negativně ovlivňovat nosič, inaktivovat jeho ligandy nebo snižovat jeho schopnost dosáhnout místa účinku. [1]

Jedním z hlavních přínosů formulací pro cílenou distribuci je zvýšení terapeutické účinnosti a snížení nespecifické toxicity léčiva. Toxicita často souvisí s nízkým terapeutickým indexem léčiva a nutností podávat vysoké dávky, aby bylo dosaženo terapeutických hladin v místě účinku. Cílená distribuce umožňuje dosáhnout dostatečně

vysokých hladin léčiva v cílové tkáni už při podávání nižších celkových dávek a zároveň omezuje toxické působení léčiva v necílových tkáních. Navíc formulace pro cílenou distribuci léčiv umožňují nejen zlepšení a kontrolu farmakokinetických a farmakodynamických vlastností, ale mohou přinášet také možnosti řízeného a dlouhodobého uvolňování léčiva z nosiče. Snížení dávky, prodloužení dávkových intervalů, omezení nežádoucích účinků a zjednodušení léčby pak může vést nejen ke snížení nákladů terapie, ale také ke zvýšení compliance pacientů. [2]

Podle způsobu, kterým probíhá, lze cílený transport léčiv rozdělit na pasivní a aktivní. Aktivní targeting je založen na afinitě ke specifickému receptoru. Této afinitě je dosaženo vhodnou modifikací nebo funkcionalizací léčiva nebo jeho nosiče. Vhodný ligand je volen podle konkrétního onemocnění a cílové struktury, roli zde může hrát např. vyšší přítomnost určitých buněk nebo receptorů v patologické tkáni v porovnání s fyziologickou. Používané ligandy mohou mít charakter např. proteinů, protilátek, polysacharidů nebo malých molekul. [3, 4]

Pasivní targeting je naopak založen na fyzikálně-chemických vlastnostech nosiče. Využívá se zde skutečnosti, že některá onemocnění mění vlastnosti struktur v organismu a vytváří tak příležitost pro kumulaci formulací s vhodnými fyzikálně-chemickými charakteristikami. Například nádory mají často omezenou lymfatickou drenáž a zároveň vytvářejí cévní síť s množstvím fenestrací v cévním epitelu, které umožňují extravazaci nosičů léčiv a jejich kumulaci v nádorové tkáni. [2] K uvolnění léčiva v cílové tkáni mohou přispívat také tzv. vnitřní stimuly (např. snížené pH v důsledku patologických procesů). [1] Kromě toho mohou mít formulace pro cílený transport léčiv tendenci přirozeně se kumulovat v některých biologických strukturách na základě svých fyzikálně-chemických vlastností jako např. velikost nebo povrchové vlastnosti (náboj, hydrofobicita). V důsledku těchto vlastností jsou nanočástice často rozpoznány imunitním systémem jako tělu cizí látky, což vede k jejich vychytávání buňkami mononukleárního fagocytického systému (Mononuclear Phagocytic System, MPS) a následné kumulaci zejména v játrech nebo slezině. [5, 6]

### **2.1.1 Cílená distribuce v terapii nádorových onemocnění**

Nádorová onemocnění patří celosvětově mezi jednu z hlavních příčin úmrtí. Během patogeneze nádoru dochází k přeměně normálních buněk v patologické, prakticky

nesmrtelné a nekontrolovatelně rostoucí buňky. Základní terapeutické přístupy zahrnující chirurgické odstranění, radioterapii a chemoterapii představují sice první volbu v terapii nádorových onemocnění, mají však řadu limitací a nevýhod, které vytváří potřebu inovativních léčebných metod. Konvenční chemoterapie působí nespecificky nejen v rakovinných ale také ve zdravých tkáních, což vede k řadě nežádoucích účinků (např. imunosuprese, myelosuprese, nauzea, sekundární neoplazmata). Cílená distribuce léčiv do rakovinné tkáně pomáhá překonat limity konvenčních protinádorových léčiv zahrnujících nízkou rozpustnost ve vodě, nespecifickou toxicitu nebo nízkou koncentraci léčiva v místě účinku. [7]

Národové buňky a nádorová tkáň se liší od fyziologického prostředí. Během patogeneze dochází v rakovinných buňkách k rozvoji odlišných signálních drah, vystavení jiných receptorů nebo jejich jiného množství v porovnání s fyziologickou tkání. Rychlý a nekontrolovatelný růst nádoru, potřeba přísunu velkého množství živin a kyslíku a odvodu odpadních látek vede k překotné neoangiogenezi a produkci látek zvyšujících permeabilitu cév. Nedostatečné cévní zásobení odlehlých částí nádoru může vést ke vzniku hypoxického prostředí až k nekróze. [1, 8] Právě odlišnost mikroprostředí nádorů od zdravých tkání představuje patofyziologické prostředí využitelné pro cílenou distribuci léčiv.

### **2.1.1.1 Enhanced permeability and retention (EPR)**

Často používanou strategií je pasivní targeting. Ten mimo jiného využívá efektu zvýšené permeability a retence, tzv. EPR efektu (z anglického enhanced permeability and retention). Proces novotvorby cév zajišťujících dostatečné zásobení rychle rostoucí nádorové masy probíhá u většiny solidních tumorů. Tato rychlá angiogeneze vede ke vzniku abnormální struktury cév zásobujících tumor. [7] Cévní stěna se vyznačuje absencí bazální membrány a vznikem fenestrací v endoteliální vrstvě umožňujících extravazaci makromolekul a částic v patřičném velikostním rozmezí. [9] Ke zvýšené propustnosti cév dále přispívá nadměrná produkce některých mediátorů jako např. bradykininu, vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, oxidu dusnatého nebo metaloproteináz. [8] Dále dochází v nádorové tkáni k tvorbě dysfunkčních lymfatických cév vedoucí k nedostatečné lymfatické drenáži. Právě

zvýšená prostupnost cév a snížený lymfatický průtok vytváří ERP efekt a umožňují pasivní targeting do nádorové tkáně. [7]

Jako nosiče pro cílený transport léčiv se zde často využívají nanočásticové nosiče zahrnující lipozomy, polymerní nanočástice, dendrimery nebo anorganické nanočástice. Zatímco jejich prostupu do zdravých tkání brání cévní endotel s těsnými spoji, fenestrace cév zásobujících tumor umožňují jejich extravazaci. [7] Mezi faktory ovlivňující EPR efekt patří architektura cév, přítomnost fagocytů, složení intersticiální tekutiny a extracelulární matrix nebo přítomnost nekrotických oblastí tumoru a dále vlastnosti nosiče jako velikost, tvar, povrchové vlastnosti a náboj. [1, 8]

Využití EPR efektu jako strategie pro cílenou distribuci léčiv je limitováno řadou faktorů. Jedním z nich je heterogenita nádorové tkáně. Byla pozorovaná větší kumulace nanočástic v periferních částech solidních tumorů a horší prostup léčiv do centrálních oblastí. Navíc nerovnoměrná vaskulární síť zásobující tumor vede k nerovnoměrné distribuci nanočástic. Do některých, zejména nekrotických, oblastí tumoru se pak nanočástice nedostávají vůbec. [7, 10] K nerovnoměrnému transportu léčiv do nádorů přispívá také heterogenní perfuze a další bariéry intersticiální matrix snižující penetraci nosiče do nádorové tkáně. [11] Jednou z těchto bariér je tlak intersticiální tekutiny, který působí proti prostupu nanoformulací do struktury nádoru. Při růstu nádoru navíc dochází k většímu průniku plazmy a proteinů do intersticia, čímž se tento tlak bránící extravazaci makromolekul zvyšuje. [7]

Důležitou roli při průchodu přes fenestrace kapilár hraje velikost nanočástic. Dobrou extravazaci poskytují nanočástice menší než 200 nm [7], jako prahová hodnota se pak udává velikost 400 nm. [8] Dalším významným faktorem je povrchový náboj. Obecně platí, že čím delší biologický poločas, k tím větší kumulaci léčiva v důsledku EPR efektu dochází. S rostoucí velikostí přítomného náboje se zvyšuje také zachycování nanočástic v buňkách retikuloendoteliálního systému (RES) případně v mononukleárních fagocytech. Záporný povrchový náboj může biologický poločas zkracovat, prodlužovat nebo ho nemusí ovlivnit vůbec, kladný náboj obvykle vede ke zkrácení plazmatického poločasu. Navzdory kratšímu plazmatickému poločasu jsou však kladně nabitě částice dobře kumulovány v nádorové tkáni. Tento jev je spojován s elektrostatickými interakcemi mezi kladným nábojem nanočástic a záporným nábojem oligosacharidů na povrchu nádorových buněk. [8]

### **2.1.1.2 Aktivní targeting nádorových onemocnění**

Druhým přístupem používaným v cílené distribuci léčiv do rakovinné tkáně je aktivní targeting. Navázání specifické struktury na nosič s léčivem umožňuje přesnější zacílení prostřednictvím navázání na konkrétní receptor. Vzniká tak potenciál využití této strategie i u nesolidních tumorů (např. leukémie). [11] Jako molekulární cíle jsou vybírány receptory, které jsou specifické pro daný typ nádoru nebo které nádorové buňky vystavují ve větším množství v porovnání s fyziologickými. Aktivní targeting tak může být zprostředkovaný protilátkami nebo ligandy různého charakteru, např. vitaminy (folát, thiamin, biotin, kobalamin), glykoproteiny (transferin), fosfolipidy (lecitin), proteiny a peptidy (albumin, protilátky) nebo nukleovými kyselinami. [1, 7] Kromě využití specifických ligandů pro přesnější cílení nosičů jako jsou nanočástice, lze navázat specifickou strukturu přímo na léčivo. Tento způsob se používá k vytvoření konjugátů protilátka-léčivo, kde protilátka zajišťuje specifickou distribuci do nádoru. [12]

### **2.1.2 Cílená distribuce v terapii zánětlivých onemocnění**

Cílený transport léčiv představuje slibný terapeutický přístup také v léčbě zánětlivých onemocnění. S výhodou zde mohou být použity nanočástice jako nosiče léčiv, protože jsou často specificky vychytávány imunitními buňkami, což vede k jejich kumulaci v zánětlivých tkáních, které jsou imunitními buňkami často infiltrované. Systémově podané nanočástice jsou často v důsledku svých fyzikálně-chemických vlastností vychytávány RES nebo prostřednictvím makrofágů odstraňovány ze systémové cirkulace. [13]

Makrofágy jsou součástí přirozené imunity a významně se podílejí na udržování homeostázy v organismu. Monocyty, prekurzory makrofágů, vznikají z hematopoetických kmenových buněk. Cirkulující monocyty pak mohou infiltrovat místa infekce, zranění nebo zánětu, kde působením mediátorů dochází k jejich diferenciaci, nebo se mohou usadit v některých orgánech (např. játra, plíce) jako tkáňové makrofágy. [14] Makrofágy hrají ústřední roli v zánětlivých procesech a jejich regulaci. Pomáhají odstraňovat patogeny, mrtvé buňky, tělu cizí látky, podílí se na regulaci cytokinů a zánětlivé odpovědi i jejím ukončení a regeneraci. V případě některých onemocnění jako např. rakovina, autoimunitní nebo kardiovaskulární

onemocnění však může dojít k deregulaci zánětlivého procesu při kterém se makrofágy podílí na rozvoji patologického procesu či poškozujícího zánětu. [15]

### **2.1.2.1 Makrofágy jako regulátory zánětu a terapeutický cíl**

Makrofágy jako významné regulátory zaujímají místo v rozvoji zánětlivé reakce i v regeneračních procesech. Podle jejich působením rozlišujeme fenotyp M1 a M2, který vyjadřuje pro- nebo protizánětlivé nastavení makrofágů. [16] V závislosti na okolním prostředí a působících faktorech (např. cytokinech, bakteriálních lipopolysacharidech nebo dalších mediátorech) se nediferencovaný makrofág může polarizovat v prozánětlivý M1 nebo protizánětlivý M2 fenotyp, případně přejít z jednoho fenotypu do druhého. [17] Polarizace ve fenotyp M1 nebo M2 není striktní, některé makrofágy mohou produkovat jak M1, tak M2 markery, nebo v rámci jednoho onemocnění mohou být přítomny zároveň oba fenotypy. Kromě základních fenotypů je pak u M2 makrofágů rozlišováno několik subtypů. [16]

Prozánětlivé M1 makrofágy se polarizují v reakci na mikrobiální produkty, zánětlivé cytokiny a mediátory [např. interferon- $\gamma$ , faktor nádorové nekrózy  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )]. [14] Vyznačují se produkcí prozánětlivých chemokinů a cytokinů [např. interferon  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interleukin (IL) 12, IL-23], reaktivních forem dusíku a kyslíku, a naopak nízkou expresí protizánětlivého IL-10. Uplatňují se v boji proti patogenům a odstraňování poškozené tkáně, zároveň ale mohou přispívat k rozvoji autoimunitních onemocnění. [16]

K polarizaci v protizánětlivý M2 fenotyp přispívají např. glukokortikoidy, IL-4, IL-10, IL-13 nebo některé molekulární struktury typické pro patogeny. [14] M2 makrofágy se podílí na remodelačních a regeneračních procesech, jsou ale také spojovány s růstem nádorů a metastáz. Ve větší míře produkují protizánětlivý IL-10, naopak exprese IL-12 a IL-23 je u tohoto fenotypu nízká. [16]

Rovnováha mezi pro- a protizánětlivým působením makrofágů je zásadní pro udržení homeostázi a terapeutické zásahy za účelem jejího obnovení představují potenciální řešení řady onemocnění. Cílená distribuce léčiv do makrofágů umožňuje selektivně ovlivnit zánětlivé procesy, polarizaci makrofágů a jejich patologické působení. Léčiva pro cílenou distribuci jsou zkoumána v terapii autoimunitních onemocnění jako revmatoidní artritida, nespecifické střevní záněty, roztroušená skleróza, lupus

erythematoses nebo diabetes mellitus 1. typu, dále v terapii nádorů, jaterních nebo jiných chronických zánětů. [16, 17] Z toho důvodu jsou vyvíjeny formulace pro cílený transport, které by zajistily dostatečnou účinnost a specifickou imunomodulaci. Uplatnění zde nachází zejména nano-nosiče, které umožňují specifické cílení do makrofágů zprostředkované jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi nebo navázáním ligandů. [14, 16]

Vlastnosti nanočástic ovlivňující cílený transport do makrofágů zahrnují náboj, velikost nebo tvar. Zároveň může v *in vivo* podmínkách docházet ke změnám vlastností nanočástic působením faktorů vnějšího prostředí, které mohou významný způsobem ovlivnit jejich výslednou interakci s makrofágy. [15]

Jednou z důležitých vlastností nano-nosičů je jejich náboj. Nabité nanočástice jsou fagocytovány ve větší míře v porovnání s částicemi bez náboje. [18]

Makrofágy preferenčně rozpoznávají záporný náboj. Negativně nabité nanočástice poskytující dobrou internalizaci do makrofágů jsou tak vhodnou volbou pro cílení do těchto buněk. [14]

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím cílený transport nanočástic do makrofágů je jejich velikost. Obecně se udává, že makrofágy jsou schopny specificky rozpoznat a fagocytovat nanočástice o velikosti 100 nm – 3  $\mu$ m. [15, 19] Optimální velikost nanočástic však závisí na více faktorech včetně konkrétního typu cílové buňky a dalších specifických vlastností formulace. Bylo pozorováno, že částice menší než 100 nm mají tendenci unikat pozornosti fagocytů MPS. S rostoucí velikostí nanočástic (v rámci určitého rozmezí) se pak míra jejich fagocytózy zvyšuje. [14, 19] Některé studie uvádí jako vhodnou pro distribuci do makrofágů velikost 800 nm [6], nebo dokonce velikost v řádu mikrometrů (1,9  $\mu$ m). [15] V případě peritoneálních makrofágů byla pozorována lepší fagocytóza 500nm nanočástic v porovnání s menšími nanočásticemi [15], naopak ke kumulaci v MPS jater a sleziny dochází zejména u nanočástic v rozmezí 150–300 nm. [20] Navíc se v závislosti na velikosti mění i způsob internalizace částic do buněk. Zatímco u menších částic (<100 nm) převládá endocytóza, u větších částic je obvyklým mechanismem fagocytóza. [19]

Kromě velikosti připravených nanočástic jako takových je třeba brát v úvahu tzv. kontextuální velikost. Ta zahrnuje působení prostředí organismu po podání *in vivo*, které může vést např. k agregaci nanočástic, jejich degradaci nebo adsorpci sérových



proteinů. Vazba plazmatických proteinů na povrch nanočástic a tvorba tzv. korony výrazně ovlivňuje biologické vlastnosti nosiče. [5] Kromě změny farmakokinetických vlastností, biologické distribuce, intracelulárního transportu léčiv a biologického poločasu může přítomnost proteinové korony také maskovat specifické ligandy navázané na povrch částic. [11] Podle typu navázaných proteinů může být ovlivněna také interakce nanočástic s makrofágy. Zatímco albumin internalizaci do makrofágů snižuje, často dochází k adsorpci komplementu nebo imunoglobulinů, tzv. opsonizaci, která vede k výraznému zvýšení kumulace v makrofázích. [15, 18]

Adsorpce plazmatických proteinů závisí zejména na velikosti, náboji a hydrofobicitě povrchu. Menší částice s větší povrchovou energií jsou více náchylné nejen k agregaci, ale právě i k tvorbě proteinové korony, která může až několikanásobně zvýšit jejich velikost. [5] K výraznější adsorpci proteinů a opsonizaci vede také přítomnost náboje, ať už kladného nebo záporného. Se zvyšujícím se nábojem tak roste i interakce s makrofágy. [21] Hydrofobní částice jsou rozpoznávány imunitní systémem jako tělu cizí látky, což vede k jejich rychlé fagocytóze a odstraňování ze systémové cirkulace prostřednictvím makrofágů zejména v játrech a slezině. Z toho důvodu jsou nanočástice cílené na jiné struktury než makrofágy velmi často povrchově upravovány, aby se předešlo jejich rychlé opsonizaci a prodloužil se jejich biologický poločas a schopnost dosáhnout cílové tkáně. Nejčastěji se povrch modifikuje prostřednictvím hydrofilního polymeru polyethylenglykolu (PEG). Naopak pokud je cílem léčba zprostředkovaná makrofágy, je hydrofobní charakter nanočástic žádoucí. [6, 21]

Zlepšit selektivní distribuci nanočástic do makrofágů lze také prostřednictvím navázání specifických ligandů na jejich povrch. Mezi cílové struktury, které lze pro transport léčiv do makrofágů využít, se řadí scavengerové a manózoové receptory, integriny nebo Fc-receptory. Ligandy navázané na povrch nanočásticových formulací pak mívají často charakter peptidů, protilátek nebo lektinů. [14]

## **2.2 Nosiče léčiv pro cílenou distribuci**

Nosič léčiva pro cílenou distribuci představuje specifickou molekulu, která zjišťuje doručení léčiva do požadovaného místa účinku. Ideální nosič by měl být netoxický, biokompatibilní, biodegradovatelný, neimunogenní, fyzikálně i chemicky stabilní a biochemicky inertní. Dále by měl zajišťovat kontrolované a předvídatelné

uvolňování léčiva v cílové struktuře a minimální únik léčiva před jejím dosažením. Mezi další požadavky patří snadné odstranění z organismu a jednoduchá a finančně nenáročná příprava. V případě konjugátů nosič-léčivo představuje nosič specifický ligand propojený s léčivem prostřednictvím linkeru, druhou významnou skupinu pak tvoří částicové nosiče. [2]

### 2.2.1 Konjugáty

Konjugáty jsou obvykle tvořeny nosičem, linkerem a samotným léčivem. Linker zajišťuje stabilitu konjugátu během transportu v organismu, zároveň se ale jedná o biodegradovatelnou strukturu, která umožňuje uvolnění léčiva v místě potřeby.

S výhodou jsou používány konjugáty léčivo-ligand, kde ligandem může být např. monoklonální protilátka, peptid, protein nebo aptamer zajišťující aktivní targeting do požadovaného místa. Výhodou monoklonálních protilátek nebo jejich fragmentů jako nosičů léčiv je jejich vysoká selektivita ke specifickému antigenu a často se používají pro cílenou distribuci do nádorů. Jako proteinové nebo peptidové nosiče jsou voleny struktury s vysokou afinitou k antigenu specifickému pro cílovou tkáň. Jejich výhodou v porovnání s protilátkami je nižší molekulová hmotnost a lepší permeabilita přes biologické membrány. [1]

Další skupinu konjugátů představují konjugáty polymer-léčivo, kde nosič tvoří ve vodě rozpustná polymerní struktura. Mezi používané polymery patří N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid, poly-L-glutamová kyselina nebo PEG. Léčivo je k polymernímu nosiči vázáno kovalentní vazbou přes linker, který je specificky štěpen v cílové tkáni např. pomocí hydrolýzy, enzymatického rozkladu nebo odlišného pH v případě pH-senzitivních linkerů. [22, 23]

Specifický způsob použití konjugátů pro cílenou distribuci představuje protilátkou řízená enzymatická terapie proléčiv, tzv. ADEPT (z anglického antibody-directed enzyme prodrug therapy). Protilátka zde slouží jako nosič pro cílenou distribuci enzymu do požadované tkáně, ve které enzym aktivuje následně podané proléčivo. [24]

## 2.2.2 Částicové nosiče

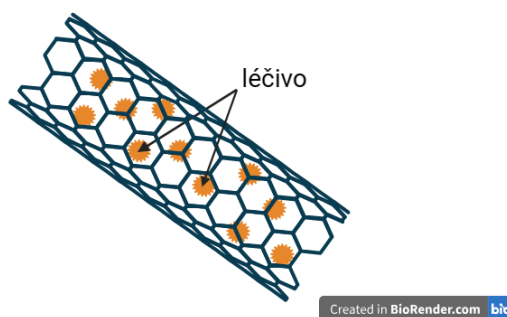
Částicové nosiče umožňují cílenou distribuci prostřednictvím enkapsulace léčiva dovnitř částic nebo jeho konjugací či adsorpcí na povrch částice. [6] Částicové nosiče poskytují ochranu léčivu před vnějšími vlivy a jejich distribuce závisí zejména na fyzikálně-chemických vlastnostech nosiče. Ještě přesnějšího cílení pak lze dosáhnout úpravou povrchu částic navázáním specifických ligandů. [2] Uplatnění v cílené distribuci léčiv nachází zejména nanočástice, kterým malá velikost umožňuje snadnou extravazaci, penetraci přes biologické membrány, intracelulární transport a které jsou na rozdíl od mikročástic vhodné pro intravenózní podání. [25]

Nanočástice jsou koloidní nosiče jejichž velikost se pohybuje v rozmezí několik až několik set nanometrů. Obecně se jedná o částice menší než 1  $\mu\text{m}$ . Dělí se na částice anorganické a organické, které zahrnují polymerní a lipidové nosiče. [10]

### 2.2.2.1 Anorganické nanočástice

Nanočástice mohou být tvořeny anorganickými materiály jako je uhlík, křemík, zlato, stříbro a další kovy.

Uhlík může být použit pro syntézu uhlíkových nanotyčinek (Obrázek 1), tubulárních struktur o délce 1–100 nm, nebo nanodiamantů, částic různého tvaru menších než 100 nm s unikátními vlastnostmi (např. povrchové elektrostatické vlastnosti, inertní jádro). Využití nachází nejen v cílené distribuci léčiv ale i v zobrazovacích metodách. [23]



Obrázek 1: Struktura uhlíkové nanotyčinky jako nosiče léčiva; vytvořeno pomocí biorender.com

Výhodou křemíkových nanočástic jsou jejich specifické povrchové vlastnosti a porozita. Velký povrch pokrytý polárními skupinami umožňuje navázání dalších funkčních skupin, adsorpci vody a zajišťuje stabilitu částic. Navíc mají křemíkové vysoce porézní nanočástice přirozenou schopnost interagovat s nukleovými

kyselinami, případně lze povrchové póry vyplnit stimuli-responzivními molekulami zajišťujícími selektivnější cílení a uvolnění léčiva v místě potřeby. [23]

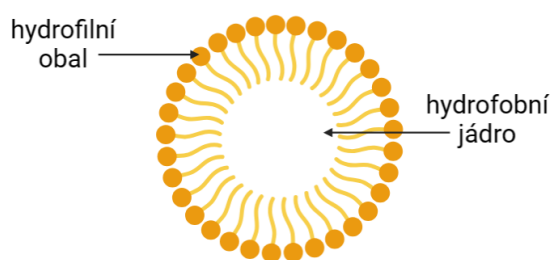
Pro kovové nanočástice se používají např. kobalt, nikl, stříbro, zlato, železo nebo jejich oxidy. Specifické vlastnosti některých kovů poskytují nanočásticím vlastní terapeutický účinek. Např. stříbrné nanočástice jsou používány pro své antimikrobiální vlastnosti, zlaté nanočástice nacházejí uplatnění terapii nádorů. Kromě toho se kovové nanočástice používají jako nosiče léčiv. Mezi jejich výhody patří stabilita, biokompatibilita, případně magnetické vlastnosti, které lze využít pro přesnější cílení v organismu působením vnějšího magnetického pole. [1, 23]

Specifickou skupinu nanočástic v cílené distribuci léčiv představují kvantové tečky (anglicky quantum dots). Jedná se o nanočástice o velikosti 2–100 nm s fluorescentními vlastnostmi. Jejich struktura se skládá z jádra tvořeného jedním typem polovodiče (obvykle CdSe) a obálky tvořené jiným polovodičem (obvykle ZnS). Jejich optické vlastnosti a schopnost produkovat fluorescenci umožňují jejich využití v zobrazovacích metodách ke značení buněk nebo jiných nanočástic a ve sledování distribuce léčiv. [26]

### **2.2.2.2 Lipidové nanočástice**

Velká pozornost je věnována nosičům na bázi lipidů. Vhodné jsou zejména fyziologické, biokompatibilní a biodegradovatelné lipidy s nízkou toxicitou. Lipidové formulace zahrnují micely, lipozomy, pevné lipidové nanočástice a nanostrukturované lipidové nosiče. [27]

Micely jsou tvořeny amfifilními molekulami lipidů s polární hlavičkou a hydrofobní částí, kterou obvykle tvoří uhlíkový řetězec mastných kyselin. Hydrofilní obal oklopuje hydrofobní jádro, které umožňuje enkapsulaci léčiv (struktura micely znázorněna na Obrázku 2). Micely samovolně vznikají po překročení kritické micelární koncentrace v roztoku. Kritická micelární koncentrace také charakterizuje stabilitu micel, kdy nižší hodnota kritické micelární koncentrace znamená vyšší stabilitu micel. V porovnání s lipozomy mají micely vzhledem ke své nižší velikosti kratší biologický poločas. [28]

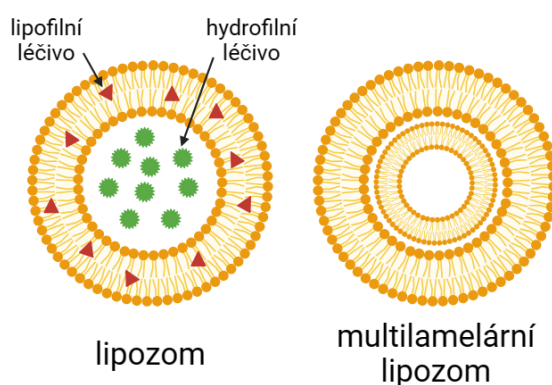


Created in BioRender.com bio

Obrázek 2: Struktura micely;  
vytvořeno pomocí biorender.com

Lipozomy jsou částice tvořené lipidovou dvojvrstvou obklopující hydrofilní jádro, do kterého lze inkorporovat léčivo. Velikost se obvykle pohybuje mezi 50–1000 nm a kromě základního typu lipozomů existují i složitější multilamelární struktury (Obrázek 3) s větším množstvím dvojvrstev. Uspořádání lipozomů umožňuje transport jak hydrofilních léčiv v hydrofilním jádře, tak lipofilních léčiv jejich inkorporací do lipidové dvojvrstvy. Další výhodou lipozomů je jejich schopnost spojit se s buněčnou membránou a uvolnit tak obsah do buněčné cytoplazmy. Mezi nevýhody patří nízká stabilita, krátký biologický poločas a riziko předčasného úniku léčiva. [10, 14, 23]

Pevné lipidové částice jsou koloidní disperze umožňující enkapsulaci hydrofilních i lipofilních léčiv. Jedná se o částice o velikosti 10–1000 nm tvořené lipidovou maticí, která je při fyziologické teplotě pevná. [23]



Created in BioRender.com bio

Obrázek 3: Struktura uni- a multilamelárního lipozomu;  
vytvořeno pomocí biorender.com

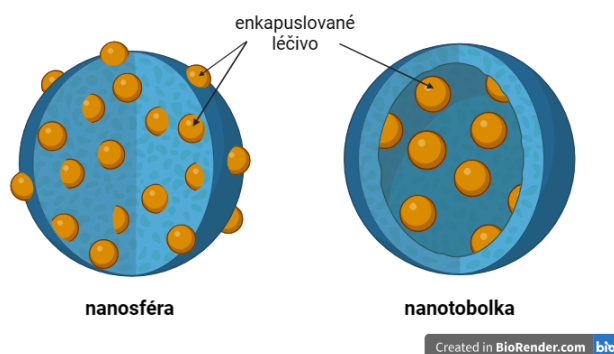
Nanostrukturované lipidové nosiče jsou tvořeny směsí pevných a kapalných lipidů. Navzdory přítomnosti kapalných lipidů zůstává jejich matrice při pokojové teplotě

také pevná. V porovnání s pevnými lipidovými částicemi mohou do své struktury pojmout větší množství léčiva a lépe brání jeho úniku během skladování. [27]

### 2.2.2.3 Polymerní nanočástice

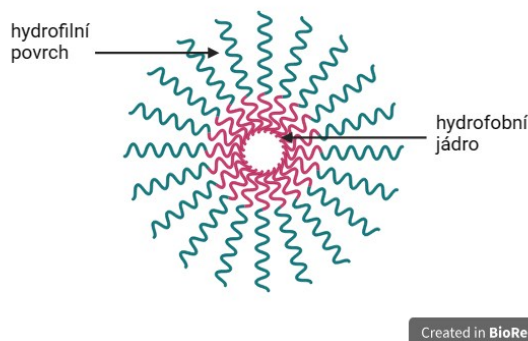
Polymery přinášejí řadu výhodných vlastností, pro které jsou často používány v přípravě nanočástic. Uplatnění nachází polymer přírodní, polosyntetické i syntetické. Přírodní polymery používané pro přípravu nanočástic zahrnují např. želatinu, albumin, algináty, celulózu nebo dextran, mezi polosyntetické patří chitosan nebo deriváty celulózy. Ze syntetických polymerů jsou využívány zejména polymer kyseliny mléčné, glykolové a kopolymer polymléčná-ko-glykolová kyselina (PLGA), polykaprolakton nebo kyselina polyglutamová. [1, 23, 29]

Pro přípravu polymerních nanočástic lze využít řadu metod např. emulzní odpařovací metodu, nanoprecipitaci, vysolování nebo ionickou gelaci, které umožňují přípravu nanočástic s požadovanými vlastnostmi nebo kontrolovaným uvolňováním. Dle struktury pak lze nanočástice rozdělit na nanotobolky a nanosféry. V případě nanotobolek tvoří polymer membránu, která obklopuje jádro s obsahem léčiva, v nanosférách je léčivo rovnoměrně dispergováno celým objemem nanočástice (Obrázek 4). [23]



Obrázek 4: Struktura nanosféry a nanotobolky;  
vytvořeno pomocí biorender.com

Polymerní micely (Obrázek 5) jsou tvořeny amfifilními kopolymery a vznikají po překročení kritické micelární koncentrace v roztoku. Jedná se o micely menší než 100 nm vhodné zejména pro transport hydrofobních léčiv. Zatímco transport léčiva umožňuje hydrofobní jádro micely, hydrofilní povrch přispívá k ochraně před zachycením v MPS nebo RES. [30]

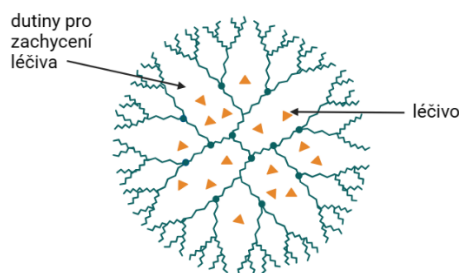


Obrázek 5: Struktura polymerní micely;  
vytvořeno pomocí biorender.com

Proteinové nanočástice zahrnují částice podobné virům, které se morfoloogicky podobají virové struktuře, ale neobsahují virový genetický materiál, a dále nanočástice tvořené proteiny (např. albuminem, želatinou nebo kolagenem). Proteinové nanočástice nachází uplatnění zejména v cílené distribuci do nádorových tkání.

Nanogely jsou tvořeny zesíťnými polymery. Jedná se o částice gelu menší než 100 nm, které mají schopnost v kontaktu s tekutinou bobtnat. Zesíťená struktura umožňuje inkapsulaci léčiv, poskytuje dobrou ochranu před předčasným únikem léčiva a umožňuje tak cílené podávání léčiv. [23]

Rozvětvená, organizovaná polymerní struktura charakterizuje dendrimery (struktura dendrimeru znázorněna na Obrázku 6). Jedná se o vysoce monodisperzní polymerní částice o velmi malé velikosti (1–100 nm). Dutiny vzniklé ve struktuře polymeru umožňují inkorporaci léčiva a jeho cílenou distribuci. Povrchové funkční skupiny mohou být případně modifikovány za účelem ještě specifitějšího cílení. Mezi polymery používané pro přípravu dendrimerů patří polyamidoamin, poly(propylenimin), polyethery, polyestery a další. [31] Díky své malé velikosti mohou dendrimery prostupovat do buněk obvykle prostřednictvím endocytózy. Jejich biokompatibilita, vysoká rozpustnost ve vodě, rozvětvená struktura a velký povrch umožňují efektivní a bezpečný přenos léčiv. [28]



Obrázek 6: Struktura dendrimeru;  
vytvořeno pomocí biorender.com

### 2.2.3 Biodegradovatelné nosiče

S rozvojem nanomedicíny a použití nosičů pro cílenou distribuci se otevírá také otázka bezpečnosti použitých formulací pro lidský organismus. Z toho důvodu je věnována velká pozornost biokompatibilním a biodegradovatelným nosičům, které zajišťují vysokou bezpečnost *in vivo*. Centrem zájmů se stávají zejména takové materiály, kterou zajišťují stabilitu během cirkulace, minimální toxicitu a imunogenicitu a mohou být rozloženy a odstraněny z těla běžnými biologickými procesy. [28, 32]

Postupný rozklad biodegradovatelných materiálů také umožňuje kontrolované uvolňování inkorporovaného léčiva. Rychlost degradace je přitom ovlivněna řadou faktorů, ať už vlastnostmi nosiče jako velikost, struktura nebo molární hmotnost, tak vnějšími vlivy jako pH nebo teplota. [28]

Nevýhodou řady anorganických nosičů (např. uhlíkové, křemíkové, kovové) je právě obtížná degradace a riziko toxického působení v organismu. Pro přípravu anorganických biodegradovatelných částic mohou být voleny minerály, které se v lidském organismu přirozeně vyskytují (např. v kostech a zubech) a vyznačují se tak vysokou biokompatibilitou a biodegradovatelností. Mezi ně patří např. fosforečnan vápenatý, uhličitan vápenatý, uhličitan hořečnatý nebo křemičitan vápenatý. Syntetické nosiče léčiv tvořené těmito minerály mohou být v lidském organismu rozloženy působením běžných metabolických procesů na netoxické ionty. Kromě toho jsou takové struktury obvykle náchylné na změny pH a mohou tak být použity jako pH-responzivní systémy. Iontový charakter minerálů navíc umožňuje snadnou adsorpci léčiv na povrch částic působením elektrostatických sil. [33]



Lipidy jsou s oblibou používány pro syntézu biodegradovatelných cílených formulací. Patří mezi tělu vlastní látky a jsou proto považovány za vysoce bezpečné. Navíc podobnost struktury lipidových nosičů léčiv s buněčnými membránami umožňuje jejich splynutí a snadné uvolnění léčiv do cytoplasmatického prostoru. V přípravě lipidových nosičů nachází uplatnění fosfolipidy jako fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol nebo fosfatidylethanolamin. Jedná se o netoxické, neimunogenní a nehemolytické materiály s vysokou biokompatibilitou. [28]

Velký potenciál v oblasti syntézy nanočástic pro terapeutické účely mají také biodegradovatelné polymery. Jejich netoxičita a biokompatibilita ve spojení s výhodami nanočásticových formulací jako zvýšená biologická dostupnost, cílená distribuce nebo kontrolované uvolňování léčiva, otevírají široké možnosti jejich využití v oblasti medicíny. [34] Původně byly pro přípravu nanočástic používané nebiodegradovatelné polymery (např. polyakrylamid, polystyren, polymethylmethakrylát), u kterých však bylo nutné zajistit účinnou clearance z těla, aby se zabránilo jejich kumulaci a toxickému působení v organismu. [35] Z toho důvodu je více pozornosti věnováno biodegradovatelným polymerům, které zahrnují polymerní struktury jak syntetického původu (např. kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, polykarpolaktony), tak přírodního původu (např. albumin, želatina, kolagen, alginát nebo chitosan). [36] Proti přírodním polymerům, které se často vyznačují nízkou čistotou a jejichž zesíťovaná struktura může vést k denaturaci obsažených léčiv, nabízí syntetické polymery lepší vlastnosti, pro které jsou v řadě studií intenzivně zkoumány. [6] Na rozdíl od přírodních polymerů také umožňují delší uvolňování léčiva, jejich nevýhodou ale může být použití organického rozpouštědla při syntéze. [36]

Přírodní polymery zahrnují polysacharidové i proteinové polymerní struktury. Polysacharidy jsou tvořeny monosacharidovými jednotkami propojenými O-glykosidickou vazbou. V organismu obvykle dochází k jejich enzymatické degradaci na oligosacharidy nebo monomerní jednotky. [28, 37] V případě chitosanu, kationického polymeru, dochází k rozkladu zejména působením lysozymu. Chitosan se vyznačuje dobrou absorpcí, permeabilitou a nízkou toxicitou a je náchylný ke změnám pH a teploty. Poslední zmíněné vlastnosti sice negativně ovlivňují jeho stabilitu, ale lze je využít při cílení do tkání s pH nebo teplotou odlišnými

od fyziologického prostředí. [28] Kyselina hyaluronová představuje biokompatibilní, neimunogenní mukopolysacharid. Její struktura umožňuje snadné navázání ligandů, zesílení struktury nebo další modifikace a je tak využívána v cílené distribuci léčiv i pro další terapeutické účely. V organismu je rozkládána působením metaloproteináz nebo volných radikálů. [37] Další polysacharidy používané jako nosiče léčiv zahrnují např. škrob, dextran nebo alginát, které jsou obvykle rozkládány působením lysozymu nebo amyláz.

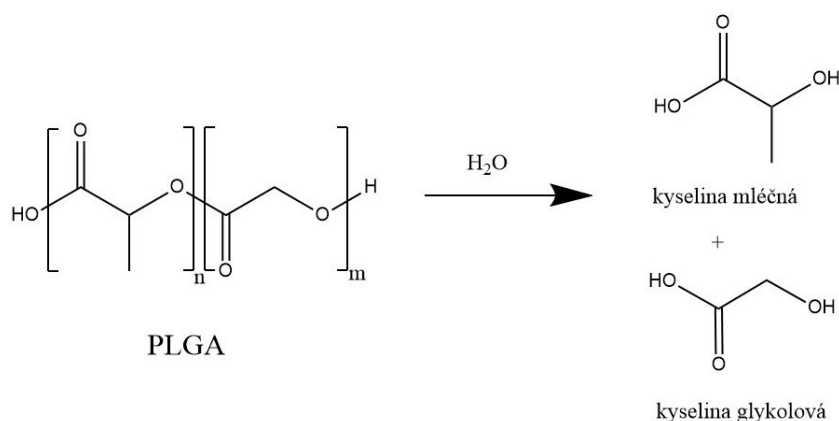
Základ proteinů tvoří aminokyseliny propojené prostřednictvím peptidových vazeb. Jejich degradace probíhá prostřednictvím enzymatického působení nebo hydrolyzy. [38] Želatina představuje denaturovaný protein získaný z živočišného kolagenu. Při enzymatické degradaci nevznikají žádné škodlivé vedlejší produkty, navíc je stabilní a snadno modifikovatelná a představuje tak vhodný materiál pro různé klinické aplikace včetně cílené distribuce léčiv. [28] Mezi další přírodní proteinové polymery patří albumin, vysoce kompatibilní, netoxický a neimunogenní protein vhodný pro přípravu nanočástic nebo kolagen, biopolymer přirozeně se vyskytující jako součást extracelulární matrix. [38]

Ze syntetických polymerů lze jmenovat polykaprolakton, který je degradován hydrolyzou esterových vazeb. Polykaprolakton je schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a používá se v cílené distribuci léčiv i dalších terapeutických aplikacích. [28, 38] Mezi nejčastěji používané polymery pro přípravu biodegradovatelných nosičů dále patří polymléčná a polyglykolová kyselina a jejich kopolymer PLGA. [6]

#### **2.2.4 PLGA nanočástice**

PLGA je syntetický vysoce biokompatibilní a biodegradovatelný polymer schválený FDA i Evropskou lékovou agenturou jako nosič léčiv pro parenterální i další použití. [39] Význačné místo mezi dalšími biokompatibilními polymery zaujímá díky dlouholeté klinické zkušenosti, vlastnostem umožňujícím postupné uvolňování, možnosti povrchových úprav a cílení do konkrétních tkání i dobře popsáním metodám jeho formulace s různými léčivy do sofistikovaných lékových forem. [39, 40] Jako biodegradovatelný je polymer v lidském těle rozkládán na biokompatibilní a netoxické produkty, které mohou být následně odstraněny prostřednictvím běžných

metabolických procesů. [40] Degradace PLGA (Obrázek 7) probíhá prostřednictvím hydrolýzy, která vede k rozkladu na jeho monomerní jednotky, kyselinu mléčnou a glykolovou. Obě tyto kyseliny jsou tělu vlastní a jsou následně metabolizovány prostřednictvím Krebsova cyklu. [39]



*Obrázek 7: Degradace PLGA;  
vytvořeno pomocí biorender.com*

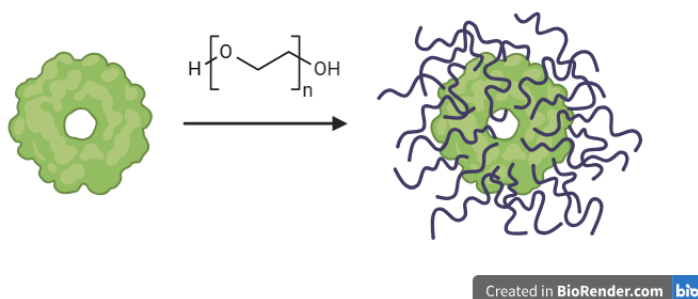
Protože kyselina mléčná obsahuje chirální uhlík, může existovat v podobě dvou optických izomerů. PLGA pak obvykle obsahuje stejný poměr obou těchto enantiomerů, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti jsou navíc prakticky totožné. Různé formy PLGA jsou obvykle rozlišovány na základě poměru kyseliny mléčné a glykolové. Větší poměr kyseliny mléčné v PLGA polymeru vede kvůli přítomnosti postranní methylové skupiny ke snížení absorpce vody, zvýšení lipofility a pomalejší degradaci. [40]

#### 2.2.4.1 Využití PLGA nanočástic

Hydrofobní charakter PLGA způsobuje, že jsou PLGA nanočástice rozpoznávány organismem jako tělu cizí látky. Na povrch nanočástic se navazují bílkoviny krevní plasmy, dochází tak k opsonizaci částic a jejich následné internalizaci do fagocytů. Zvýšené vychytávání PLGA nanočástic buňkami MPS a kumulaci v makrofázích lze využít při cílení léčiv do místa zánětu. PLGA nanočástice tak mohou sloužit jak nosiče v terapii zánětlivých onemocnění zahrnujících revmatoidní artritidu, Crohnovu chorobu, zánětlivá plicní nebo oční onemocnění. [39]

Ve farmakokinetice a interakci nanočástic s buňkami hraje významnou roli také povrchový náboj. Při endocytóze interagují se záporně nabitou buněčnou membránou lépe pozitivně nabitě částice, u kterých kladný náboj umožňuje také únik z lyzozomů

a tedy cílení do cytoplazmy. Záporný náboj pak vede spíše ke kumulaci v lyzozomech a zvyšuje vychytávání nanočástic makrofágy prostřednictvím fagocytózy. [21, 39] PLGA poskytuje záporný povrchový náboj, který lze změnit prostřednictvím povrchových úprav pomocí kationických látek. Nejčastěji se k povrchové modifikaci používá PEG, přičemž PEGylace umožňuje maskování povrchové náboje, což prodlužuje poločas cirkulace v krevní plazmě a snižuje rozpoznání částic buňkami imunitního systému (schématické znázornění PEGylace nanočástice viz Obrázek 8). Další látky používané k úpravě povrchu nanočástic zahrnují chitosan nebo poloxamery. [39] Zatímco v případě některých onemocnění mohou být maskování PLGA nanočástic před buňkami imunitního systému nebo změna povrchového náboje důležité pro cílení do požadované struktury, v jiných případech představují přirozené vlastnosti PLGA výhodu. Jak hydrofobní charakter, tak záporný náboj PLGA přispívá k internalizaci nanočástic do makrofágů a je tak vhodnou volbou v případě cílení právě do těchto struktury. [21]



Obrázek 8: Schématické znázornění procesu PEGylace nanočástice; vytvořeno pomocí biorender.com

PLGA nanočástice nachází uplatnění v oblasti cílené distribuce nízkomolekulárních léčiv, proteinů, genů, vakcín i v zobrazovacích technologiích a teranostice, která kombinuje cílenou distribuci diagnostického i terapeutického činidla. Do PLGA nanočástic byla úspěšně enkapsulována řada protinádorových léčiv, např. doxorubicin, paklitaxel, 9-nitrokamptotecin, cisplatina nebo 5-fluorouracil. Jsou také vhodným nosičem dexametazonu, který je používán v různých indikacích zejména pro své protizánětlivé působení. Uplatnění dále nachází PLGA nanočástice jako nosiče protizánětlivých léčiv, hormonů, kardiovaskulárních léčiv i v dalších oblastech medicíny. Pro své výhodné vlastnosti patří PLGA mezi nejvíce zkoumané a úspěšně používané polymery v cílené distribuci léčiv. [34, 39]

#### **2.2.4.2 Příprava PLGA nanočástic**

PLGA nanočástice mohou sloužit jako nosiče nízkomolekulárních hydrofobních i hydrofilních léčiv i makromolekul. Dle charakteru léčiva i dalších požadovaných vlastností nanočástic lze použít různé metody syntézy. Mezi nejčastěji používané patří emulzní odpařovací metoda a nanoprecipitace vhodné zejména pro hydrofobní léčiva. PLGA nanočástice s obsahem hydrofilních léčiv lze připravit pomocí modifikované emulzní odpařovací metody za použití vícenásobné emulze. Další používané metody syntézy zahrnují např. sprejové sušení nebo vysolování. Zvolená metoda syntézy a její parametry ovlivňují vlastnosti výsledných nanočástic. Roli zde hraje i způsob navázání léčiva, které může být inkorporováno do nanočástice během syntézy, nebo adsorbováno na povrch připravených nanočástic. [39, 41]

Jednou z překážek použití PLGA pro přípravu nanočástic s obsahem léčiv může být kyselý charakter monomerních jednotek tohoto polymeru. Kyselé prostředí, které může vznikat při degradaci nanočástic v organismu, může v případě některých léčiv náchylných na změny pH způsobit jejich inaktivaci. Příkladem takových léčiv jsou proteiny, u kterých může přítomnost karboxylových skupin v PLGA a vznik kyselých degradačních produktů vést k agregaci nebo bránit jejich uvolňování ze struktury nanočástice. Tomu lze předcházet použitím stabilizačních činidel nebo dalších metod pro zvýšení stability proteinů. [34]

### **2.3 Léčiva pro cílenou distribuci**

V řadě případů neumožňuje konvenční farmakoterapie a transport léčiva organismem v jeho volného formě dosažení požadovaných terapeutických účinků. Mezi vlastnosti limitující terapeutickou účinnost a využitelnost léčiv v praxi patří krátký biologický poločas, špatná rozpustnost ve vodě, nízká stabilita, nízká specifita, velký distribuční objem, úzký terapeutický index, přítomnost nežádoucích účinků nebo potřeba podání vysokých dávek. [2] Takováto léčiva pak mohou být vhodnými kandidáty pro cílenou distribuci.

Jedním z hlavních důvodů selhání moderní terapie je nízká rozpustnost léčiv ve vodě. Nově vyvíjené molekuly se často vyznačují vysokou lipofilitou, velkou molekulovou hmotností a s tím související nízkou rozpustností ve vodném prostředí. Téměř polovina registrovaných a přes 90 % nově vyvíjených léčiv jsou ve vodě špatně rozpustné látky.

Nízká rozpustnost léčiv pak často vede k nízké biologické dostupnosti a nedostatečné distribuci léčiva do místa potřeby. [42]

K nízké biologické dostupnosti přispívá také nízká permeabilita a rychlá clearance léčiva z organismu. U molekul náchylných k hydrolýze, enzymatickému rozkladu nebo rychle metabolizovaných v játrech může být dosaženo lepších účinků díky použití formulací pro cílenou distribuci, které léčivu poskytnou ochranu před vnějšími vlivy a metabolickou degradací. [43, 44]

Léčivé látky s častými nebo závažnými nežádoucími účinky nebo vysokou toxicitou představují další skupinu, kde podávání volného léčiva nemusí být vhodné. Vyšší výskyt nežádoucích účinků je často způsoben nutností podávat vysoké dávky léčiva pro dosažení požadovaného účinku. Selektivní transport do cílových tkání a zlepšení farmakokinetických vlastností použitím formulací pro cílenou distribuci tak přispívá ke snížení potřebné dávky a tím i k omezení nežádoucích účinků. [7, 44]

Náchylné k nežádoucímu toxickému působení jsou také léčiva s úzkým terapeutickým indexem, kde je rozdíl mezi terapeutickou a toxickou dávkou minimální. [45] Cílená distribuce zde může přispět ke zmírnění fluktuace hladin léčiva v krvi, zvýšení jeho bezpečnosti, minimalizaci výskytu nežádoucích účinků a tím i k lepší compliance pacientů. [44]

Přestože většina léčiv může mít užitek z cílené distribuce, ne všechna jsou pro tento proces vhodná. Cílená distribuce nepřináší řešení u molekul, které mají stejné místo účinku i toxicity. Naopak selektivnější transport do tohoto místa může nežádoucí účinky zhoršit. Také u léčiv, která jsou navzdory selektivní distribuci z cílové struktury odstraňována příliš rychle na to, aby mohla působit, nevede cílená distribuce k požadovanému účinku. Kromě toho existují léčiva, které mají přirozeně vysokou selektivitu k cíli působení (např. terapeutické protilátky) a z toho důvodu není třeba využívat nosiče pro cílenou distribuci. [46]

V ostatních případech může cílená distribuce přinést řadu výhod jako je ochrana léčiva před rozkladem, optimalizaci farmakokinetických vlastností hydrofobních i hydrofilních léčiv, omezit kolísání hladin léčiva, snížit toxicitu a umožnit různé cesty podání léčiva. [47]

## 2.4 Příklady léčiv pro cílenou distribuci

Jak již bylo zmíněno, z cílené distribuce může těžit naprostá většina léčiv, zvláště přínosná je pak u léčiv s vysokou toxicitou, špatnými farmakokinetickými vlastnostmi nebo u léčiv selhávajících z důvodu nedostatečné koncentrace v místě potřeby. Výzkum cílené distribuce se tak zaměřuje zejména na oblast cytostatik, protizánětlivých léčiv, antiinfektiv a moderních léčiv náchylných k degradaci (peptidy, proteiny, geny).

### 2.4.1 Cytostatika

Protinádorová léčiva se vyznačují vysokou cytotoxicitou, která je často nespecifická. Toxickému působení jsou tak vystaveny nejen nádorové, ale i zdravé buňky, což vede k výskytu nežádoucích účinků. Kromě častých potíží jako nauzea, zvracení, alopecie nebo kožní potíže se mohou vyskytnout i závažné nežádoucí účinky, např. poškození srdce, ledvin nebo jater. Navíc má řada cytostatik nízký terapeutický index, což pravděpodobnost toxického působení ve zdravých tkáních ještě zvyšuje. Dalším limitem konvenční chemoterapie je často nízká kumulace léčiva v nádorové tkáni. Nedostatečná koncentrace v místě účinku pak může vést k selhání terapie. Roli zde hraje i skutečnost, že většina cytostatických chemoterapeutik má nevhodné farmakokinetické parametry. [48] Z těchto důvodů je cytostatikům ve vývoji formulací pro cílenou distribuci léčiv věnována velká pozornost.

Léčba antracykliny doxorubicinem a daunorubicinem bývá doprovázena nauzeou, zvracením, alopecií a kardiotoxicitou. Poškození srdeční tkáně závisí na kumulativní dávce a představuje závažný nežádoucí účinek, který může vést ke kardiomyopatii nebo srdečnímu selhání. U obou léčiv byly vyvinuty lipozomy pro cílenou distribuci za účelem snížení nepříznivých vedlejších účinků. Doxil®, PEGylovaný lipozom s doxorubicinem, byl prvním nanoléčivem schváleným FDA. Daunorubicin byl pak v lipozomální podobě registrován pod názvem DaunoXome®. [48]

Paklitaxel působí cytostaticky prostřednictvím polymerizace tubulů. Kromě nežádoucích účinků komplikuje jeho použití také špatná rozpustnost ve vodě. Z toho důvodu jsou vyvíjeny nosiče pro cílenou distribuci jako lipozomy nebo konjugáty např. s kyselinou listovou, nenasycenými MK nebo kyselinou hyaluronovou, které zajišťují jeho přesnější zacílení do nádorové tkáně. [48, 49] Např. Abraxane® je

formulace proteinových nanočástic s paklitaxelem schválený FDA k použití u nemalobuněčného plicního karcinomu a karcinomu prsu. [12]

Formulace pro cílenou distribuci jsou předmětem studií i u dalších cytostatických léčiv. Lipozomy a konjugáty jsou zkoumány u mitoxantronu za účelem zlepšení terapeutické účinnosti, lepší kumulace v nádorové tkáni, prodloužení biologického poločasu a snížení kardiotoxicity. U kyseliny all-trans-retinové by mohly lipozomy zajistit lepší biologickou dostupnost a ochranu před fotodegradací. [48, 49] Další výhody nabízí cílená distribuce např. v případě vinkaalkaloidů, cytarabinu nebo irinotekanu. [12]

## 2.4.2 Antiinfektiva

Další skupinou léčiv, které je věnována pozornost v oblasti výzkumu cílených distribučních formulací, jsou antiinfektiva. I když jsou tyto látky samy o sobě do značné míry specifické k cílové struktuře, pojí se s jejich použitím potíže, které by cílené distribuční formulace mohly pomoci překonat. Konvenční terapie přináší kromě nežádoucích účinků také riziko vzniku rezistence. Nedostatečná koncentrace léčiva uvnitř buněk často vede k neefektivní terapii nitrobuněčných organismů. Zvyšování dávek za účelem zlepšení účinnosti je pak spojeno také s vyšší toxicitou. [50, 51]

Možnou strategií k překonání limitů konvenční terapie je cílená distribuce. Cílem je dosažení dostatečné koncentrace a retence léčiva v místě účinku a vysokých intracelulárních dávek zajišťujících dostatečnou účinnost a nízkou toxicitu. [51]

Antibiotika představují široce využívanou skupinu antimikrobiálních léčiv. Hlavní řešení antibiotické rezistence zahrnuje racionální užití antibiotik a vývoj nových léčiv, ke zvýšení účinnosti stávající terapie ale mohou přispět i formulace pro cílenou distribuci. Nanoléčiva doručující antibiotika do cílových struktur přináší proti konvenční terapii výhody jako vyšší stabilitu a rozpustnost, delší biologický poločas, lepší průchod epitelem, vyšší biologickou dostupnost a minimalizaci nežádoucích účinků. Mohou také poskytovat ochranu před enzymatickým rozkladem a tím překonávat bakteriální rezistenci. [52]

Předmětem výzkumu jsou např. fluorochinolony. Při jejich enkapsulaci do zlatých nanočástic byla pozorována nižší potřebná minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. Stříbrné nanočástice s ciprofloxacinem pak vedly ke zvýšení inhibice



a umožnily kontrolované uvolňování léčiva. [52] Vyvíjeny jsou také polymerní nanočástice nebo lipozomy s obsahem fluorochinolonů pro pasivní i aktivní targeting. [1]

Cílená distribuce antibiotik může přinést také vyšší účinnost v redukci bakteriálního biofilmu. V porovnání s volným léčivem dosáhly lipozomální gentamicin nebo nanočástice s obsahem oxacilinu či polymixinu B vyšší eradikace bakterií biofilmu. [52]

Konvenční antituberkulotická léčba je spojena s velkým množstvím nežádoucích účinků zahrnujících hepatotoxicitu, neurologické potíže, ototoxicitu, oční poškození, hyperurikémii, kožní reakce, flu-like syndrom, horečku nebo GIT potíže. Navíc je vzhledem k rezistenci potřeba přistupovat ke kombinační léčbě. Cílená distribuce antituberkulotik zlepšuje přístup léčiv tělními bariérami, vede k vyšší kumulaci v cílové tkáni, ochraně léčiva před degradací a snížení nežádoucích účinků. Navíc by mohla přispívat ke zjednodušení a zkrácení léčby a tím ke snížení rizika rozvoje rezistence. Z těchto důvodů jsou vyvíjeny např. PLGA nanočástice s obsahem rifampicinu nebo chitosanové nanočástice s obsahem bedachilinu. [53]

Cílená distribuce antivirotik s sebou přináší zejména výhody jako je lepší biologická dostupnost, snížení frekvence podávání a výskytu nežádoucích účinků a dále zlepšuje průchod léčiv do špatně dostupných oblastí jako např. přestup přes hematoencefalickou bariéru nebo do rezervoáru infekce. Pro cílenou distribuci antivirotik se používají zejména nanočástice, které mohou při navázání specifické struktury zajistit také aktivní targeting. Lepší kumulace v cílové tkáni dosáhly např. nanočástice s obsahem didanosinu nebo dendrimery s obsahem lamivudinu či efavirenzu. [54] Nízká perorální biologická dostupnost a absorpce acykloviru vedla k vývoji nanočástic s obsahem tohoto léčiva s cílem zlepšit jeho farmakokinetické vlastnosti. [55] Indinavir po enkapsulaci do lipozomů nebo pevných lipidových částic dosáhl vyšší intracelulární kumulace, nižší toxicity a imunogenicity. [54] Kromě zlepšení vlastností dalších běžně používaných antivirotik se mohou formulace pro cílenou distribuci potenciálně uplatnit jako nosiče moderních léčiv. RNA interference umlčující genovou expresi představuje slibnou strategii léčby virových onemocnění, její použití je však limitováno špatným průchodem přes biologické

bariéry. Možným řešením této nevýhody je zde právě cílená distribuce např. prostřednictvím nanočástic. [55]

Podobně jako u ostatních antiinfektiv, cílená distribuce antimykotik přispívá ke snížení nežádoucích účinků, zvýšení účinnosti a zlepšení farmakokinetických vlastností. Azolová antimykotika s lipofilní strukturou jsou špatně rozpustná ve vodě, což vede k nízké biologické dostupnosti. Za účelem dosažení vyšší účinnosti při systémovém podání jsou tak vyvíjeny polymerní nebo pevné lipidové nanočástice s obsahem azolů (např. itrakonazolem, vorikonazolem, klotrimazolem nebo flukonazolem.). Nanočástice jsou používány jako nosiče azolů také pro lokální použití pro dosažení lepší penetrace a retence, delšího působení nebo postupného uvolňování. Pro topické použití byly zkoumány např. lipozomy s obsahem mikonazolu a klotrimazolu, v případě flukonazolu byly vyvíjeny oční lipozomální formulace. [56]

Dobrych výsledků bylo dosaženo v případě cílené distribuce polyenových antimykotik. Amfotericin B, ve vodě špatně rozpustné antimykotikum, bylo při systémovém podání doprovázeno vysokou toxicitou (zejména nefrotoxicitou). FDA schválená lipozomální formulace Ambisome® vedla k omezení nežádoucích účinků. Další polyenové antimykotikum, nystatin, je vzhledem k nízké biologické dostupnosti a nežádoucím účinkům používán pouze lokálně. Lipozomální formulace tohoto léčiva by mohla vést k vyšší aktivitě a umožnit jeho systémové podávání. [56]

### **2.4.3 Protizánětlivá léčiva**

Protizánětlivě působící léčiva nachází uplatnění v terapii řady onemocnění zahrnujících revmatoidní artritidu, roztroušenou sklerózu, nespecifické střevní záněty jako Crohnova choroba a Ulcerózní kolitida, lokální záněty a další. Mezi hlavní skupiny známé pro své protizánětlivé působení patří nesteroidní antiflogistika (NSAID) a glukokortikoidy. [13, 57]

NSAID představují skupinu nejběžněji používaných protizánětlivých léčiv u akutních i chronických zánětů. Jejich použití limitují nežádoucí účinky jako nauzea, zvracení, abdominální bolest, pálení žáhy, bolesti hlavy a také některá závažnější rizika jako rozvoj žaludečních vředů, gastrointestinální krvácení nebo kardiotoxické působení. Cílená distribuce se nabízí jako možnost, jak výskyt nežádoucích účinků omezit. Jako vhodný způsob cílené distribuce se jeví enkapsulace NSAID do nanočástic.

Při perorálním podání je tak vytvořena ochranná bariéra mezi léčivem a žaludeční sliznicí, která chrání jak léčivo před degradací, tak žaludeční sliznici před poškozením. Jsou tak vyvíjeny např. pevné lipidové nanočástice s obsahem ibuprofenu nebo ketorprofenu, PLGA nanočástice s obsahem diklofenaku, chitosanové nanočástice s obsahem ibuprofenu nebo polykaprolaktonové micely s naproxenem. Kromě nanočástic lze využít i další způsoby cílené distribuce jako např. proléčivo ketorprofenu nebo konjugát s diklofenakem pro lokální použití. [57]

Glukokortikoidy jsou protizánětlivě působící léčiva s imunosupresivním a antiproliferačním efektem a nachází uplatnění zejména v léčbě chronických zánětů. Jejich dlouhodobé systémové podávání však může vést k rozvoji množství nežádoucích účinků. Mezi nejzávažnější patří rozvoj gastrointestinálních potíží vč. žaludečních vředů, dále deprese, svalová a kožní atrofie, osteoporóza, negativní metabolické důsledky (hyperglykémie, dyslipidemie), hypokalémie a s ní spojené arytmie nebo glaukom. [58] Kromě nespecifické distribuce, nežádoucích účinků a nízkých koncentrací v cílové tkáni komplikuje použití glukokortikoidů také jejich nízká rozpustnost ve vodě a s tím související krátký biologický poločas, rychlá degradace a renální clearance. Z těchto důvodů jsou glukokortikoidy vhodnými adepty pro cílenou distribuci. Vyvíjeny jsou např. lipozomy, polymerní nanočástice, konjugáty polymer-léčivo, anorganické nosiče nebo anorganicko-organické nanočástice s obsahem glukokortikoidů. [59]

#### **2.4.4 Peptidy, proteiny a geny**

Specifickou skupinou léčiv, která může profitovat z cílené distribuce jsou peptidy, proteiny a geny. Jedná se o struktury, které jsou často samy o sobě dostatečně specifické k terapeutickému cíli, ale jejich použití je limitováno jejich nestabilitou či náchylností k degradaci. Při konvenčních způsobech podání často nedosahují dostatečné biologické dostupnosti, podléhají rychlé degradaci plazmatickými enzymy, což vede ke krátkému biologickému poločasu, špatně prostupují přes membrány a mohou působit imunogenně. [60, 61] Nosiče pro cílenou distribuci zde tak plní roli zejména ochranného transportního systému, který brání předčasnou degradaci a tím umožňuje dosažení dostatečné koncentrace léčiva v cílové tkáni. Jsou tak vyvíjeny např. polymerní nebo lipidové nanočástice jako nosiče pro genovou terapii. [61] Dále

se lipozomy a nanočástice mohou uplatnit při distribuci růstových faktorů a hormonů proteinové struktury jako např. inzulin, kalcitonin nebo gonadorelin. [62, 63]

# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1 Použité suroviny

Aceton (PENTA s.r.o., Chrudim, ČR)

Acetonitril (ACN, PENTA s.r.o., Chrudim, ČR)

Dexametazon (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)

Polymléčná-ko-glykolová kyselina:

Purasorb PDLG 5002A, Purasorb PDLG 5002E, Purasorb PDLG 7002A (Corbion, Nizozemsko) (PLGA 50/50A, PLGA 50/50E, PLGA75/25), molární hmotnost ( $M_w$ ): 17 000 g/mol.

Větvené terpolymery, KFT FaF HK: PLGA A2 (větvená pomocí 2% přídavku kyseliny polyakrylové)  $M_w$ : 14 400 g/mol, PLGA T3 (větvená pomocí 3% přídavku kyseliny tripentaerytritolu)  $M_w$ : 17 400 g/mol.

Poloxamer 407: Puronic® F127 (Merck, Darmstadt, Německo)

Trehalóza (Merck, Darmstadt, Německo)

## 3.2 Přístrojové vybavení

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

Laboratorní váhy (Kern, Balingen, Německo), max. 400 g, d = 0,01 g

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

Centrifuga MPW 260R (Medical Instruments, Varšava, Polsko)

ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK)

HPLC ALS 1329A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

## 3.3 Použité metody

### 3.3.1 Příprava vodné fáze

Jako vodná fáze byl připraven 0,1% roztok poloxameru Pluronic® F-127 v čištěné vodě. K naváženému surfaktantu bylo přidáno potřebné množství čištěné vody

a roztok byl míchán na magnetické míchače do úplného rozpuštění surfaktantu. Poté bylo celkové množství vodné fáze rozděleno po 10 ml do 5 kádinek určených pro přípravu nanočástic s různými koncentracemi účinné látky.

### **3.3.2 Příprava organické fáze**

Organická fáze byla připravena navážením příslušného množství dexametazonu a 30 mg polymeru, které byly následně ve vialce rozpuštěny přidáním 1 ml acetonu. Celkem bylo použito pět druhů polymeru (PLGA 75/25, PLGA 50/50A, PLGA 50/50E, PLGA A2 a PLGA T3) a pro každý polymer bylo připraveno pět koncentrací dexametazonu v roztoku (0,5 %; 1 %; 2 %; 5 %; 10 % vztaženo na množství PLGA) odpovídajících navážkám 0,15 mg; 0,3 mg; 0,6 mg; 1,5 mg a 3 mg dexametazonu.

### **3.3.3 Příprava nanočástic**

Pomocí automatické pipety byl 1 ml organické fáze v jediném kroku přidán k 10 ml vodné fáze za stálého míchání (300 rpm) na magnetické míchače. Okamžitá tvorba nanočástic se projevila vznikem opalizující koloidní suspenze. Vzniklá suspenze nanočástic byla následně 120 minut míchána při laboratorní teplotě na magnetické míchače, aby došlo k úplnému odpaření organického rozpouštědla.

### **3.3.4 Filtrace**

Po odpaření organického rozpouštědla byla doplněna odpařená voda do 10 ml a následně byla suspenze přefiltrována přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 1,2  $\mu\text{m}$ , aby došlo k odstranění nežádoucích hrubých částic, zejména případných krystalů dexametazonu, který nebyl enkapsulován do nanočástic a vyskytoval se ve formě krystalů.

### **3.3.5 Centrifugace**

Přefiltrovaná suspenze byla přenesena do 2ml zkumavek typu eppendorf a centrifugována při teplotě 14 °C a otáčkách 15100 otáček/minutu po dobu 20 minut. Následně byl odstraněn supernatant a pelety nanočástic byl uchovány při -20 °C pro další měření.

### **3.3.6 Měření velikosti částic a PDI**

K měření velikosti částic byl použit ZetaSizer Nano ZS 90. Do kyvety byl umístěn vzorek suspenze nanočástic naředěný 1:10 (200  $\mu$ l přefiltrované suspenze nanočástic doplněno čistou vodou do 2 ml) a kyveta byla umístěna do přístroje, kde byl každý vzorek proměřen třikrát, přičemž každé měření zahrnovalo 12 nezávislých běhů. Viskozita media byla nastavena podle viskozity čisté vody a detekce intenzity rozptýleného světla probíhala pod úhlem zpětného rozptylu 173°. K výpočtu velikosti a PDI nanočástic byl použit protokol distribuce velikosti částic podle intenzity rozptýleného světla.

### **3.3.7 Měření zeta potenciálu**

Přefiltrovaná suspenze nanočástic byla naředěna v poměru 1:10 a takto naředěná suspenze byla pomocí injekční stříkačky aplikována do kyvety s elektrodami DTS 1070 (Malvern, Spojené Království) určené pro měření zeta potenciálu. Následně byla kyveta vložena do Zetasizeru. K měření byl použit mikroeletroforetický protokol, přičemž atenuátor byl nastaven do automatického režimu a měření každého vzorku v přístroji probíhalo třikrát.

### **3.3.8 Měření enkapsulovaného dexametazonu**

Množství enkapsulovaného dexametazonu bylo zjišťováno prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byla připravena kalibrační řada koncentrací 0,25–200  $\mu$ M roztoku dexametazonu v acetonitrilu (viz tabulka 1). Jednotlivé roztoky kalibrační řady byly připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 2 mM, který vznikl rozpuštěním navážky dexametazonu v acetonitrilu.

Tabulka 1: Kalibrační řada dexametazonu v acetonitrilu

Vzorek	Koncentrace [ $\mu\text{M}$ ]	Ředění [ $\mu\text{l}$ ]	Acetonitril [ $\mu\text{l}$ ]
1	0,25	1000 vzorku č. 2	3000
2	1	800 vzorku č. 3	3200
3	5	2000 vzorku č. 4	2000
4	10	1600 vzorku č. 5	2400
5	25	1000 vzorku č. 6	3000
6	100	2000 vzorku č.7	2000
7	200	400 zásobního roztoku	3600

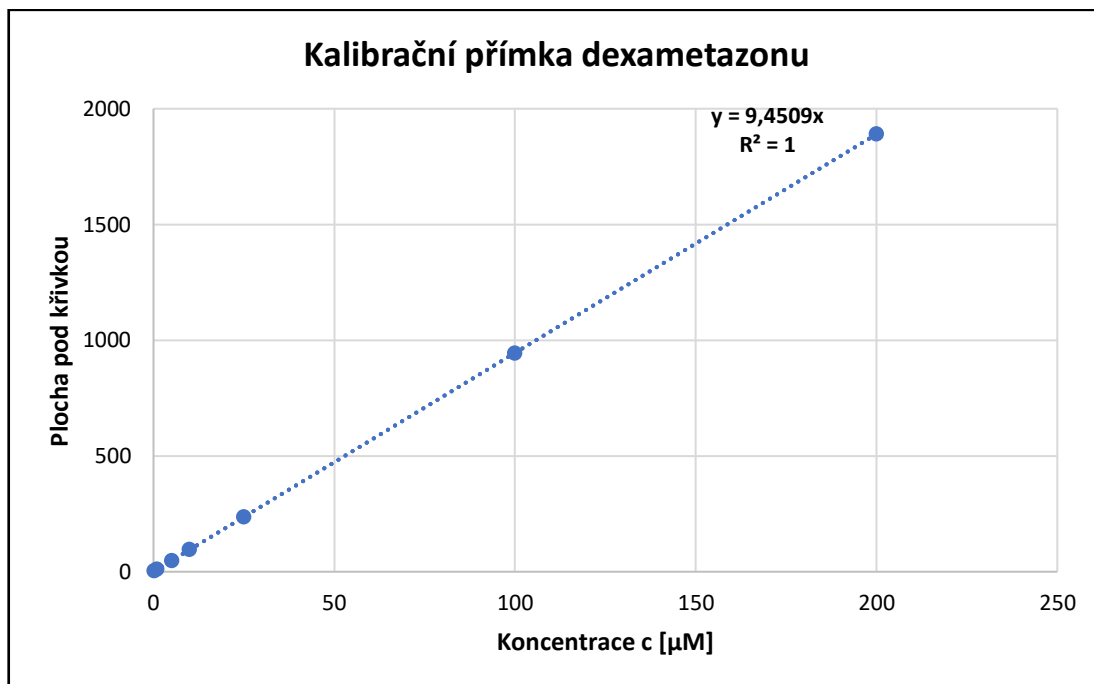
Každý vzorek pelety byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu. Následně probíhala centrifugace při 15100 otáčkách/minutu po dobu 20 minut. Pro nástřik na kolonu byl použit získaný supernatant.

Parametry HPLC:

- Kolona: Restek Ultra A se stacionární fází C18 150 x 4,6  $\mu\text{m}$  (velikost částic 5  $\mu\text{m}$ )
- Mobilní fáze: Acetonitril/voda (40/60)
- Retenční čas: 4,2 min
- Detekce: 238 nm
- Nástřik: 10  $\mu\text{l}$
- Průtok: 1 ml/min

Po proměření vzorků bylo vyhodnocováno množství dexametazonu na základě ploch pod píkem účinné látky. Byl sestaven graf závislosti plochy pod křivkou (AUC) vzorků kalibrační řady na koncentraci (Graf 1). Následným proložením grafu přímkou byla získána lineární funkce popisující závislost AUC dexametazonu na koncentraci spolu s hodnotou koeficientu determinace  $R^2$ . Stejný postup byl použit i u druhého měření.





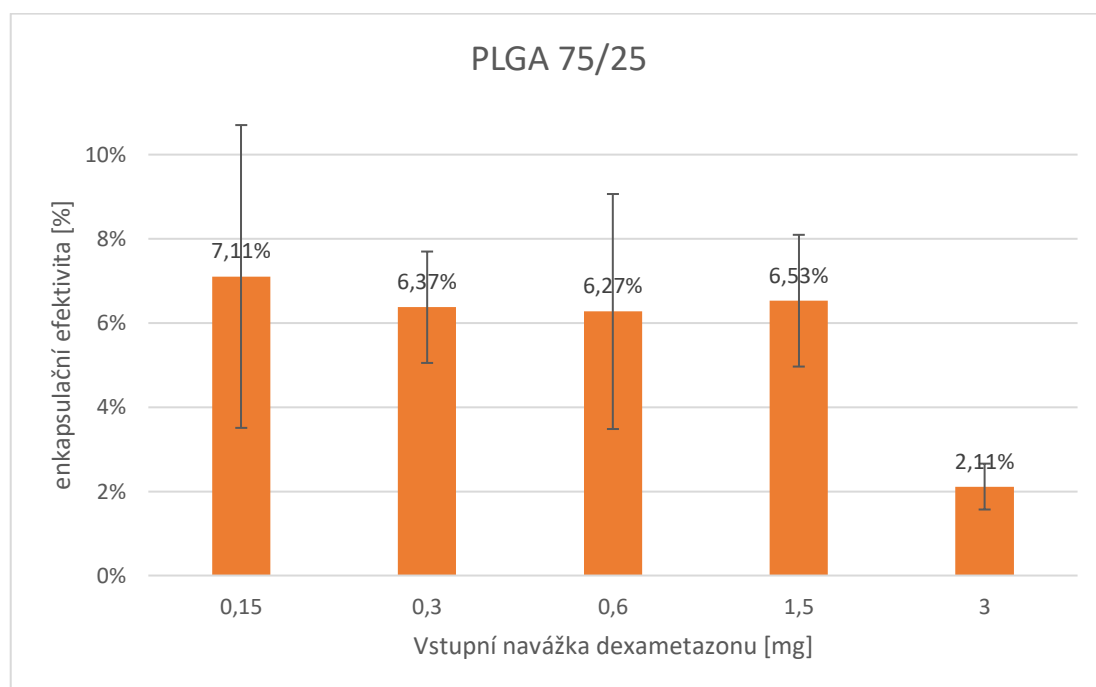
Graf 1: Kalibrační přímka dexametazonu (závislost AUC na koncentraci dexametazonu)

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

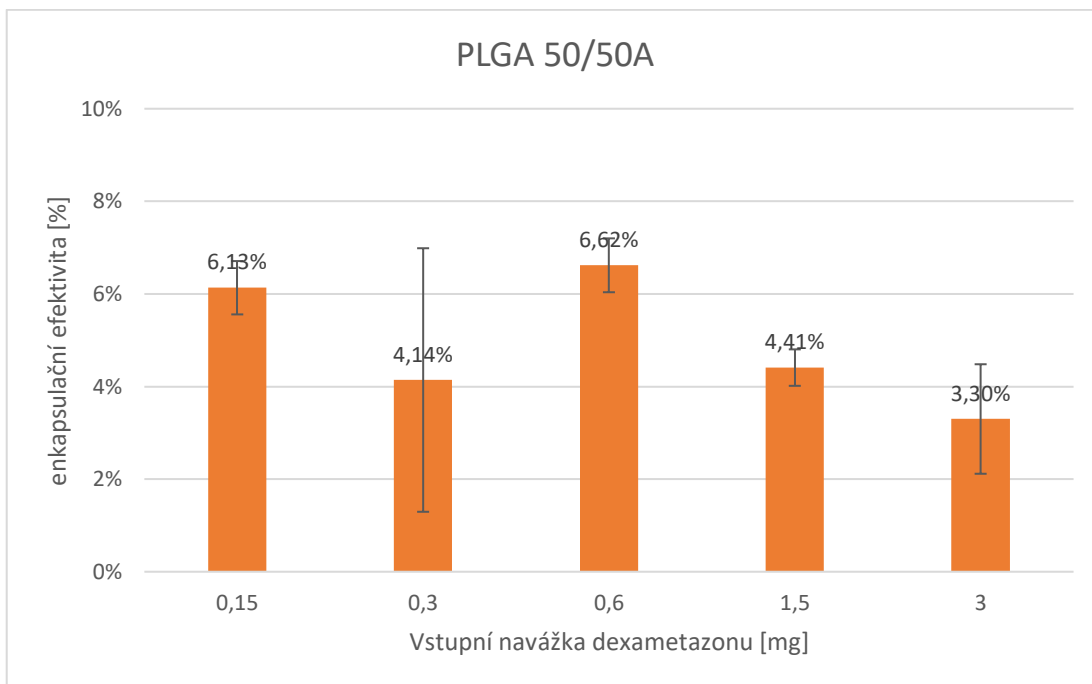
### 4.1.1 Vyhodnocení enkapsulace dexametazonu do nanočástic

Práce zkoumala, zda existuje nějaký vztah mezi vstupním množstvím dexametazonu a jeho relativní enkapsulací do PLGA nanočástic. Enkapsulace se vyhodnocovala u částic připravených z pěti typů PLGA. Jednalo se o lineární polymery PLGA 75/25 (poměr kyseliny mléčné a glykolové 75:25), PLGA 50/50A (ekvimolární poměr kyseliny glykolové a mléčné), oba s volnými karboxylovými skupinami, a polymer PLGA 50/50E, kde byly na rozdíl od obou výše zmíněných variant PLGA polymeru terminální karboxylové skupiny esterifikovány. Dále byly použity větvené polymery PLGA A2 s ekvimolárním zastoupením kyseliny mléčné a glykolové, větvený na polyakrylové kyselině a PLGA T3 větvený na tripentaerytritolu. U všech připravených nanočástic bylo dosaženo poměrně nízké enkapsulační efektivity, tj. do 10 % z původního množství použitého dexametazonu. Výsledky enkapsulační efektivity dexametazonu pro jednotlivé polymery jsou znázorněny v grafech 2–6.

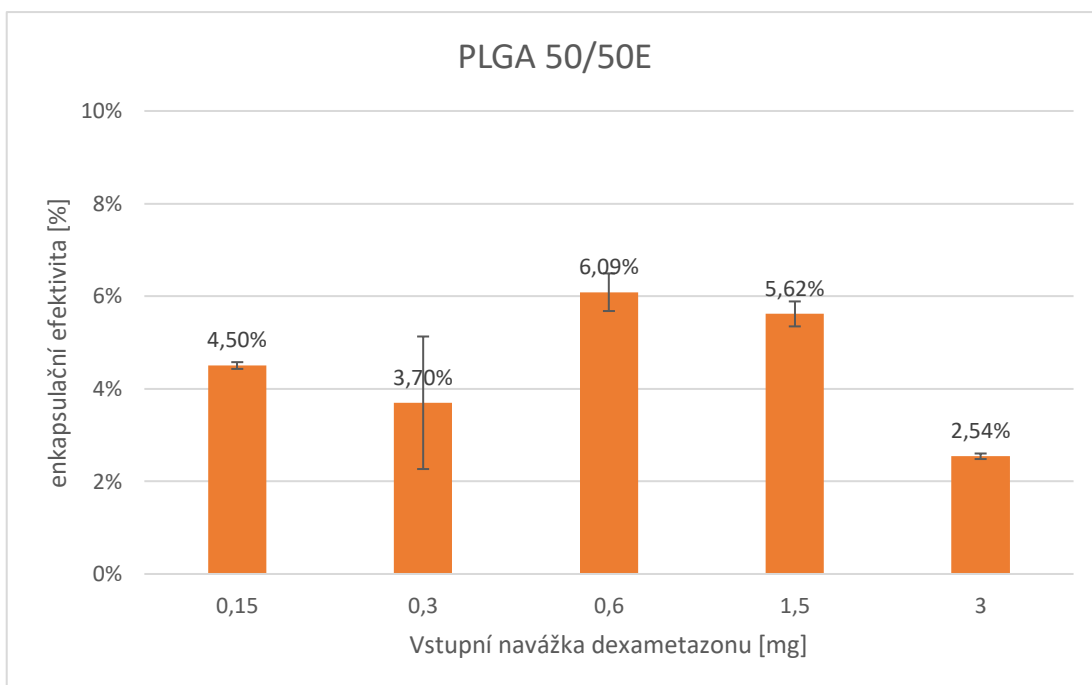
#### 4.1.1.1 Enkapsulační efektivita



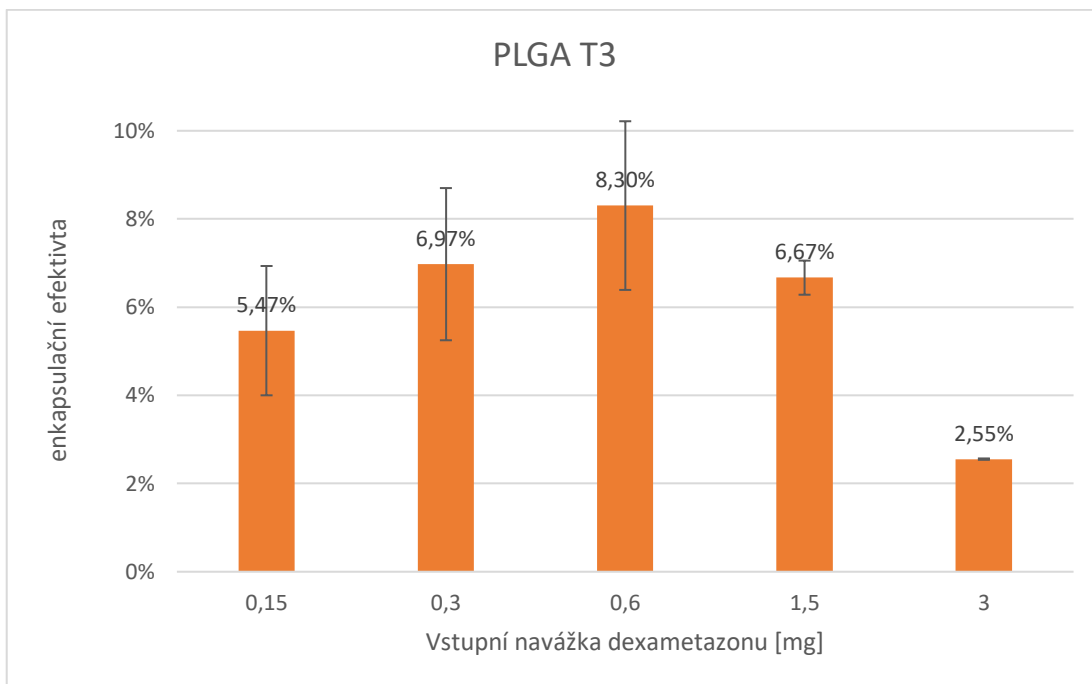
Graf 2: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25



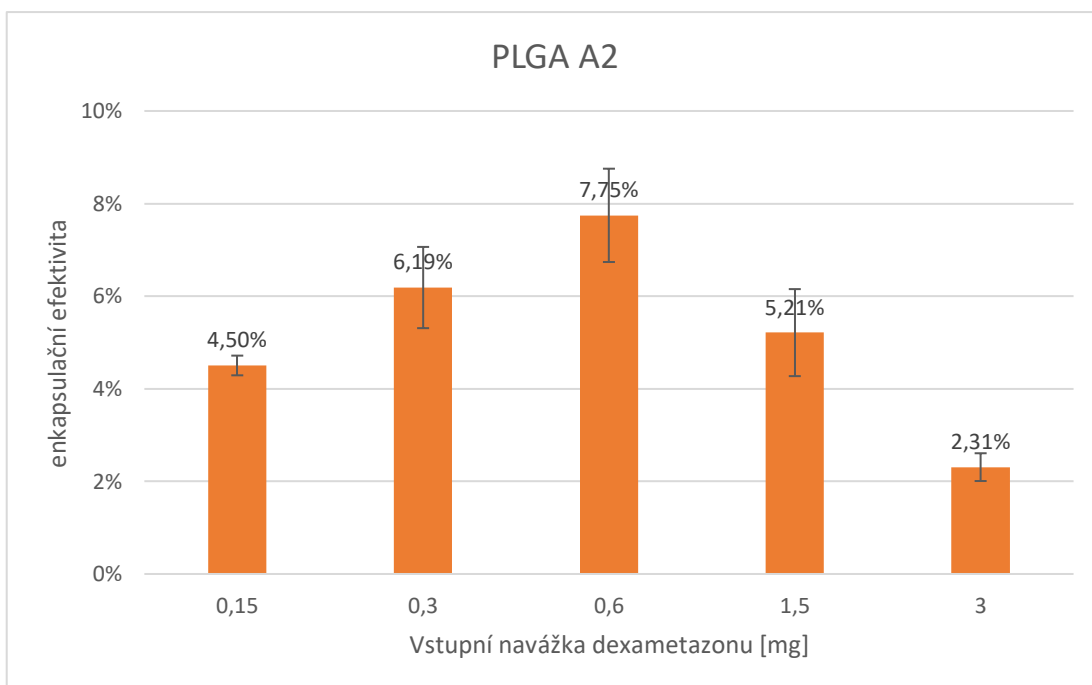
Graf 3: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A



Graf 4: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E



*Graf 5: Závislost enkapsulační efektivita na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3*

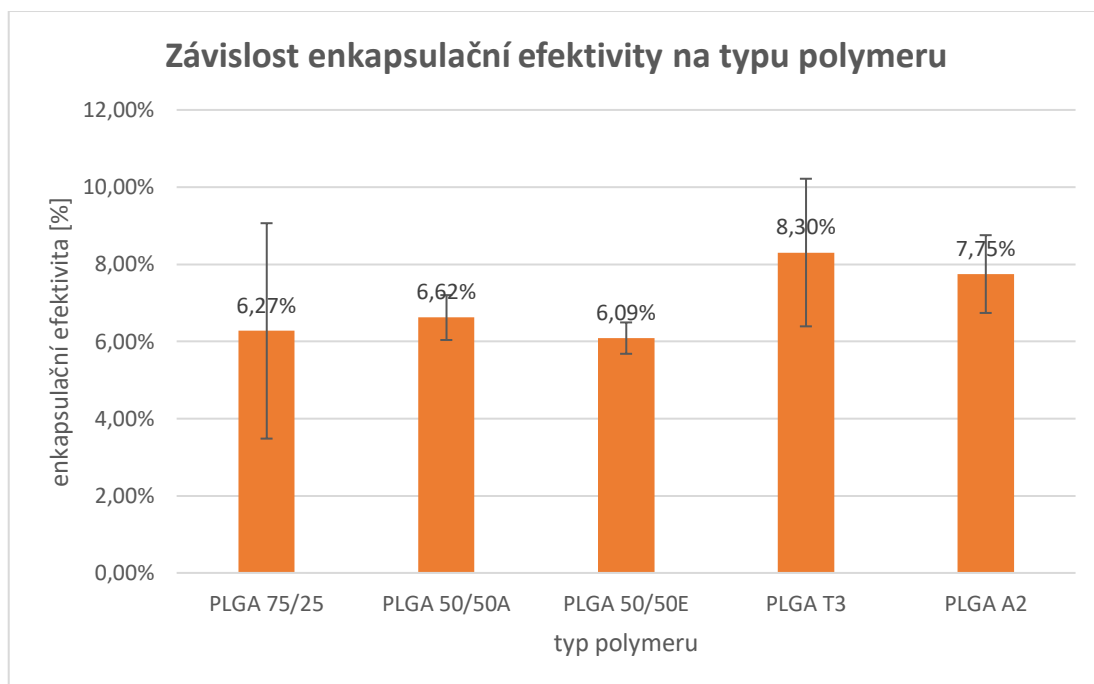


*Graf 6: Závislost enkapsulační efektivita na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2*

Ze všech použitých polymerů při všech použitých navážkách dexametazonu dosáhla nejvyšší enkapsulační efektivita hodnoty 8,3 %, naopak nejnižší naměřená průměrná hodnota odpovídala 2,11 % použitého dexametazonu.

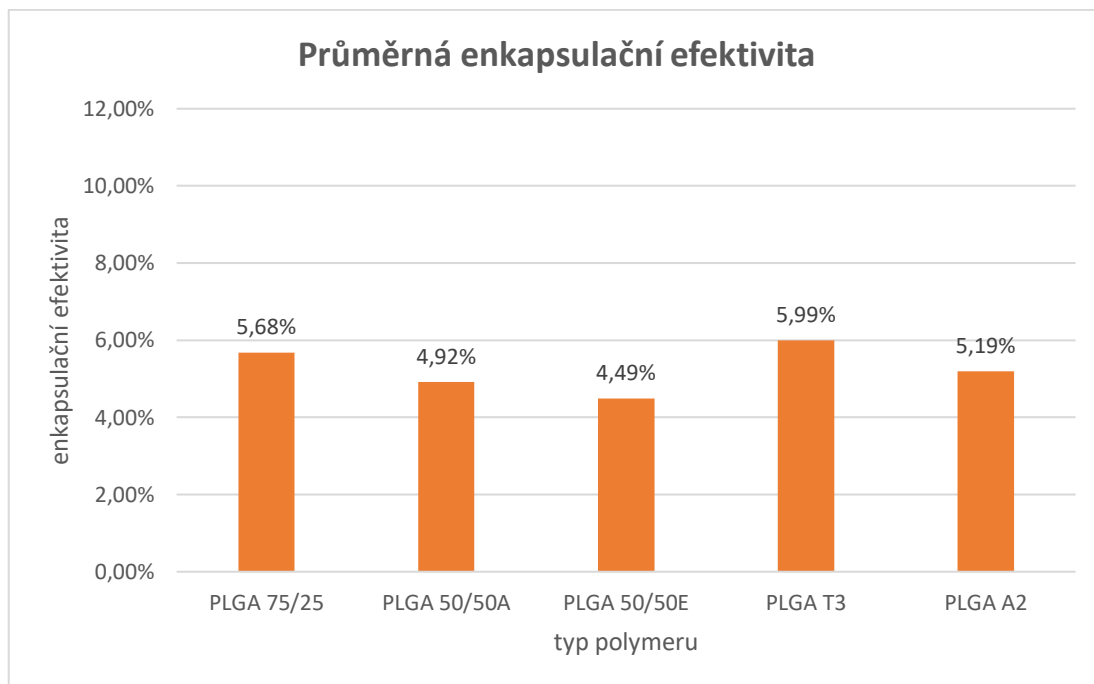
U všech polymerů bylo nejvyšších průměrných enkapsulačních efektivit dosahováno při vstupní navážce 0,6 mg dexametazonu na 30 mg PLGA (Graf 7.). Výjimku zde tvořil polymer PLGA 75/25, kde byla nejvyšší enkapsulační efektivita naměřena při vstupní navážce 0,15 mg (Graf 2.).

Naopak nejnižší enkapsulační efektivita byla u všech polymerů pozorována při nejvyšší vstupní navážce dexametazonu, tedy 3 mg. Pravděpodobnou příčinou tohoto jevu může být tvorba krystalů dexametazonu při jeho vyšší vstupní koncentraci, která vede ke snížení enkapsulace dexametazonu do PLGA. Dexametazon je lipofilní látka ( $\log P = 1,83$ ), která vytváří poměrně stabilní krystaly ( $t.t. = 229\text{--}231\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tvorba krystalů je dána kombinací špatné rozpustnosti dexametazonu ve vodném prostředí a jeho tendencí ke krystalizaci. Rozpustnost dexametazonu ve vodě se pohybuje kolem 0,1 mg/ml. [64] Lze předpokládat, že při zvyšování navážky dexametazonu dochází k supersaturaci vodného roztoku dexametazonem a jeho následné krystalizaci v průběhu procesu nanoprecipitace. Nanoprecipitace je proces, který probíhá pouze v relativně přesně daném poměru solut : solvent : antisolvent, který bývá označován jako ouzo region. [65] Dexametazon je dobře rozpustný v organické fázi obsahující polymer a aceton (solvent). Po přidání organické fáze k vodnému roztoku (antisolvent) dochází k difuzi a postupnému odpařování acetonu, při kterém se dexametazon na základě rozdělovacího koeficientu diperguje v polymeru a stává součástí vznikajících nanočástic a zároveň se v určitém množství rozpouští ve vodě. Vzhledem k velmi nízké rozpustnosti dexametazonu ve vodě tak pravděpodobně při vyšších navážkách může dojít k přesycení vodného roztoku a vzniku jader krystalinity. Zdá se, že molekuly dexametazonu pak mají větší tendenci k tvorbě těchto jader krystalinity a dalšímu růstu krystalů. Tyto procesy převažují při vyšších koncentracích nad procesem dispergace léčiva v polymeru. Objevuje se tedy kompetice mezi inkorporací léčiva do nanočástic a tvorbou krystalů dexametazonu. V závislosti na vstupním množství léčiva pak může jeden z procesů převážit, přičemž s rostoucí navážkou dexametazonu byla pozorována právě zvýšená krystalizace léčiva na úkor jeho enkapsulace. [66]



*Graf 7: Závislost enkapsulační efektivity na typu polymeru při navážce 0,6 mg dexametazonu*

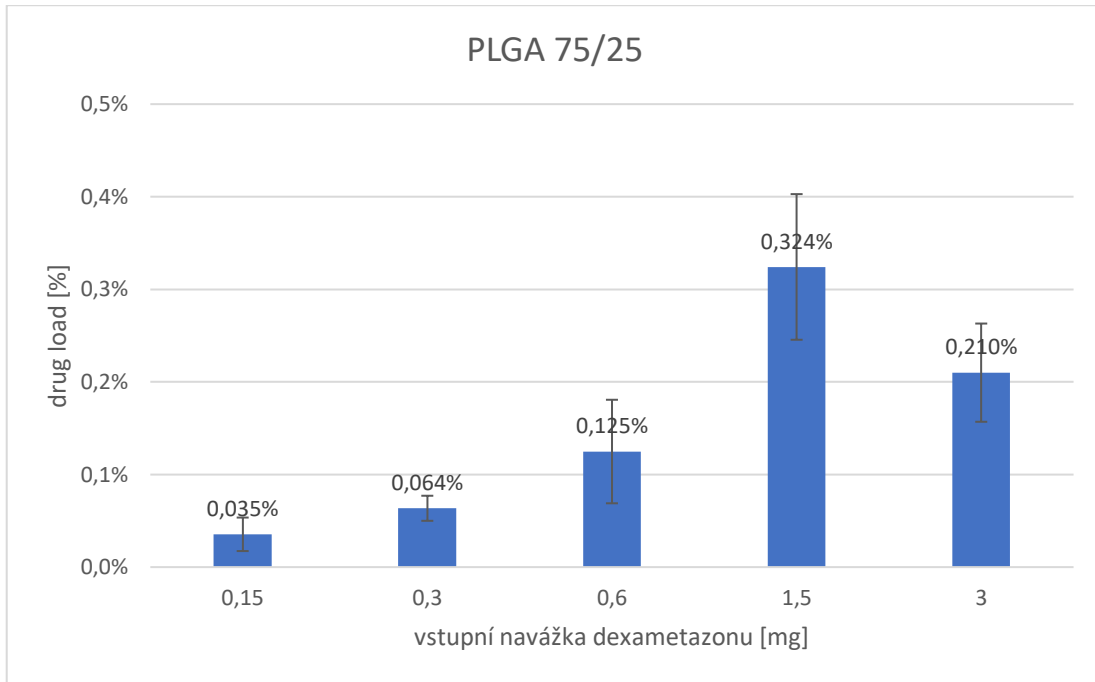
Při navážce 0,6 mg dexametazonu, která vedla k nejvyšší enkapsulační aktivitě (s výjimkou polymeru PLGA 75/25), dosáhl nejlepšího výsledku ze všech použitých polymerů větvený terpolymer PLGA T3. Průměrná enkapsulační aktivita při této použité koncentraci dexametazonu dosáhla hodnoty 8,3 %. Druhá nejvyšší enkapsulační aktivita s hodnotou 7,75 % byla pozorována u polymeru PLGA A2. Naopak k nejnižší enkapsulační aktivitě 6,09 % vedlo použití polymeru PLGA 50/50E.



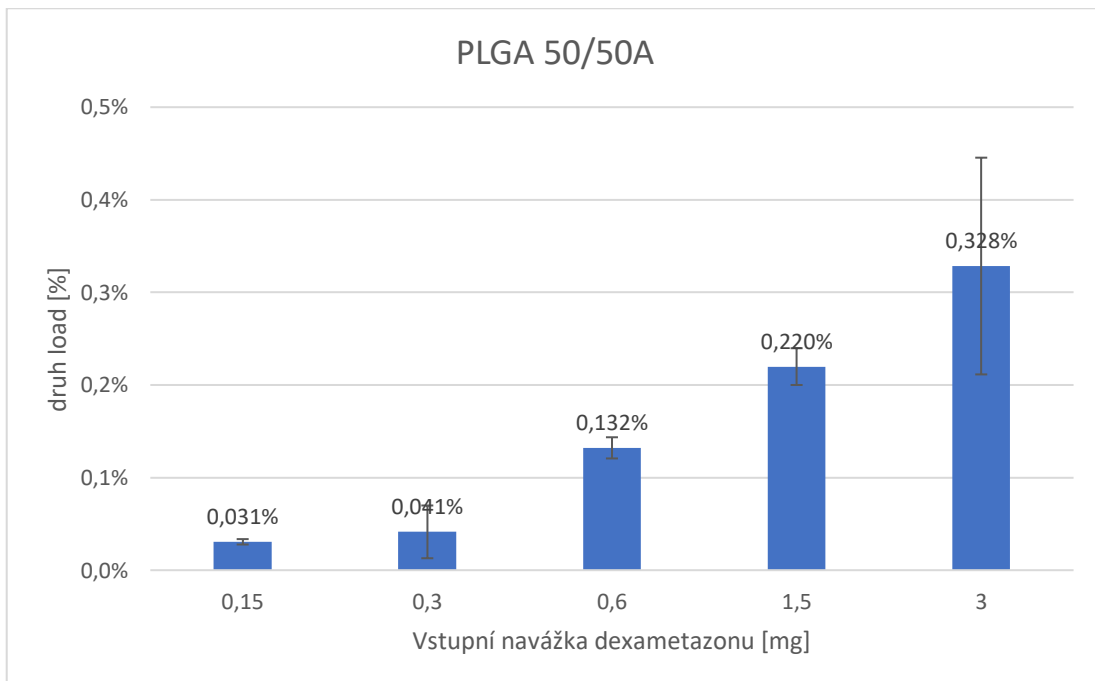
*Graf 8: Průměrná enkapsulační efektivita v závislosti na typu polymeru*

Pokud porovnáme průměrné enkapsulační efektivitu ze všech navážek dexametazonu pro jednotlivé polymery (Graf 8), nejlepšího výsledku dosáhly opět nanočástice připravené z polymeru PLGA T3. Druhou nejvyšší průměrnou hodnotu poskytl polymer PLGA 75/25. Nejnižší celková enkapsulační efektivita byla pozorována u polymeru PLGA 50/50E. Z těchto výsledků je tedy patrné, že větvené polymery jsou schopné do matrice z nich připravených nanočástic inkorporovat více dexametazonu. To je pravděpodobně dáno jejich větvenou strukturou s větším množstvím intra- a intermolekulárních prostor pro enkapsulaci léčiva. Tento jev také vypovídá o tom, že hydrofobní interakce, které jsou popisované jako klíčové pro inkorporaci malých lipofilních molekul do PLGA matrice, nemusí být v případě dexametazonu zcela determinující a struktura polymeru také hraje roli.

#### 4.1.1.2 Drug-load

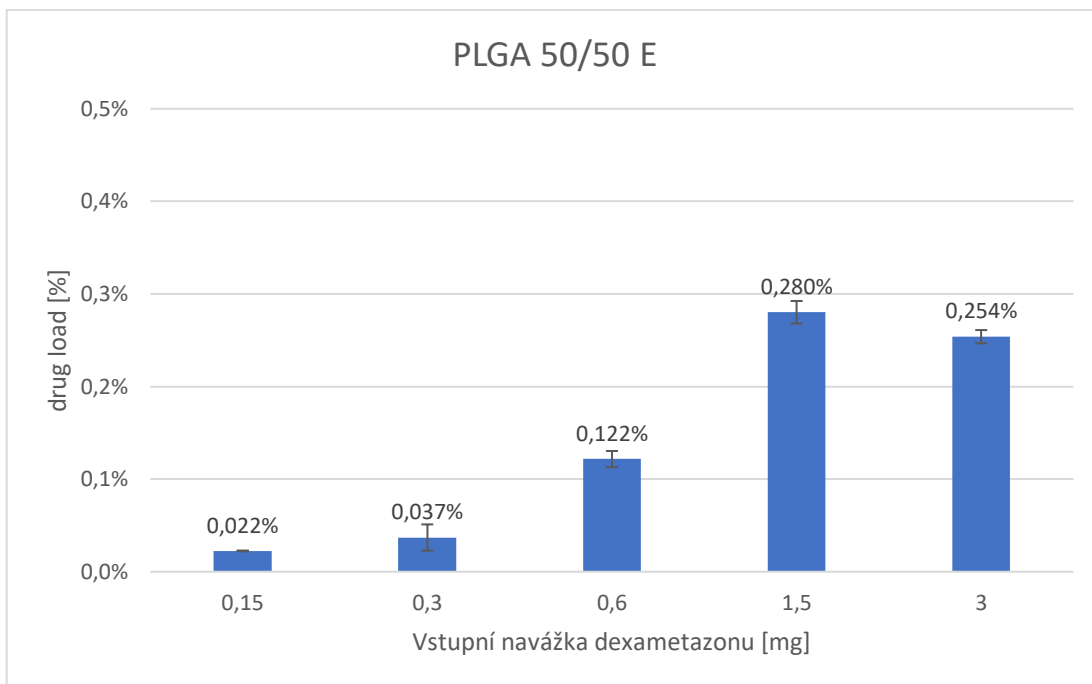


Graf 9: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25

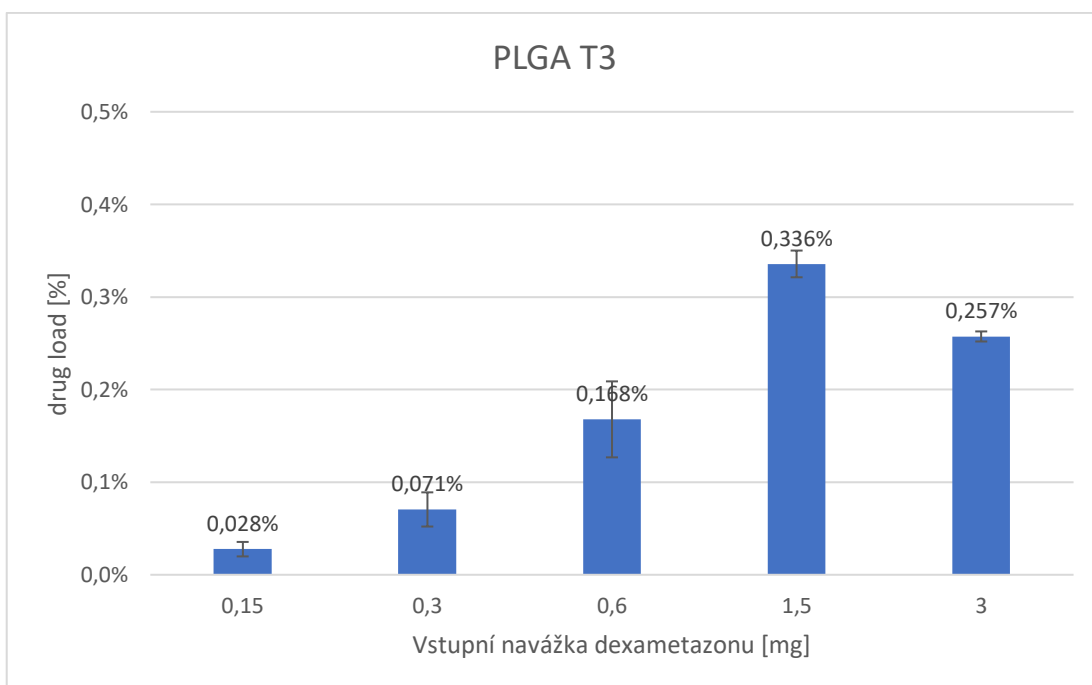


Graf 10: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A

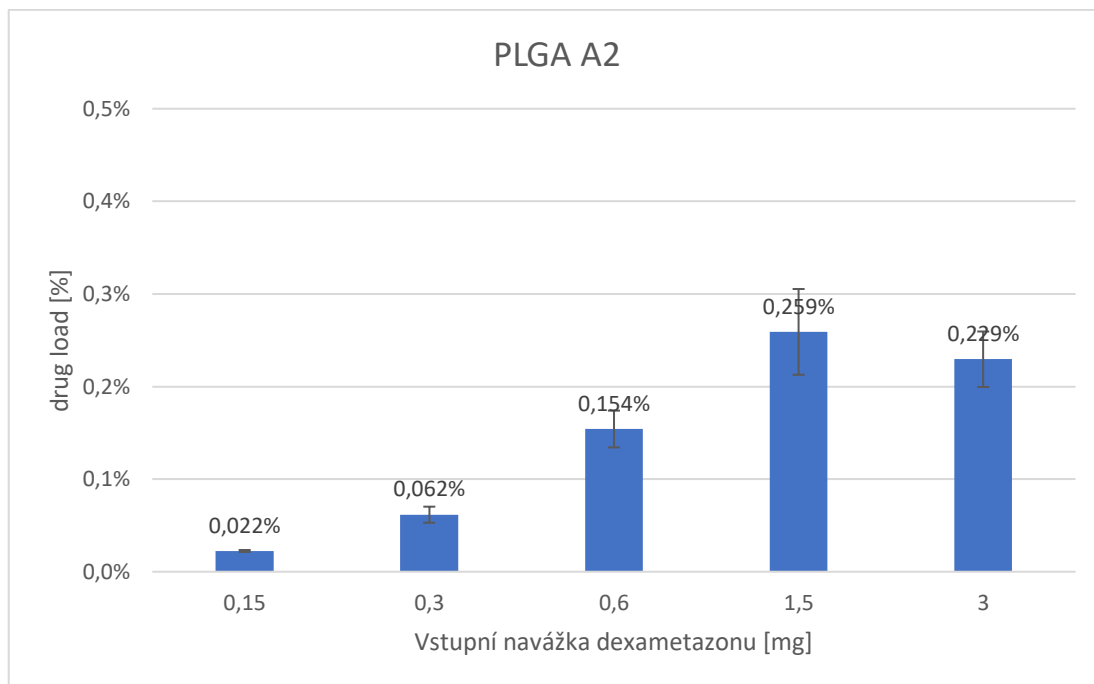




Graf 11: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E



Graf 12: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3



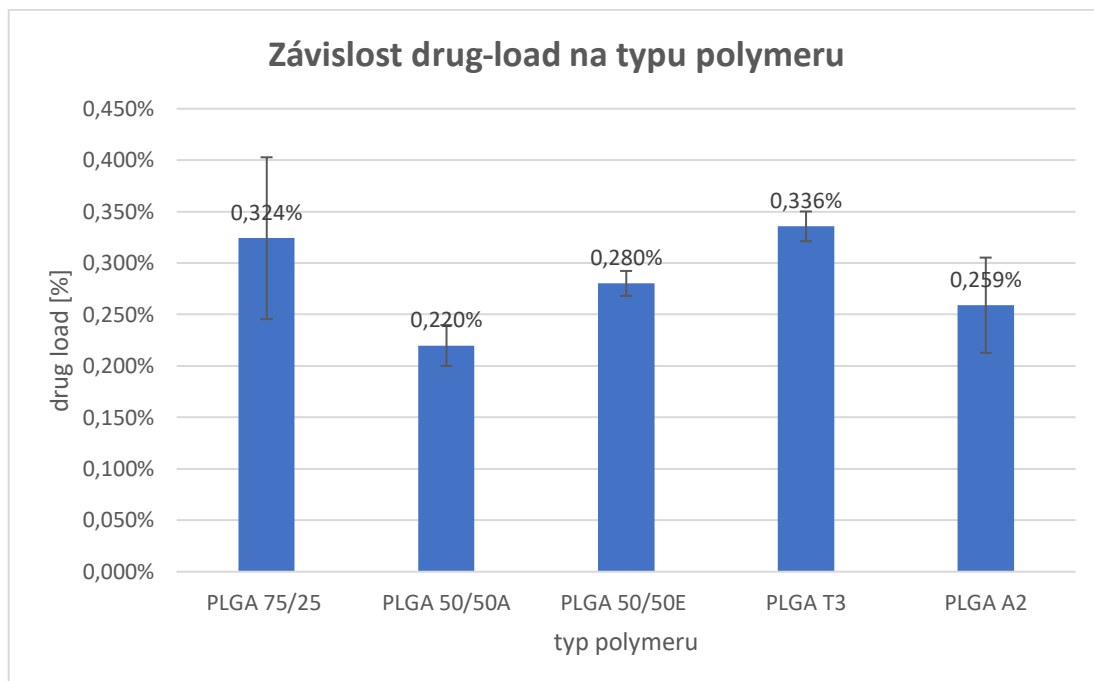
Graf 13: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2

Dalším hodnoceným parametrem byla závislost drug-load na použitém množství dexametazonu. Na rozdíl od enkapsulační efektivity, která vyjadřuje poměr enkapsulované účinné látky k celkovému množství této látky použité při přípravě nanočástic, drug-load představuje poměr množství účinné látky k celkové hmotě nanočástic. [67] Výsledky jsou uvedeny v grafech 9-13. V případě většiny polymerů byl pozorován nárůst drug-load od nejnižší použité koncentrace účinné látky, přičemž maximálního drug-load bylo dosaženo při vstupní navážce 1,5 mg polymeru. Další zvýšení vstupní navážky dexametazonu vedlo ke snížení drug-load. Docházelo zde tedy k nárůstu drug-load se zvyšující se navázkou účinné látky až k dosažení určitého maxima, poté hodnoty drug-load klesaly.

Podobný vztah mezi vstupním množstvím dexametazonu a jeho enkapsulací vyjádřenou jako drug-load byl pozorován ve studii Gómez-Gaete et al. (2006) [66]. V této studii zkoumali změny enkapsulace v závislosti na vstupním množství dexametazonu za použití emulzní odpařovací metody při použití polymeru PLGA 75/25. Rozsah vstupních hmotností dexametazonu představoval v uvedené studii 220 µg – 21 mg na 100 mg polymeru a bylo pozorováno, že drug-load dexametazonu se vzrůstajícím vstupním množstvím účinné látky stoupal až do dosažení maxima

při navážce 10 mg dexametazonu/100 mg PLGA 75/25. Po překročení této hranice se enkapsulace s rostoucí navázkou dexametazonu mírně snižovala do ustálené hodnoty drug-load 170 µg/100mg PLGA. Ve svém měření tedy také pozorovali s rostoucí navázkou dexametazonu nárůst a následný pokles drug-load. Vysvětlením tohoto jevu může být již popsaná kompetice mezi krystalizačními silami a inkorporací léčiva do matrix nanočástic. Z počátku drug-load narůstá až do nasycení polymerní matrice léčivem, následně s dalším nárůstem vstupního množství léčiva převáží krystalizační procesy na úkor množství enkapsulovaného léčiva (viz výše). [66] Na rozdíl od našeho měření bylo v uvedené studii dosaženo maximálního drug-load při vstupním poměru dexametazonu ku polymeru 10 % (10 mg dexametazonu na 100 mg polymeru), zatímco v našem měření to bylo při poměru 5 % (1,5 mg dexametazonu ku 30 mg polymeru). Důvodem toho rozdílu mohlo být použití odlišné metody pro přípravu nanočástic. Zatímco v uvedené studii byly nanočástice připravovány emulzní odpařovací metodou, v této práci byla použita nanoprecipitace. Dále faktorem, který mohl vést k odlišným výsledkům, mohlo být použití rozdílných navážek. V této práci byly použity při přípravě nanočástic nižší navážky dexametazonu (0,15–3 mg dexametazonu na 30 mg polymeru) než v uvedené studii (0,22–21 mg na 100 mg polymeru).

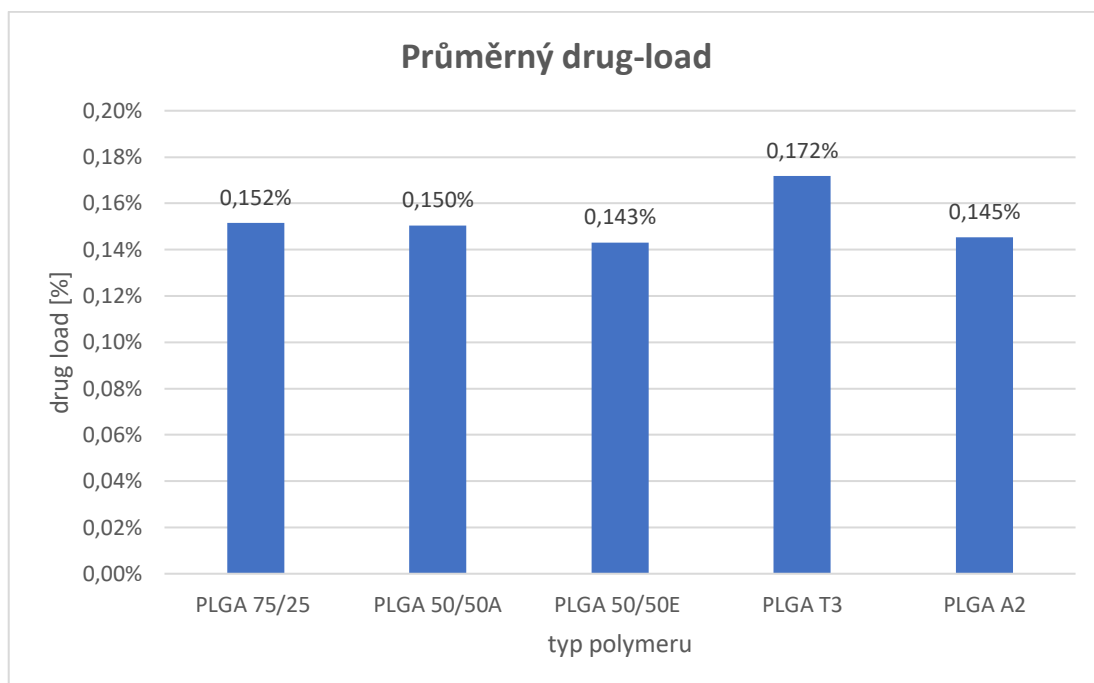
V případě polymeru PLGA 50/50A také rostl drug-load se zvyšující se navázkou dexametazonu, na rozdíl od ostatních polymerů však své maximální hodnoty drug-load 0,328 % dosáhl při navážce 3 mg. Závislost drug-load na množství použitého dexametazonu se u tohoto polymeru vymyká výsledkům ostatních polymerů. Jedná se pravděpodobně o statistický artefakt.



Graf 14: Závislost drug-load na typu polymeru při navážce 1,5 mg dexametazonu

Při porovnání maximálních dosažených hodnot drug-load mezi různými polymery (Graf 14) nebyly pozorovány výrazné rozdíly, všechny se pohybovaly kolem 0,3 %. Minimální vliv složení a molekulové hmotnosti PLGA na enkapsulaci pozorovali také ve studii Gómez-Gaete et al. (2006) [66], při tvorbě nanočástic emulzní odpařovací metodou za použití polymerů PLGA 75/25 a PLGA 50/50. V uvedené studii se ukázalo, že oba polymery dosahovaly podobné enkapsulace.

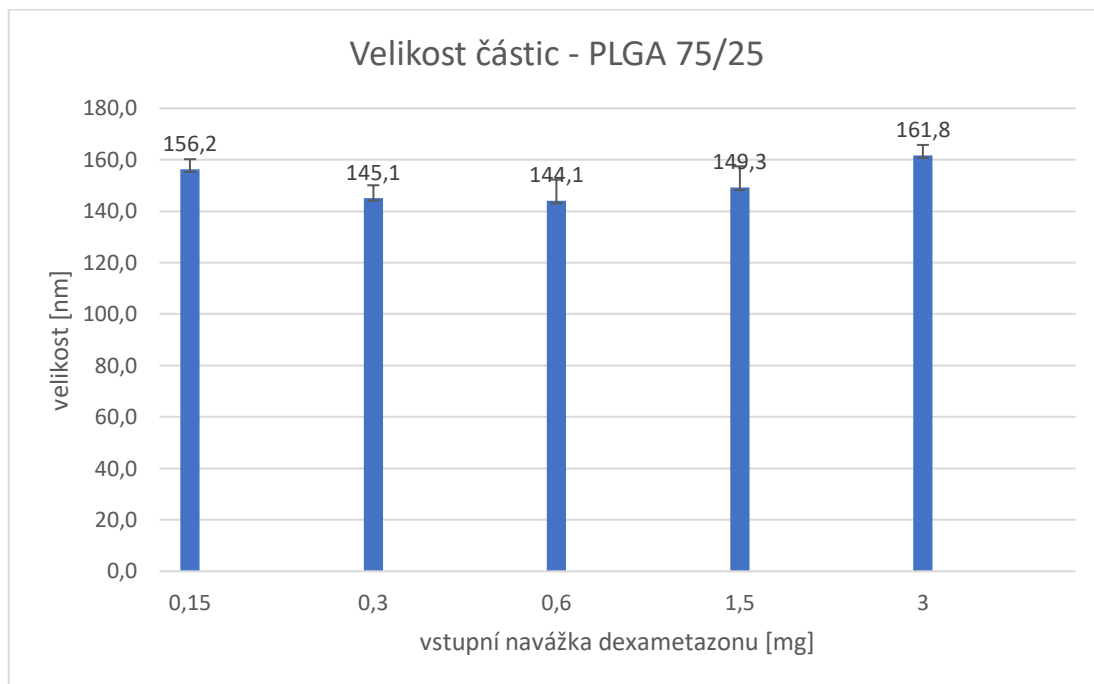
S výjimkou polymeru PLGA 50/50A byly v našem měření nejvyšší hodnoty drug-load pozorovány při navážce 1,5 mg. Nejvyšší hodnoty drug-load 0,336 % dosáhly při této navážce nanočástice připravené z polymeru PLGA T3. Podobné výsledky poskytl také polymer PLGA 75/25, kde maximální drug-load dosahovalo 0,324 %. Nejnižší drug-load při této navážce byl pozorován u polymeru PLGA 50/50A.



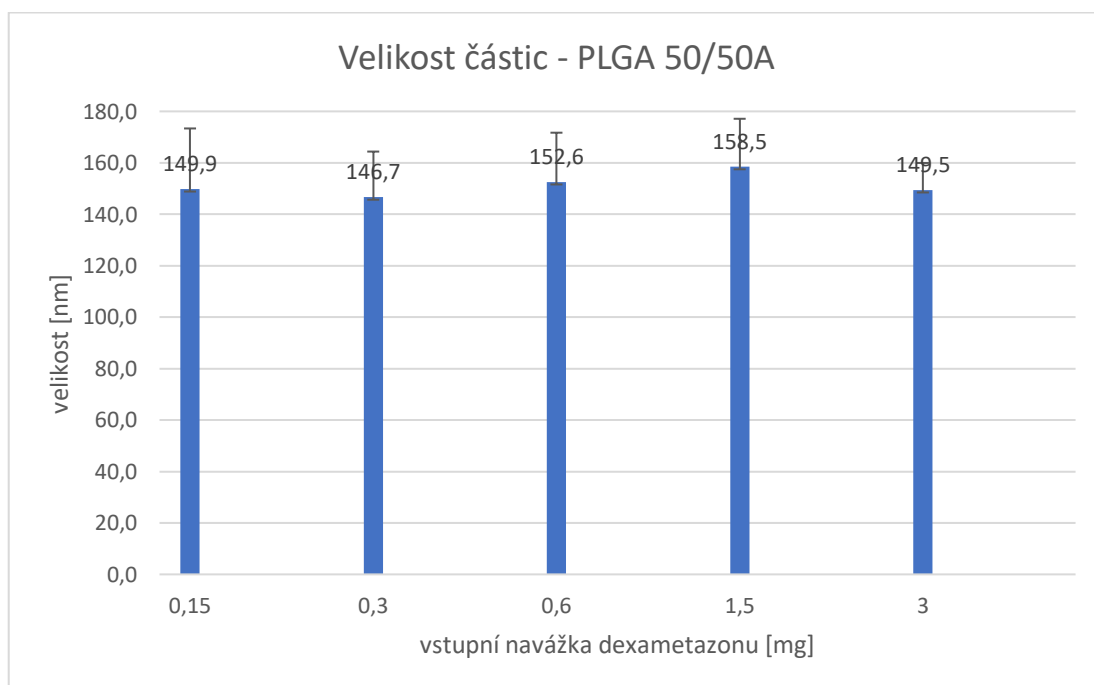
*Graf 15: Průměrný drug-load v závislosti na typu polymeru*

Při porovnání průměrného drug-load ze všech použitých navážek v závislosti na typu polymeru (Graf 15) nevidíme mezi polymery zásadní rozdíly. O něco vyšší průměrné drug-load v porovnání s ostatními dosáhl polymer PLGA T3. Z uvedených hodnot se nedají vyvodit žádné jasné závěry, ale lze zde pozorovat podobný trend, že větvená struktura a vyšší hydrofobicita PLGA napomáhají inkorporaci dexametazonu, jako tomu bylo v případě enkapsulační efektivity. To ukazuje na to, že hydrofobní interakce jsou pravděpodobně hnací silou inkorporace dexametazonu do PLGA. Dále pak vyšší míra strukturální neuspořádanosti, patrná z nižších teplot skelného přechodu, umožňuje inkorporaci vyššího množství molekul léčiva do matrice. [68]

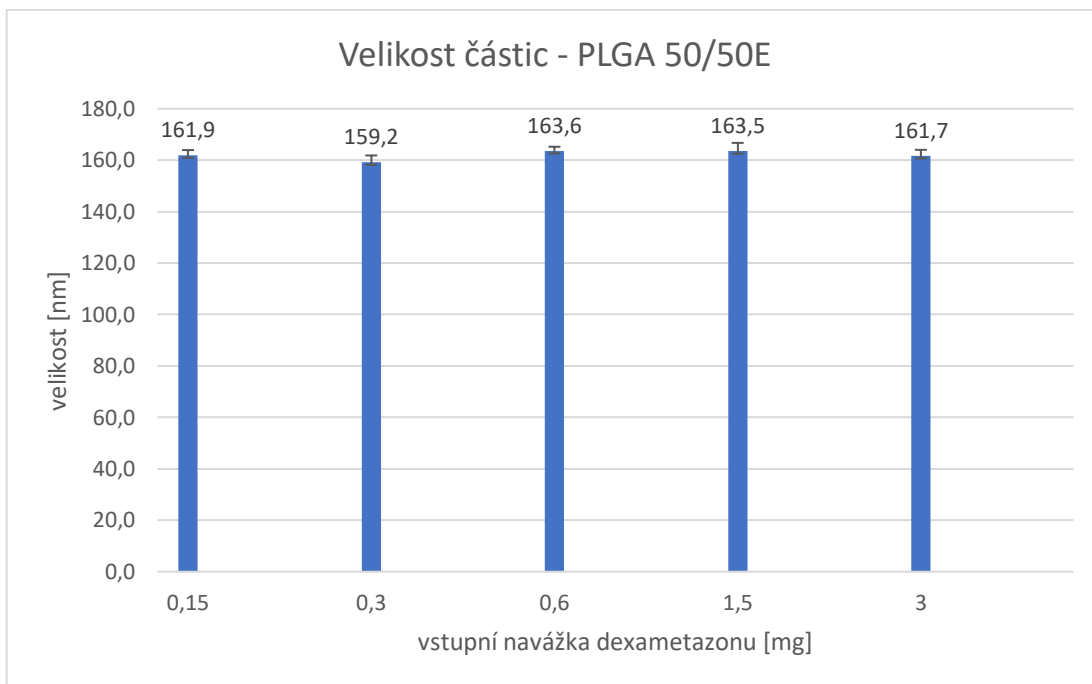
## 4.1.2 Vyhodnocení velikosti nanočástic



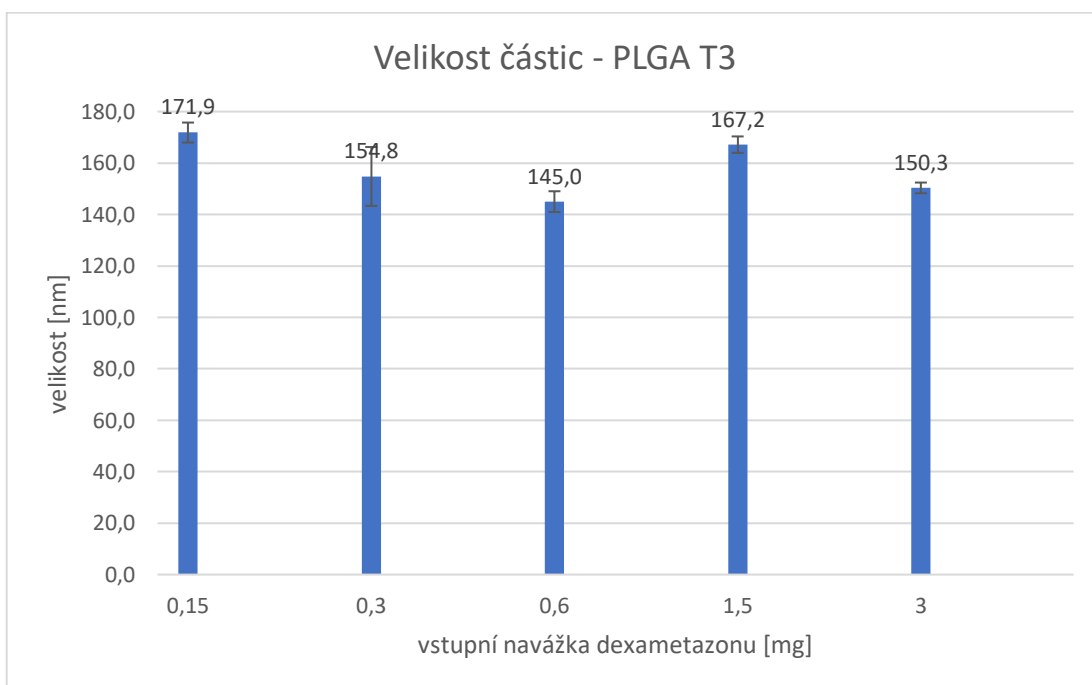
Graf 16: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25



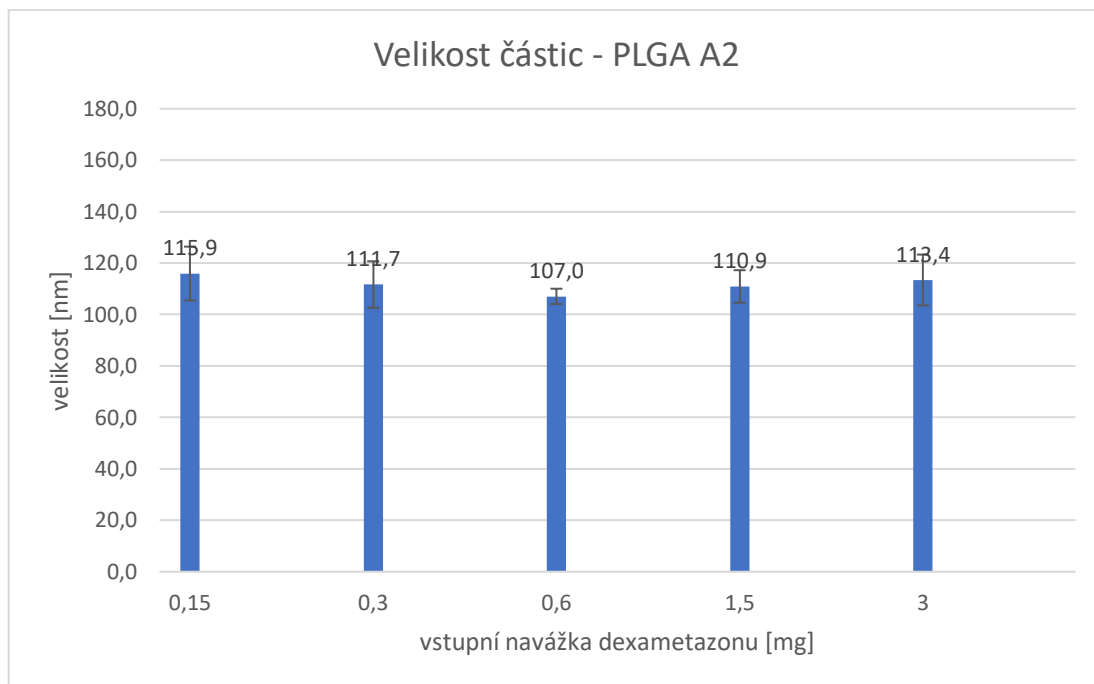
Graf 17: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A



Graf 18: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E



Graf 19: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3



Graf 20: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2

Velikost připravených částic (viz grafy 16–20) se pohybovala od 107,0–171,9 nm. Při terapeutickém použití nanočástic má jejich velikost významný vliv na distribuci léčiva organismem. Nanočástice menší než 6 nm jsou rychle vylučovány ledvinami a nemohou tak dosáhnout cílové struktury. [5] Pro cílenou distribuci do makrofágů jsou vhodné nanočástice větší než 100 nm. [69] U makrofágů jater a sleziny pak byla popsána zvýšená kumulace nanočástic zejména o velikosti v rozmezí 150–300 nm. [20] Tuto podmínku splňovaly nanočástice připravené z polymeru PLGA 50/50E, kde se velikost pohybovala mezi 159,2–163,6 nm. Velikosti pohybující se kolem 150 nm dosahovaly také nanočástice připravené z polymerů PLGA 75/25, PLGA 50/50A i PLGA T3. Nejmenší nanočástice vznikly při syntéze z polymeru PLGA A2, které dosahovaly velikosti pouze 107,0–115,9 nm. Vysvětlení tohoto jevu je vyšší množství karboxylových funkcí tohoto typu PLGA a tím pádem vyšší míra repulzních interakcí mezi jednotlivými molekulami PLGA, což vede k tvorbě menších nanočástic. Všechny připravené nanočástice přesáhly velikost 100 nm, z hlediska velikosti se tedy jedná o nanočástice vhodné pro transport léčiva do makrofágů.

Koncentrace účinné látky použité pro syntézu nanočástic neovlivňovala jejich výslednou velikost. Ta se u nanočástic připravených z jednoho typu polymeru pohybovala v úzkém rozmezí kolem průměrných hodnot uvedených v tabulce 2:



Tabulka 2: Průměrná velikost částic dle typu polymeru

polymer	průměrná velikost [nm]
PLGA 75/25	151,3 ± 7,55
PLGA 50/50A	151,4 ± 4,47
PLGA 50/50E	162,0 ± 1,79
PLGA T3	157,8 ± 11,33
PLGA A2	111,8 ± 3,29

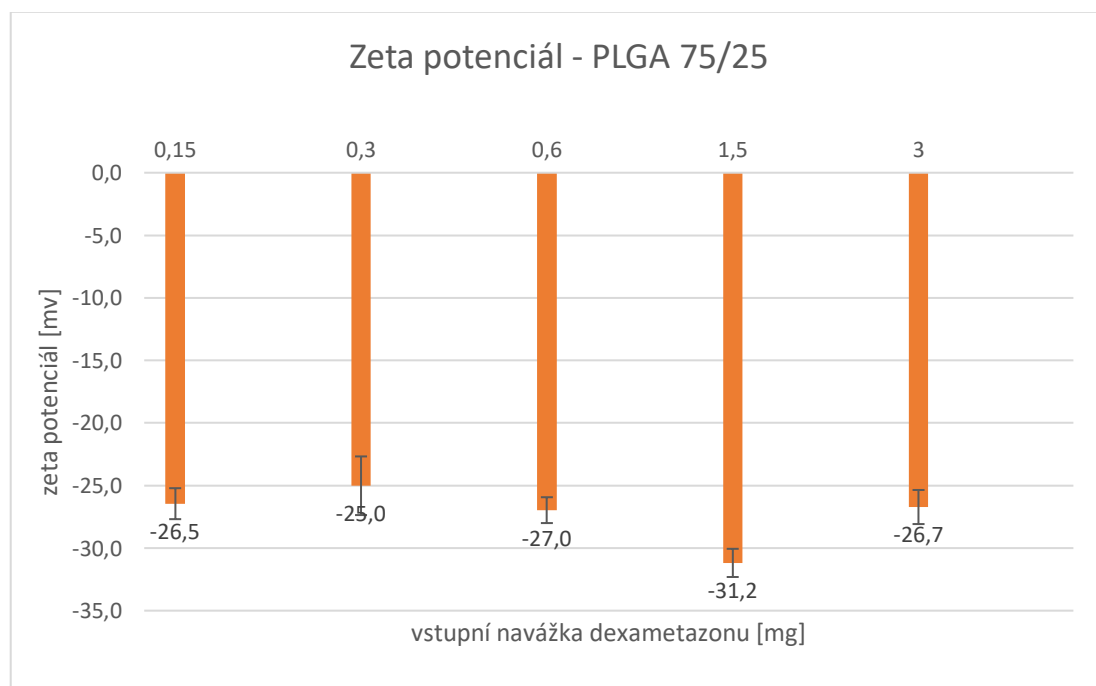
Mezi další faktory, které mohou ovlivnit velikost částic patří koncentrace polymeru, která zde však byla u všech vzorků konstantní. Dále typ polymeru, jeho molekulová hmotnost, složení (v případě PLGA poměr kyseliny glykolové a mléčné), případně modifikace polymeru jako např. esterifikace koncových karboxylových skupin [70]. V případě našeho měření dosahovaly nanočástice velmi podobných velikostí navzdory rozdílům v použitých polymerech (např. různé poměr kyseliny mléčné a glykolové, esterifikace u polymeru PLGA 50/50E či větvení u PLGA T3 a A2). Nejvyšší průměrné velikosti vykazovaly nanočástice připravené z polymeru PLGA 50/50E. V tomto polymeru jsou na rozdíl od polymeru PLGA 50/50A karboxylové skupiny terminovány esterovou skupinou, což může vést k odlišným vlastnostem včetně rozdílu velikosti [71], který však při našem měření nebyl výrazný. Odlišnou velikost jsme dále pozorovali v případě větveného PLGA A2, jehož výsledné nanočástice byly menší v důsledku repulze terminálních karboxylových skupin. Zdá se tedy, že případná přítomnost nebo absence volných karboxylů případně jejich počet ve struktuře PLGA má vliv na výslednou velikost. Klíčovou roli pravděpodobně hrají vzájemné elektrostatické repulzní síly těchto disociovatelných karboxylů.

Z hlediska distribuce velikosti částic se jednalo o dostatečně homogenní vzorky. Změřená polydisperzita vyjádřená jako PDI byla u nanočástic připravených ze všech druhů polymerů při všech použitých navážkách dexametazonu nižší než 0,150. Nízká polydisperzita je jednou z výhod přípravy nanočástic nanoprecipitací a zároveň patří mezi základní požadavky na nanočástice pro terapeutické účely [5]. Při syntéze terapeuticky využívaných nanočástic je vhodné dosáhnout co nejvíce homogenního vzorku. Za optimální PDI nanočástic pro terapeutické využití je obvykle považována hodnota nižší než 0,3. [72] Vzhledem k výsledné PDI pohybující se kolem 0,1 můžeme připravené vzorky z hlediska distribuce velikosti částic považovat za vyhovující.

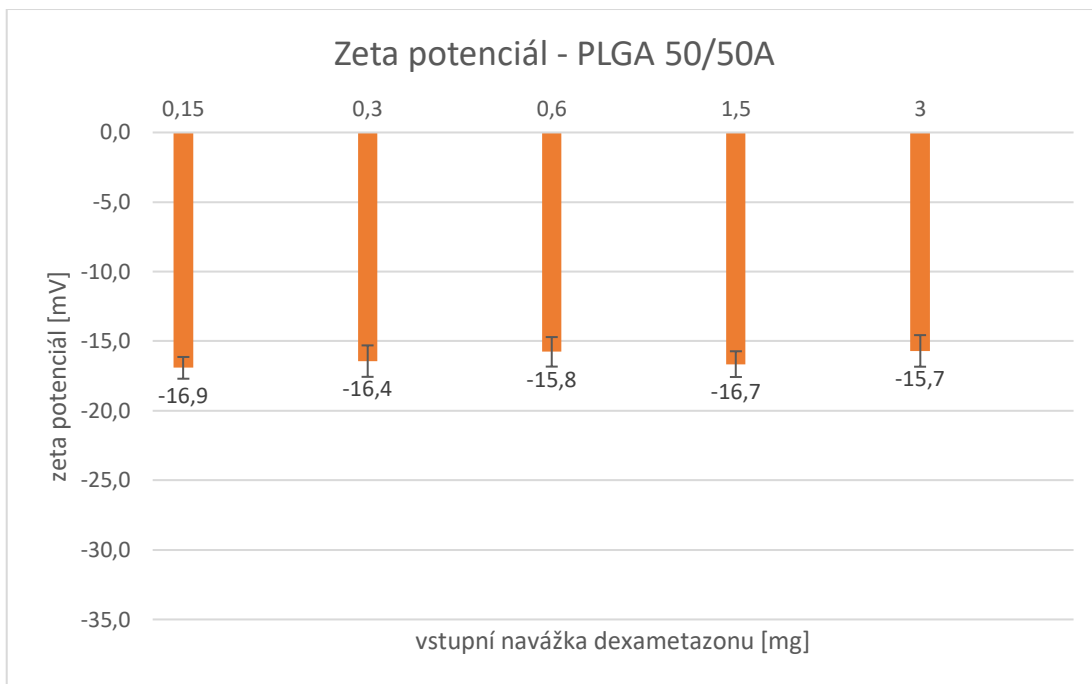
### 4.1.3 Vyhodnocení zeta potenciálu nanočástic

Pro cílení do makrofágů je důležitý záporný náboj nanočástic. [21] Záporný náboj byl naměřen u všech připravených nanočástic při použití všech pěti druhů polymeru a při všech použitých vstupních koncentracích dexametazonu.

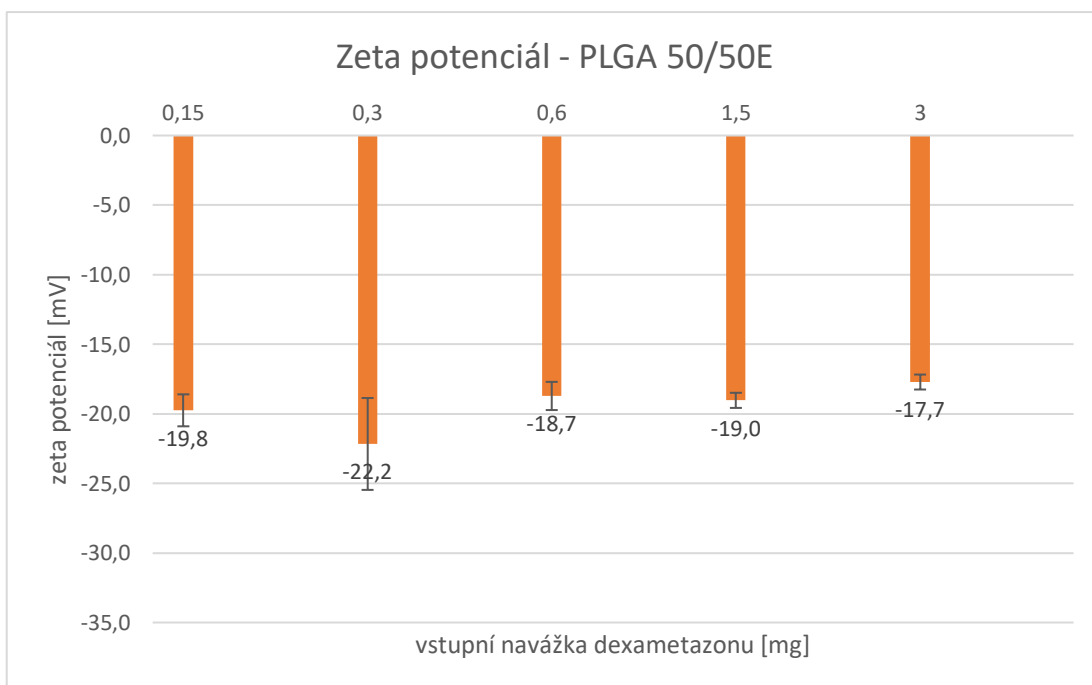
Při porovnání nanočástic připravených ze stejného druhu polymeru při použití vstupních navážek dexametazonu 0,15–3 mg nebyl pozorován jednoznačný vliv vstupní koncentrace účinné látky na výsledný zeta potenciál. Tento výsledek může souviset se skutečností, že dexametazon byl při syntéze inkorporován dovnitř nanočástic, zatímco zeta potenciál je ovlivněn vlastnostmi jejich povrchu. Hodnoty zeta potenciálu tak pro jednotlivé polymery kolísaly v poměrně úzkém rozmezí kolem průměrné hodnoty. V případě polymeru PLGA 75/25 byl při jednotlivých měřeních zjištěn zeta potenciál -22,9 až -32,1; pro PLGA 50/50A se pohyboval v rozmezí -14,8 až -17,6; pro PLGA 50/50E byly zjištěny hodnoty -17,6 až -25,2. V případě větvených polymerů byl pro PLGA T3 naměřen zeta potenciál mezi hodnotami -18,0 až -30,3 a pro PLGA A2 se pohyboval v rozmezí -11,0 až -25,4. Průměrné hodnoty pro jednotlivé vstupní koncentrace dexametazonu a příslušný polymer znázorňují grafy 21–25:



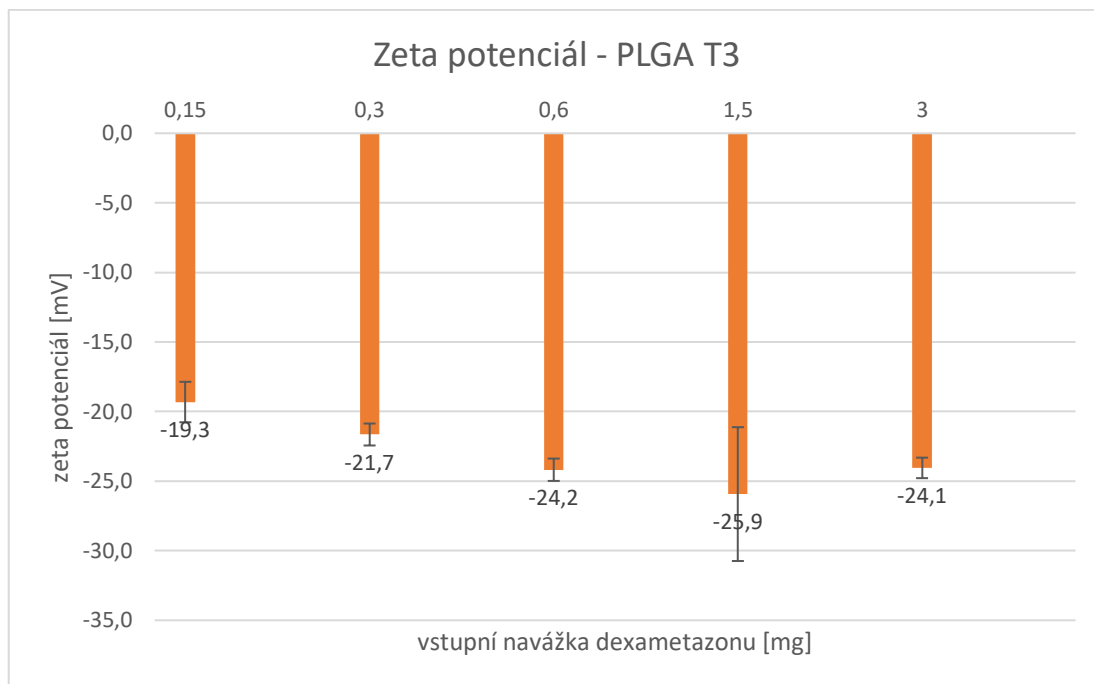
Graf 21: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25



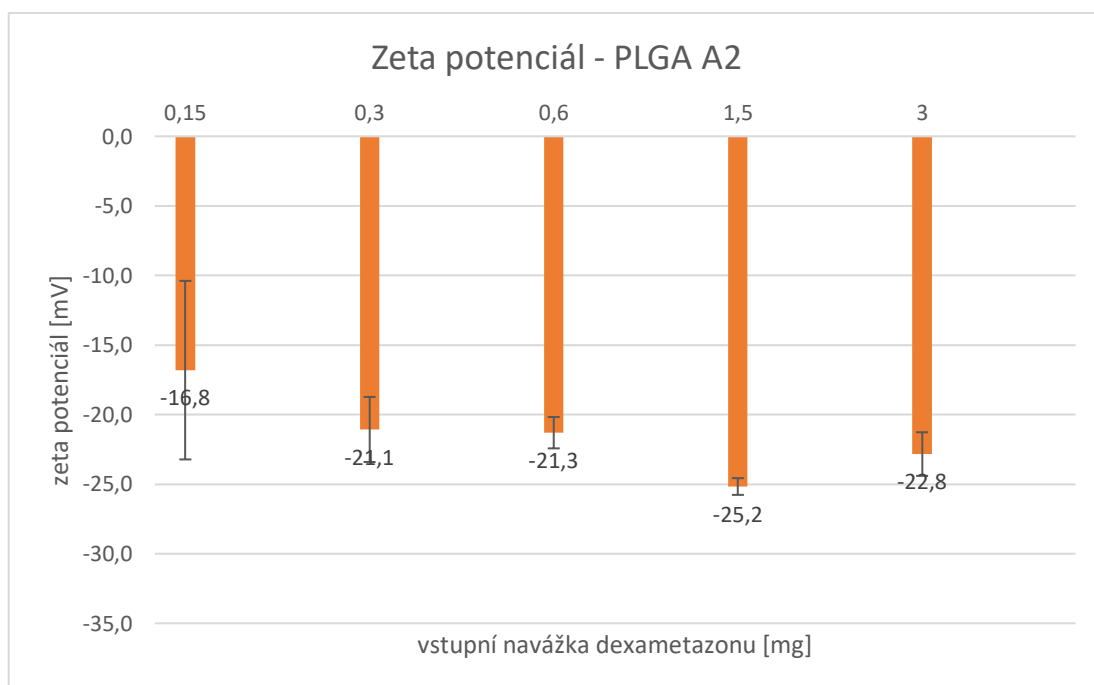
Graf 22: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A



Graf 23: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E



Graf 24: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3



Graf 25: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2

Jedním z faktorů ovlivňujících hodnotu zeta potenciálu je použitý polymer. V našem měření dosahoval nejvyšších absolutních hodnot zeta potenciálu polymer PLGA 75/25, následovaný polymerem PLGA T3 a PLGA A2, u nichž všech dosahoval

průměrně naměřený zeta potenciál hodnot pod -20 mV. V případě obou polymerů PLGA 50/50 byly průměrné absolutní hodnoty zeta potenciálu nižší než 20 mV. Průměr naměřených hodnoty zeta potenciálu všech připravených nanočástic pro jednotlivé polymery vyjadřuje tabulka 3:

*Tabulka 3: Průměrný zeta potenciál dle typu polymeru*

<b>polymer</b>	<b>Průměrný zeta potenciál [mV]</b>
PLGA 75/25	-27,27 ± 2,32
PLGA 50/50A	-16,29 ± 0,54
PLGA 50/50E	-19,48 ± 1,67
PLGA T3	-23,03 ± 2,57
PLGA A2	-21,43 ± 3,06

Je zajímavé, že nanočástice připravené za použití PLGA 50/50A, v jehož struktuře jsou volné karboxylové skupiny umožňující vznik záporného náboje, dosahovaly nižších absolutních hodnot zeta potenciálu než PLGA 50/50E, kde jsou tyto skupiny maskovány esterifikací. Zatímco kyselá karboxylové skupiny mohou být záporně nabitý a vést tak k obecně vyšším hodnotám zeta potenciálu, v případě esterifikovaného polymeru může esterifikace způsobit nižší stabilitu i naměřené hodnoty.

Z hlediska stability vznikaly suspenze relativně až středně stabilní, přičemž absolutní hodnota zeta potenciálu se pohybovala mezi 15–30 mV. Za nestabilní jsou považovány koloidní suspenze se zeta potenciálem nižším než  $\pm 10$  mV, za vysoce stabilní pak suspenze s hodnotou zeta potenciálu vyšší než  $\pm 30$  mV. [73] Nicméně, je třeba konstatovat, že během řešení této práce jsme nesetkali s žádnými projevy nestability připravených nanosuspenzí. Z hlediska specificity distribuce do makrofágů je výhodou výrazně záporný zeta potenciál. Z tohoto hlediska se jako nejvhodnější kandidát jeví PLGA 75/25. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Boltarové et al. (2021) [74], kde byla zkoumána míra internalizace PLGA nanočástic různými buňkami a nanočástice připravené z PLGA 75/25 byly makrofágy fagocytovány v nejvyšší míře.

## 5 ZÁVĚR

Byly připraveny nanočástice s obsahem dexametazonu nanoprecipitační metodou. Pro přípravu nanočástic bylo použito pět typů polymeru založených na polymléčné-koglykolové kyselině a různé vstupní koncentrace dexametazonu. Výsledky ukázaly, že množství dexametazonu použitého pro přípravu nanočástic má vliv na míru jeho enkapsulace. U většiny připravených nanočástic dosahovala enkapsulační efektivita nejvyšších hodnot při navážce 0,6 mg dexametazonu na 30 mg polymeru. Naopak nejnižší enkapsulační efektivita byla pozorována při navážce 3 mg dexametazonu. Příčinou tohoto jevu může být přesycení roztoku dexametazonem při této navážce vedoucí ke vzniku krystalů dexametazonu a následná převaha krystalizačních procesů nad enkapsulací. Podobný trend byl pozorován i v případě drug-load, kde se zvyšující se vstupní koncentrací dexametazonu rostly hodnoty drug-load, které dosáhly maxima při navážce 1,5 mg a následně klesly při navážce 3 mg. Nejvyšší enkapsulační efektivita (8,30 %) a nejvyšší hodnoty drug-load (0.336 %) bylo dosaženo při použití větveného polymeru PLGA T3.

Velikost nanočástic se mírně lišila podle typu použitého polymeru, ale u všech připravených nanočástic se nacházela v rozmezí 100–200 nm a byla tak splněna velikostní podmínka pro pasivní cílení částic do makrofágů. U vzorků bylo dosaženo také nízké polydisperzity ( $<0,15$ ). Hodnoty zeta potenciálu byly u všech nanočástic záporné a nanočástic tak vykazovaly záporných povrchový náboj vhodný pro rozpoznání částic makrofágy.

Ukázalo se, že jak vstupní množství dexametazonu, tak molekulární architektura použitého polymeru mohou ovlivňovat proces enkapsulace. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití větveného polymeru PLGA T3, proto by se dalším výzkum mohl zaměřit na nanočástice připravené právě z tohoto polymeru.

# 6 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

## Obrázky

Obrázek 1: Struktura uhlíkové nanotyčinky jako nosiče léčiva .....	19
Obrázek 2: Struktura micely .....	21
Obrázek 3: Struktura uni- a multilamelárního lipozomu .....	21
Obrázek 4: Struktura nanosféry a nanotobolky .....	22
Obrázek 5: Struktura polymerní micely.....	23
Obrázek 6: Struktura dendrimeru .....	24
Obrázek 7: Degradace PLGA .....	27
Obrázek 8: Schématické znázornění procesu PEGylace nanočástice.....	28

## Tabulky

Tabulka 1: Kalibrační řada dexametazonu v acetonitrilu .....	40
Tabulka 2: Průměrná velikost částic dle typu polymeru.....	57
Tabulka 3: Průměrný zeta potenciál dle typu polymeru .....	61

## Grafy

Graf 1: Kalibrační přímka dexametazonu (závislost AUC na koncentraci dexametazonu).....	41
Graf 2: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25 .....	42
Graf 3: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A .....	43
Graf 4: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E.....	43
Graf 5: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3.....	44

Graf 6: Závislost enkapsulační efektivity na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2.....	44
Graf 7: Závislost enkapsulační efektivity na typu polymeru při navážce 0,6 mg dexametazonu .....	46
Graf 8: Průměrná enkapsulační efektivita v závislosti na typu polymeru .....	47
Graf 9: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25.....	48
Graf 10: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A	48
Graf 11: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E	49
Graf 12: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3 .....	49
Graf 13: Závislost drug-load na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2 .....	50
Graf 14: Závislost drug-load na typu polymeru při navážce 1,5 mg dexametazonu .	52
Graf 15: Průměrný drug-load v závislosti na typu polymeru .....	53
Graf 16: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25 ....	54
Graf 17: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A..	54
Graf 18: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E..	55
Graf 19: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3 .....	55
Graf 20: Závislost velikosti na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2 .....	56
Graf 21: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 75/25 .....	58
Graf 22: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50A .....	59
Graf 23: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA 50/50E.....	59
Graf 24: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA T3	60
Graf 25: Závislost zeta potenciálu na vstupní navážce dexametazonu pro PLGA A2	60



## 7 SEZNAM LITERATURY

1. **DEVARAJAN, Padma V. a JAIN, Sanyog (ed.).** *Targeted Drug Delivery: Concepts and Design*. Online. *Advances in Delivery Science and Technology*. Cham: Springer International Publishing, 2015. ISBN 978-3-319-11354-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11355-5>. [cit. 2024-03-06].
2. **TEWABE, Ashagrachew; ABATE, Atlaw; TAMRIE, Manaye; SEYFU, Abyou a ABDELA SIRAJ, Ebrahim.** Targeted Drug Delivery — From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. Online. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*. 2021, roč. 14, s. 1711-1724. ISSN 1178-2390. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/JMDH.S313968>. [cit. 2024-03-06].
3. **MARCUCCI, Fabrizio a LEFOULON, François.** Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. Online. *Drug Discovery Today*. 2004, roč. 9, č. 5, s. 219-228. ISSN 13596446. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02988-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02988-X). [cit. 2024-05-08].
4. **YOO, Jihye; PARK, Changhee; YI, Gawon; LEE, Donghyun a KOO, Heebeom.** Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. Online. *Cancers*. 2019, roč. 11, č. 5. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers11050640>. [cit. 2024-05-08].
5. **HICKEY, John W.; SANTOS, Jose Luis; WILLIFORD, John-Michael a MAO, Hai-Quan.** Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. Online. *Journal of Controlled Release*. 2015, roč. 219, s. 536-547. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.006>. [cit. 2024-03-01].
6. **HANS, M.L a LOWMAN, A.M.** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. Online. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, roč. 6, č. 4, s. 319-327. ISSN 13590286. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(02\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00117-1). [cit. 2024-03-06].
7. **KUMARI, Preeti; GHOSH, Balaram a BISWAS, Swati.** Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. Online. *Journal of Drug Targeting*. 2016, roč. 24, č. 3, s. 179-191. ISSN 1061-186X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1051049>. [cit. 2024-03-05].

8. **LIU, Daxing a AUGUSTE, Debra T.** Cancer targeted therapeutics: From molecules to drug delivery vehicles. Online. *Journal of Controlled Release*. 2015, roč. 219, s. 632-643. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.041>. [cit. 2024-03-06].
9. **NAKAMURA, Yuko; MOCHIDA, Ai; CHOYKE, Peter L. a KOBAYASHI, Hisataka.** Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? Online. *Bioconjugate Chemistry*. 2016, roč. 27, č. 10, s. 2225-2238. ISSN 1043-1802. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00437>. [cit. 2024-05-08].
10. **FAHMY, Tarek M.; FONG, Peter M.; GOYAL, Amit a SALTZMAN, W. Mark.** Targeted for drug delivery. Online. *Materials Today*. 2005, roč. 8, č. 8, s. 18-26. ISSN 13697021. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)71033-6](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)71033-6). [cit. 2024-04-08].
11. **ROSENBLUM, Daniel; JOSHI, Nitin; TAO, Wei; KARP, Jeffrey M. a PEER, Dan.** Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. Online. *Nature Communications*. 2018, roč. 9, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>. [cit. 2024-04-05].
12. **BACHHAV, Yogeshwar (ed.).** *Targeted Drug Delivery*. Online. Methods and Principles in Medicinal Chemistry. Wiley, 2022. ISBN 9783527347810. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9783527827855>. [cit. 2024-03-22].
13. **ULBRICH, Wiebke a LAMPRECHT, Alf.** Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. Online. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010, roč. 7, č. suppl\_1. ISSN 1742-5689. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0285.focus>. [cit. 2024-03-13].
14. **KELLY, Ciara; JEFFERIES, Caroline a CRYAN, Sally-Ann.** Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. Online. *Journal of Drug Delivery*. 2011, roč. 2011, s. 1-11. ISSN 2090-3014. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2011/727241>. [cit. 2024-03-18].
15. **LIU, Hanxiao; LV, Hui; DUAN, Xuehui; DU, Yan; TANG, Yixuan et al.** Advancements in Macrophage-Targeted Drug Delivery for Effective Disease

Management. Online. *International Journal of Nanomedicine*. 2023, roč. 18, s. 6915-6940. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S430877>. [cit. 2024-03-16].

16. **HE, Wei; KAPATE, Neha; SHIELDS, C. Wyatt a MITRAGOTRI, Samir.** Drug delivery to macrophages: A review of targeting drugs and drug carriers to macrophages for inflammatory diseases. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020, roč. 165-166, s. 15-40. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.12.001>. [cit. 2024-03-23].

17. **DIAZ-JIMENEZ, David; KOLB, Joseph P. a CIDLOWSKI, John A.** Glucocorticoids as Regulators of Macrophage-Mediated Tissue Homeostasis. Online. *Frontiers in Immunology*. 2021, roč. 12. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669891>. [cit. 2024-03-21].

18. **CHELLAT, Fatiha; MERHI, Yahye; MOREAU, Alain a YAHIA, L'Hocine.** Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. Online. *Biomaterials*. 2005, roč. 26, č. 35, s. 7260-7275. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.044>. [cit. 2024-04-05].

19. **ELMOWAFY, Mohammed; SHALABY, Khaled; ELKOMY, Mohammed H.; ALSAIDAN, Omar Awad; GOMAA, Hesham A. M. et al.** Polymeric Nanoparticles for Delivery of Natural Bioactive Agents: Recent Advances and Challenges. Online. *Polymers*. 2023, roč. 15, č. 5. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15051123>. [cit. 2024-04-07].

20. **GAUMET, Marie; VARGAS, Angelica; GURNY, Robert a DELIE, Florence.** Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. Online. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, roč. 69, č. 1, s. 1-9. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>. [cit. 2024-03-25].

21. **ATHANASOPOULOU, Foteini; MANOLAKAKIS, Michail; VERNIA, Santiago a KAMALY, Nazila.** Nanodrug delivery systems for metabolic chronic liver diseases: advances and perspectives. Online. *Nanomedicine*. 2023, roč. 18, č. 1, s. 67-84. ISSN 1743-5889. Dostupné z: <https://doi.org/10.2217/nmm-2022-0261>. [cit. 2024-04-08].

22. **LI, Chun a WALLACE, Sidney.** Polymer-drug conjugates: Recent development in clinical oncology. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, roč. 60, č. 8, s. 886-898. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.009>. [cit. 2024-05-08].
23. **YETISGIN, Abuzer Alp; CETINEL, Sibel; ZUVIN, Merve; KOSAR, Ali a KUTLU, Ozlem.** Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 9. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>. [cit. 2024-04-11].
24. **MISHRA, Abhinav P.; CHANDRA, Suresh; TIWARI, Ruchi; SRIVASTAVA, Ashish a TIWARI, Gaurav.** Therapeutic Potential of Prodrugs Towards Targeted Drug Delivery. Online. *The Open Medicinal Chemistry Journal*. 2018, roč. 12, č. 1, s. 111-123. ISSN 1874-1045. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1874104501812010111>. [cit. 2024-05-08].
25. **SINGH, Rajesh a LILLARD, James W.** Nanoparticle-based targeted drug delivery. Online. *Experimental and Molecular Pathology*. 2009, roč. 86, č. 3, s. 215-223. ISSN 00144800. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>. [cit. 2024-04-15].
26. **ABDEL-MOTTALEB, Mona M.A.; BEDUNEAU, Arnaud; PELLEQUER, Yann a LAMPRECHT, Alf.** Stability of fluorescent labels in PLGA polymeric nanoparticles: Quantum dots versus organic dyes. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, roč. 494, č. 1, s. 471-478. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.050>. [cit. 2024-04-15].
27. **JAISWAL, Piyush; GIDWANI, Bina a VYAS, Amber.** Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016, roč. 44, č. 1, s. 27-40. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.909822>. [cit. 2024-04-12].
28. **SU, Shi a KANG, Peter M.** Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. Online. *Nanomaterials*. 2020, roč. 10, č. 4. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano10040656>. [cit. 2024-04-12].

29. **BENNET, Devasier a KIM, Sanghyo.** Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. Online. In: SEZER, Ali Demir (ed.). *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech, 2014. ISBN 978-953-51-1628-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/58422>. [cit. 2024-04-16].
30. **MAHMUD, Abdullah; XIONG, Xiao-Bing; ALIABADI, Hamidreza Montazeri a LAVASANIFAR, Afsaneh.** Polymeric micelles for drug targeting. Online. *Journal of Drug Targeting*. 2008, roč. 15, č. 9, s. 553-584. ISSN 1061-186X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10611860701538586>. [cit. 2024-05-05].
31. **KESHARWANI, Prashant; JAIN, Keerti a JAIN, Narendra Kumar.** Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. Online. *Progress in Polymer Science*. 2014, roč. 39, č. 2, s. 268-307. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>. [cit. 2024-05-08].
32. **TAMMAM, Salma N.; AZZAZY, Hassan M. E. a LAMPRECHT, Alf.** Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. Online. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2015, roč. 11, č. 4, s. 555-577. ISSN 15507033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2017>. [cit. 2024-04-16].
33. **CAI, An-Yong; ZHU, Ying-Jie a QI, Chao.** Biodegradable Inorganic Nanostructured Biomaterials for Drug Delivery. Online. *Advanced Materials Interfaces*. 2020, roč. 7, č. 20. ISSN 2196-7350. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/admi.202000819>. [cit. 2024-04-12].
34. **KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar a YADAV, Subhash C.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, roč. 75, č. 1, s. 1-18. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>. [cit. 2024-04-11].
35. **BANIK, Brittany L.; FATTAHI, Pouria a BROWN, Justin L.** Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. Online. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2016, roč. 8, č. 2, s. 271-299. ISSN 1939-5116. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/wnan.1364>. [cit. 2024-04-12].
36. **PANYAM, Jayanth a LABHASETWAR, Vinod.** Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Online. *Advanced Drug Delivery*

*Reviews*. 2003, roč. 55, č. 3, s. 329-347. ISSN 0169409X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4). [cit. 2024-04-15].

37. **PRAJAPATI, Shiv Kumar; JAIN, Ankit; JAIN, Aakanchha a JAIN, Sourabh.** Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. Online. *European Polymer Journal*. 2019, roč. 120. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.018>. [cit. 2024-04-14].

38. **SREENA, Radhakrishnan a NATHANAEL, Arputharaj Joseph.** Biodegradable Biopolymeric Nanoparticles for Biomedical Applications-Challenges and Future Outlook. Online. *Materials*. 2023, roč. 16, č. 6. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma16062364>. [cit. 2024-04-14].

39. **DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al.** PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>. [cit. 2024-04-16].

40. **MAKADIA, Hirenkumar K. a SIEGEL, Steven J.** Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Online. *Polymers*. 2011, roč. 3, č. 3, s. 1377-1397. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym3031377>. [cit. 2024-04-16].

41. **ASTETE, Carlos E. a SABLIOV, Cristina M.** Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. Online. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, roč. 17, č. 3, s. 247-289. ISSN 0920-5063. Dostupné z: <https://doi.org/10.1163/156856206775997322>. [cit. 2024-04-16].

42. **KALEPU, Sandeep a NEKKANTI, Vijaykumar.** Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. Online. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2015, roč. 5, č. 5, s. 442-453. ISSN 22113835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>. [cit. 2024-04-05].

43. **WEN, Hong; JUNG, Huijeong a LI, Xuhong.** Drug Delivery Approaches in Addressing Clinical Pharmacology-Related Issues: Opportunities and Challenges.

Online. *The AAPS Journal*. 2015, roč. 17, č. 6, s. 1327-1340. ISSN 1550-7416. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9814-9>. [cit. 2024-03-26].

44. **SHAH, Afzal; AFTAB, Saima; NISAR, Jan; ASHIQ, Muhammad Naeem a IFTIKHAR, Faiza Jan.** Nanocarriers for targeted drug delivery. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021, roč. 62. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102426>. [cit. 2024-03-26].

45. **BÖHME, David a BECK-SICKINGER, Annette G.** Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy. Online. *Journal of Peptide Science*. 2015, roč. 21, č. 3, s. 186-200. ISSN 1075-2617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/psc.2753>. [cit. 2024-04-08].

46. **PETRAK, Karel.** Essential properties of drug-targeting delivery systems. Online. *Drug Discovery Today*. 2005, roč. 10, č. 23-24, s. 1667-1673. ISSN 13596446. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03698-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03698-6). [cit. 2024-04-02].

47. **GIANNITRAPANI, Lydia.** Nanotechnology applications for the therapy of liver fibrosis. Online. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, roč. 20, č. 23. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7242>. [cit. 2024-04-04].

48. **OLUSANYA, Temidayo; HAJ AHMAD, Rita; IBEGBU, Daniel; SMITH, James a ELKORDY, Amal.** Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. Online. *Molecules*. 2018, roč. 23, č. 4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>. [cit. 2024-04-02].

49. **JARACZ, Stanislav; CHEN, Jin; KUZNETSOVA, Larisa V. a OJIMA, Iwao.** Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. Online. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005, roč. 13, č. 17, s. 5043-5054. ISSN 09680896. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.084>. [cit. 2024-04-08].

50. **ZAZO, Hinojal; COLINO, Clara I. a LANA O, José M.** Current applications of nanoparticles in infectious diseases. Online. *Journal of Controlled Release*. 2016, roč. 224, s. 86-102. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.008>. [cit. 2024-05-08].

51. **PINTO-ALPHANDARY, Huguette; ANDREMONT, Antoine a COUVREUR, Patrick.** Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research

and applications. Online. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, roč. 13, č. 3, s. 155-168. ISSN 09248579. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00121-1). [cit. 2024-05-07].

52. **YEH, Yuan-Chieh; HUANG, Tse-Hung; YANG, Shih-Chun; CHEN, Chin-Chang a FANG, Jia-You.** Nano-Based Drug Delivery or Targeting to Eradicate Bacteria for Infection Mitigation: A Review of Recent Advances. Online. *Frontiers in Chemistry*. 2020, roč. 8. ISSN 2296-2646. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00286>. [cit. 2024-04-08].

53. **MAZLAN, Mohd Khairul Nizam; MOHD TAZIZI, Mohammad Hafizie Dianel; AHMAD, Rosliza; NOH, Muhammad Amirul Asyraf; BAKHTIAR, Athirah et al.** Antituberculosis Targeted Drug Delivery as a Potential Future Treatment Approach. Online. *Antibiotics*. 2021, roč. 10, č. 8. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080908>. [cit. 2024-04-02].

54. **RAMANA, Lakshmi Narashimhan; ANAND, Appakkudal R.; SETHURAMAN, Swaminathan a KRISHNAN, Uma Maheswari.** Targeting strategies for delivery of anti-HIV drugs. Online. *Journal of Controlled Release*. 2014, roč. 192, s. 271-283. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.08.003>. [cit. 2024-04-08].

55. **LEMBO, David a CAVALLI, Roberta.** Nanoparticulate Delivery Systems for Antiviral Drugs. Online. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 2010, roč. 21, č. 2, s. 53-70. ISSN 2040-2066. Dostupné z: <https://doi.org/10.3851/IMP1684>. [cit. 2024-04-03].

56. **SOLIMAN, Ghareb M.** Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017, roč. 523, č. 1, s. 15-32. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.019>. [cit. 2024-04-03].

57. **HALEY, Rebecca M a VON RECUM, Horst A.** Localized and targeted delivery of NSAIDs for treatment of inflammation: A review. Online. *Experimental Biology and Medicine*. 2019, roč. 244, č. 6, s. 433-444. ISSN 1535-3702. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1535370218787770>. [cit. 2024-04-05].



58. ŠVIHOVEC, Jan; BULTAS, Jan; ANZENBACHER, Pavel; CHLÁDEK, Jaroslav; PŘÍBORSKÝ, Jan et al. (ed.). *Farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
59. LÜHDER, Fred a REICHARDT, Holger. Novel Drug Delivery Systems Tailored for Improved Administration of Glucocorticoids. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, roč. 18, č. 9. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms18091836>. [cit. 2024-04-08].
60. LU, Yingjuan; YANG, Jun a SEGA, Emanuela. Issues related to targeted delivery of proteins and peptides. Online. *The AAPS Journal*. 2006, roč. 8, č. 3, s. E466-E478. ISSN 1550-7416. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/aapsj080355>. [cit. 2024-04-02].
61. XIA, Wentao; TAO, Zixuan; ZHU, Bin; ZHANG, Wenxiang; LIU, Chang et al. Targeted Delivery of Drugs and Genes Using Polymer Nanocarriers for Cancer Therapy. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22179118>. [cit. 2024-04-03].
62. ALMEIDA, A a SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, roč. 59, č. 6, s. 478-490. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.007>. [cit. 2024-04-03].
63. TAN, Mei Lin; CHOONG, P.F.M. a DASS, C.R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. Online. *Peptides*. 2010, roč. 31, č. 1, s. 184-193. ISSN 01969781. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.10.002>. [cit. 2024-04-04].
64. PubChem [Online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Summary for CID 5743, Dexamethasone; [cit. 2024-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone>
65. BECK-BROICHSITTER, Moritz. Stability-limit „Ouzo region“ boundaries for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. Online.

*International Journal of Pharmaceutics*. 2016, roč. 511, č. 1, s. 262-266. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.010>. [cit. 2024-05-13].

66. **GOMEZGAETE, C; TSAPIS, N; BESNARD, M; BOCHOT, A a FATTAL, E.** Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, roč. 331, č. 2, s. 153-159. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.028>. [cit. 2024-04-07].

67. **DANHIER, Fabienne; ANSORENA, Eduardo; SILVA, Joana M.; COCO, Régis; LE BRETON, Aude et al.** PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. Online. *Journal of Controlled Release*. 2012, roč. 161, č. 2, s. 505-522. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>. [cit. 2024-04-08].

68. **SNEJDROVA, Eva; PODZIMEK, Stepan; MARTISKA, Juraj; HOLAS, Ondrej a DITTRICH, Milan.** Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. Online. *Acta Pharmaceutica*. 2020, roč. 70, č. 1, s. 63-75. ISSN 1846-9558. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0011>. [cit. 2024-05-08].

69. **JACKSON, Meredith A.; PATEL, Shrusti S.; YU, Fang; COTTAM, Matthew A.; GLASS, Evan B. et al.** Kupffer cell release of platelet activating factor drives dose limiting toxicities of nucleic acid nanocarriers. Online. *Biomaterials*. 2021, roč. 268. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120528>. [cit. 2024-04-04].

70. **HERNÁNDEZ-GIOTTONINI, Karol Yesenia; RODRÍGUEZ-CÓRDOVA, Rosalva Josefina; GUTIÉRREZ-VALENZUELA, Cindy Alejandra; PEÑUÑURI-MIRANDA, Omar; ZAVALA-RIVERA, Paul et al.** PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. Online. *RSC Advances*. 2020, roč. 10, č. 8, s. 4218-4231. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9RA10857B>. [cit. 2024-04-05].

71. **GEBREEL, Rana M; EDRIS, Noha A; ELMOFTY, Hala M; TADROS, Mina I; EL-NABARAWI, Mohamed A et al.** Development and Characterization of PLGA

Nanoparticle-Laden Hydrogels for Sustained Ocular Delivery of Norfloxacin in the Treatment of Pseudomonas Keratitis: An Experimental Study. Online. *Drug Design, Development and Therapy*. 2021, roč. 15, s. 399-418. ISSN 1177-8881. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S293127>. [cit. 2024-04-08].

72. **ONUGWU, Adaeze L.; ATTAMA, Anthony A.; NNAMANI, Petra O.; ONUGWU, Sabastine O.; ONUIGBO, Ebele B. et al.** Development and optimization of solid lipid nanoparticles coated with chitosan and poly(2-ethyl-2-oxazoline) for ocular drug delivery of ciprofloxacin. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022, roč. 74. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103527>. [cit. 2024-04-07].

73. **BHATTACHARJEE, Sourav.** DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Online. *Journal of Controlled Release*. 2016, roč. 235, s. 337-351. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>. [cit. 2024-04-08].

74. **BOLTNAROVA, Barbora; KUBACKOVA, Jana; SKODA, Josef; STEFELA, Alzbeta; SMEKALOVA, Monika et al.** PLGA Based Nanospheres as a Potent Macrophage-Specific Drug Delivery System. Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 3. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano11030749>. [cit. 2024-05-08].