

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



ACIDOREZISTENTNÍ POLYMERNÍ NANOČÁSTICE:
PŘÍPRAVA A HODNOCENÍ

Diplomová práce

Hradec Králové 2019

Adélka Semrádová

„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

.....

Adélka Semrádová

Děkuji PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Velké díky patří též konzultantce Mgr. Janě Kubačkové za trpělivost, ochotu, cenné rady a připomínky při zpracovávání práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia. Děkuji za zařazení do projektu SVV 260 401.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitelé: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Mgr. Jana Kubačková

Posluchač: Adélka Semrádová

Název diplomové práce: Acidorezistentní polymerní nanočástice: příprava a hodnocení

Použití nanočásticových systémů pro perorální podávání léčiv má velký potenciál v terapii zánětlivých onemocnění střev, jako je Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida. Nanočásticové systémy jsou účinněji akumulovány v místě zánětu, specificky cílí na makrofágy a umožňují tak lokálně řešit zánět a zároveň redukovat nežádoucí systémové účinky.

Cílem výzkumu bylo připravit farmaceutické formulace na bázi polymerních nanočástic. Pro přípravu nanočástic metodou nanoprecipitace byly použity tři typy poly(laktid-co-glykolidu) – dva lineární a jeden větvený polymer – v různém poměru s acidorezistentním polymerem celulosa-acetát ftalátem (CAF). Rhodamin B byl použit jako modelová účinná látka. Byl hodnocen vliv acidorezistentní složky na velikost a zeta potenciál nanočástic. Navíc byly provedeny disoluční testy v prostředí o kyselém a fyziologickém pH.

Bylo zjištěno, že CAF nemá žádný signifikantní vliv na velikost částic a jejich stabilitu. Dále pak, že se uvolňování rhodaminu B v kyselém prostředí snižuje se vzrůstajícím zastoupením CAF v nanočásticích. Nicméně i nanočástice tvořené pouze poly(laktid-co-glykolidem) vykazovaly určitou acidorezistenci. Ta by mohla být vysvětlena jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi souvisejícími s vyšším obsahem karboxylových skupin v rozvětvené polymerní struktuře.

Klíčová slova: nanočástice, biodegradovatelnost, acidorezistentní, PLGA, celulosa-acetát ftalát

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Consultants: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Mgr. Jana Kubačková

Student: Adélka Semrádová

Title of thesis: Acidoresistant polymeric nanoparticles: preparation and assessment

Use of oral drug delivery nanosystems has a great potential in therapy of inflammatory bowel disease, which includes Crohn's disease and ulcerative colitis. Nanosized delivery systems are more efficiently accumulated at the inflammatory site, targeting specifically macrophages to resolve inflammation locally and reduce systemic adverse effects.

The aim of this research was to prepare pharmaceutical formulations based on polymeric nanoparticles. Three types of poly(lactide-co-glycolide) – two linear and one branched polymer – together with the acidoresistant polymer cellulose-acetate phthalate (CAF) in various ratios were used to prepare nanoparticles by nanoprecipitation method. Rhodamine B was used as model active substance. The effect of acidoresistant component content on size and zeta potential of the nanoparticles was evaluated. Furthermore, dissolution tests were performed at both acidic and physiological pH.

It was found that CAF doesn't have any significant effect on size of the particles and their stability. Moreover, the release of rhodamine B in the acidic environment decreases with increasing proportion of CAF in the nanoparticles. Nevertheless, the nanoparticles consisting only from poly(lactide-co-glycolide) also showed acidoresistance that could be explained by their physicochemical properties determined by increased carboxyl content within branched polymer structure.

Keywords: nanoparticles, biodegradability, acidoresistance, PLGA, cellulose-acetate-phthalate

OBSAH

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
1 Zadání.....	8
2 Úvod.....	9
3 Teoretická část.....	10
3. 1 Idiopatické střevní záněty.....	10
3. 1. 1 Charakteristika onemocnění.....	10
3. 1. 2 Terapie IBD.....	11
3. 2 Farmaceutické formulace v terapii IBD.....	13
3. 2. 1 Bariéry použití běžných formulací v terapii IBD.....	13
3. 2. 2 Nanočástice v terapii IBD.....	14
3. 3 Biodegradovatelné polymery používané v nanočásticových formulacích.....	16
3. 3. 1 Polyestery.....	17
3. 3. 1. 1 Poly(α -hydroxykyseliny).....	17
3. 3. 1. 2 Poly(ϵ -kaprolakton).....	18
3. 3. 1. 3 Poly(alkylkyanoakryláty).....	18
3. 3. 2 Polysacharidy.....	18
3. 4 Příprava polymerních nanočástic.....	19
3. 4. 1 Emulzní odpařovací metoda.....	20
3. 4. 2 Metoda emulze-difuze.....	20
3. 4. 3 Vysolování.....	21
3. 4. 4 Nanoprecipitace.....	21
4 Praktická část.....	23
4. 1 Použité přístroje.....	23
4. 2 Použité suroviny.....	23
4. 3 Pracovní postup.....	24
4. 3. 1 Příprava nanočástic.....	24
4. 3. 2 Lyofilizace nanočástic.....	25
4. 3. 2. 1 Princip lyofilizace.....	26
4. 3. 3 Měření velikosti částic a zeta potenciálu.....	26

4. 3. 3. 1 Princip měření velikosti částic	27
4. 3. 3. 2 Princip měření zeta potenciálu	28
4. 3. 4 Enkapsulační efektivita, výtěžnost a drug-loading	29
4. 3. 5 Disoluce	30
5 Výsledky a diskuse	34
5. 1 Měření velikosti částic a zeta potenciálu	34
5. 2 Hodnocení procesu enkapsulace a přípravy nanočástic	37
5. 3 Disoluce nanočástic	38
6 Závěr	52
7 Seznam zkratk	53
8 Seznam obrázků, tabulek a grafů	54
9 Použitá literatura	56

1 ZADÁNÍ

Cílem této práce bylo připravit a otestovat hybridní nanočástice na bázi biodegradovatelných polyesterů a acidorezistentního polymeru. Zamýšlenou aplikací těchto částic je terapie zánětlivých onemocnění zažívacího traktu. Hodnocení nanočástic si klade za cíl charakterizovat je z hlediska velikosti, povrchových vlastností a uvolňování enkapsulované látky v prostředí s rozdílným pH.

2 ÚVOD

Nanotechnologie je vědní disciplína, která se zabývá cílenou a přesnou manipulací s jednotlivými atomy a molekulami tak, aby vznikl nový objekt. Pracuje přitom se strukturami o velikostech v řádu nanometrů (10^{-9} m), což je pro představu velikost odpovídající asi jedné deseti tisícině tloušťky lidského vlasu.[1] Výzkum v oblasti nanotechnologií je velmi dynamický. Nanomateriály nalézají uplatnění například ve strojírenství, elektronice, stavebnictví, chemickém průmyslu, potravinářství nebo třeba ve zdravotnictví.

Také ve farmaceutické technologii se v posledních letech objevuje trend upouštění od běžných jednotkových lékových forem, jako jsou tablety, tobolky či masti, ve prospěch násobných forem, mezi které patří pelety, mikro- a nanočástice, a jejich postupnému zavádění do terapeutické praxe. Hlavním důvodem jsou nesporné výhody, které používání částicových systémů přináší. Jde především o účinnější a bezpečnější farmakoterapii. Nanočásticové systémy mohou sloužit jako nosiče pro transport léčiv do místa vstřebávání, nebo přímo do cíle jejich terapeutického působení. Mohou být použity pro transport jak hydrofilních a lipofilních léčiv, tak proteinů, vakcín nebo biologických makromolekul. Očekává se přitom zmírnění nežádoucích účinků terapie a zvýšení účinku terapie při současném snížení dávek účinných látek. Velký potenciál mají proto nanočástice v terapii nádorových onemocnění, jako nosiče cytostatik, ale také v cílené distribuci antibiotik a antiparazitik, v perorálních lékových transportních systémech pro inzulin, proteiny, geny, pro vakcíny i při topické aplikaci.[2]

Tato diplomová práce je zaměřena konkrétně na acidorezistentní polymerní nanočástice, které mají vzhledem k odolnosti vůči kyselému prostředí perspektivu jako nosiče léčiv pro terapii chronických onemocnění střev, jako jsou Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida, při kterých je vhodná perorální aplikace léčiv.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3. 1 Idiopatické střevní záněty

3. 1. 1 Charakteristika onemocnění

Nespecifické střevní záněty, neboli inflammatory bowel diseases (IBD), jsou chronická zánětlivá onemocnění gastrointestinálního traktu, mezi která patří především Crohnova choroba (CN) a ulcerózní kolitida (UC).[3]

Uvádí se, že v České republice je asi 40 000 pacientů s diagnostikovanými IBD s tím, že výskyt onemocnění stále stoupá. Od roku 2005 došlo k zvýšení výskytu CN o 44% a UC o 20%.[4]

IBD mohou postihnout prakticky kohokoliv v jakémkoliv věku, nejčastěji však bývají diagnostikovány u lidí ve věku mezi 15 až 35 lety nebo 60 až 80 lety.[3] Nicméně stále jsou považována za skrytá onemocnění, která jsou často stigmatizována, proto lze předpokládat, že ve skutečnosti je počet lidí trpících IBD mnohem vyšší.[5, 6]

Ačkoliv jsou CN a UC vzájemně odlišné patologické stavy, mají několik společných znaků, které znesnadňují jejich diagnostiku. V obou případech se jedná o onemocnění s dosud neobjasněnou příčinou. Předpokládá se, že poškození střeva je způsobeno imunitní reakcí, přičemž dochází buď k nepřiměřené imunitní reakci organismu na antigen, který je běžnou součástí střevní sliznice, tzn., že jde o autoimunitní reakci, nebo dochází k reakci na nadměrnou antigenní stimulaci. Na patogenezi onemocnění se výrazně podílí genetická predispozice. K propuknutí nemoci je však potřeba spouštěč, kterým je nejčastěji nějaký faktor zevního prostředí.[7–9]

Jak již samotný název nemoci napovídá, v případě UC se jedná o ulcerózně hemoragický zánět, který postihuje primárně rektum, odkud se rozšiřuje proximálně do tlustého střeva.[3] Zánětlivé změny jsou kontinuální a jsou omezeny pouze na sliznici a submukózu, k postižení svaloviny a serózy nedochází.[8] V některých případech bývá postiženo tlusté střevo v celé délce, takový stav je pak označován jako pankolitida.[10]

Naproti tomu v případě CN se jedná o segmentární granulomatózní zánět celé stěny trávicí trubice.[3] To znamená, že se může vyskytnout v jakékoliv části

gastrointestinálního traktu, od dutiny ústní po anus, a stěnu trávicí trubice postihuje transmurálně, ve všech jejích vrstvách. Nejčastěji bývá zánětem postiženo terminální ileum a tračník. Typické pro CN je střídání zdravých a zánětlivých segmentů.[8, 11]

V souvislosti s lokalizací zánětu a mírou poškození trávicího traktu dochází k různým projevům onemocnění. Pacienti s CN jsou sužováni především bolestí břicha, průjmy a hubnutím. K hubnutí dochází jak z důvodu ztráty živin při opakujících se úporných průjmech, tak z důvodu malabsorpce způsobené zánětlivým poškozením střevní stěny. Krev ve stolici je typická spíše pro UC, nicméně pokud je poškozeno tlusté střevo, může se objevit i u CN. Mezi projevy UC pak patří hlavně bolestivé nucení na stolici (tenesmy), krvácení z konečníku a průjmy s přítomností krve a hlenu. Onemocnění bývají doprovázena také celkovou únavou, související s anémií v důsledku krvácení, a horečkou.[3, 7, 8]

Tabulka 1: Rozdíly mezi Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou[12]

Crohnova nemoc	ulcerózní kolitida
může postihnout celý trávicí systém, od úst až po konečník	postihuje vždy konečník a různě rozsáhlý úsek tlustého střeva
zasazené úseky střeva se střídají se zdravými	postihuje střevo vcelku, bez zdravých úseků
hlavním příznakem jsou průjmy, které jsou většinou bez příměsí	hlavním příznakem je průjem s příměsí krve
zánět postihuje celou střevní stěnu	zánět zasahuje jenom střevní sliznici
často je spojena se vznikem píštělí	píštěle se vytvářejí jen vzácně
nejčastěji postihuje pacienty ve věku 18 až 35 let	nejčastěji postihuje pacienty ve věku 30 až 40 let
výskyt u obou pohlaví je stejný	vyskytuje se 1,5krát častěji u žen

3. 1. 2 Terapie IBD

Vzhledem ke stále nejasné etiologii IBD se jedná o nevléčitelná onemocnění. Vhodnou terapií je však možno dosáhnout klidové fáze neboli remise, kdy je pacient prakticky bez příznaků a může žít kvalitní život bez větších omezení. V průběhu onemocnění však dochází ke střídání klidových fází s opětovnými vzplanutími nemoci, tzv. relapsy. Léčba IBD je proto dlouhodobá a často kombinovaná. Nezahrnuje pouze léčbu medikamentózní. Nedílnou součástí komplexní péče o pacienty s IBD je také léčba nutriční a chirurgická.[13]

Podle stanovených cílů lze medikamentózní léčbu IBD rozdělit na dva typy. Prvním typem je tzv. indukční léčba s cílem co nejrychleji snížit zánětlivou aktivitu a zajistit ústup klinických, laboratorních a endoskopických známek nemoci. Druhým typem je pak dlouhodobá udržovací terapie, která je zaměřena na zabránění návratnosti subjektivních i objektivních znaků nemoci. Volba optimální medikamentózní terapie vyžaduje individuální posouzení rozsahu, aktivity a dosavadního vývoje nemoci, předchozí léčby a respektování vůle poučeného pacienta.[13]

Ve většině případů je léčba zahájena postupným navyšováním dávek a počtů protizánětlivých léčiv různých lékových skupin. Pokud není dosaženo klinického efektu, následuje biologická léčba ve specializovaných pracovištích, nebo je pacient indikován k chirurgické léčbě.[13] Uvádí se, že po dvacetiletém průběhu onemocnění UC se chirurgickému výkonu musí podrobit asi 20% nemocných. V případě CN je to až 90% pacientů.[8]

Základ medikamentózní léčby tvoří aminosalicyláty – sulfasalazin a mesalazin, které jsou používány k terapii lehkých a středně těžkých IBD a především pak k udržení remise. Sulfasalazin byl prvním léčivem zavedeným do léčby IBD před více než 70 lety. Jedná se o proléčivo, které v tlustém střevě podléhá mikrobiálnímu štěpení na dvě složky, a to derivát kyseliny acetylsalicylové mesalazin (kyselina 5-aminosalicylová, 5-ASA) a sulfonamid sulfapyridin. Bylo zjištěno, že hlavní účinnou látkou je 5-ASA a sulfapyridin slouží pouze jako „nosič“. Navíc užívání sulfasalazinu přináší řadu nežádoucích účinků, například útlum krvetvorby, hemolytickou anémii či hepatotoxicitu, které jsou způsobeny právě sulfapyridinem. Proto vývoj vedl k užívání samotné 5-ASA, která sice nemá větší účinnost než sulfasalazin, ale je lépe snášena a má podstatně méně nežádoucích účinků. Podávání mesalazinu však vyžaduje speciální lékové formy, které brání vstřebávání účinné látky již v tenkém střevě.[3, 8, 14, 15]

Další významnou skupinu látek v terapii IBD tvoří kortikoidy (prednison, prednisolon a budesonid) s protizánětlivou a imunomodulační aktivitou, které jsou indikovány především ke zvládnutí akutních zánětlivých stavů. Naopak jejich dlouhodobé užívání vede k vážným nežádoucím účinkům, jako je Cushingův syndrom nebo hypofunkce nadledvin. Úspěšně jsou v terapii IBD používány

kortikoidy s topickým účinkem ve formě rektální pěny a minimem systémových nežádoucích účinků.[3, 14, 15]

V posledních letech jsou stále častěji užívány i jiné látky s imunosupresivním a imunomodulačním účinkem než jsou kortikoidy.[3] V klinické praxi se využívají především thiopuriny (azathioprin, 6-merkaptopurin), methotrexát a v omezené míře také kalcineurinové inhibitory (cyklosporin A, takrolimus).[13]

Biologická (cílená) léčba představuje největší pokrok v terapii IBD. Prvním typem biologických léčiv používaných u IBD byly monoklonální protilátky zaměřené proti protizánětlivému cytokinu TNF α (infliximab, adalimumab a golimumab), který je ve zvýšené míře produkován imunokompetentními buňkami v místě zánětu. Druhým typem jsou monoklonální protilátky blokující migraci aktivovaných lymfocytů z kapilárního řečiště do tkáně či inhibující signální dráhu IL-12/IL-23, jejichž zástupcem je vedolizumab. Nevýhodou biologické léčby je však její krátkodobý účinek, na který vzniká tolerance, a nežádoucí účinky, především oportunní infekce nebo indukované imunopatologické reakce.[14–16]

Vzhledem k častým odlišnostem v mikrobiální flóře u pacientů s IBD, může být prospěšná i cílená modifikace složení střevní mikroflóry probiotiky, chemoterapeutiky a antibiotiky.[13]

3. 2 Farmaceutické formulace v terapii IBD

3. 2. 1 Bariéry použití běžných formulací v terapii IBD

Běžné formulace pro perorální podání mají v terapii IBD omezené použití, protože jsou obecně určeny k dosažení distribuce léčiva do celého organismu, což přináší nežádoucí systémové účinky a toxicitu. Z tohoto důvodu jsou v racionální terapii preferovány orální formulace s lokálním účinkem, které zajišťují, že léčivo bude dodáno do místa účinku v trávicím traktu, aniž dojde k jeho vstřebání nebo pouze k minimálnímu vstřebání do systémové cirkulace.[10]

Jak již bylo naznačeno, současné terapeutické přístupy využívají řízené, především pak zpožděné uvolňování léčiv. Jedná se o používání proléčiv (např. proléčivo 5-ASA sulfasalazin), která jsou na účinnou látku přeměněna působením bakterií ve střevech. Dále jsou využívány pH-dependentní potahovací pomocné látky (např. celulóza-acetát ftalát, Eudragit® L a S) a matrice, kdy uvolňování léčiva závisí na pH gradientu v trávicím traktu. Můžeme se také setkat s časově dependentními

systemy, které závisí na době průchodu trávicím traktem. Tyto přístupy jsou však spojeny s rozdílnou účinností u jednotlivých pacientů. Příčinou jsou jak individuální rozdíly ve fyziologii trávicího traktu, tak změny související s chronickým průběhem zánětu nebo akutním vzplanutím nemoci.[8, 10, 17]

Slizniční zánět u IBD způsobuje patofyziologické změny, jako je narušení střevní bariéry v důsledku změn na sliznici, porušení střevních krypt a ulcerací. Dochází také ke zvýšené produkci hlenu a infiltraci buňkami zánětu (neutrofilů, makrofágů, lymfocytů a dendritickými buňkami). Během relapsu IBD mohou pacienti, kteří trpí těžkým zánětem sliznice, vykazovat také změněnou motilitu trávicího traktu a průjem, který v důsledku ovlivňuje střevní objem, pH a slizniční integritu. Zánětlivá odpověď spolu s těžkými průjmy také narušují střevní mikroflóru.[10]

Bariéry pro perorální cílenou distribuci léčiva do tlustého střeva se nachází jak na úrovni organismu, tak na úrovni tkání a buněk. Agresivní prostředí gastrointestinálního traktu, především pak žaludku, brání lékové formulaci dosažení cílových orgánů a intracelulární bariéry poté znemožňují uvolňování léčiva do specifických buněčných organel.[17]

3. 2. 2 Nanočástice v terapii IBD

Strategie využívající nanočástice jako nosiče účinných látek ukázaly slibné výsledky při zahrnutí fyziologických změn při IBD a využití těchto rozdílů ke zvýšení specifického dodávání léčiv do nemocné tkáně. Ukázalo se, že nanočásticové systémy jsou výhodnější než běžné formulace, protože jejich velikost vede k účinnějšímu cílení, lepší biologické dostupnosti v postižených tkáních a sníženým systémovým nežádoucím účinkům. Navíc mají podobnou nebo zlepšenou terapeutickou účinnost při nižších koncentracích léčiva v porovnání s běžnými formulacemi.[10, 18–20]

Zmenšení nosičů do velikosti v řádech nanometrů prodlužuje dobu jejich setrvání ve střevech a v oblastech postiženými zánětem. Zároveň umožňuje lepší a selektivnější dodání účinných látek do zánětlivé tkáně pomocí efektu zvýšené permeability a retence (EPR) a preferenční uptake nanočástic imunitními buňkami, jejichž počet je v místě zánětu značně zvýšen. Snížením průměru částic je též možné vyhnout se rychlé eliminaci nosiče průjmem, který je častým symptomem IBD.

K rychlé eliminaci nosičů nedochází také díky snadnému vychytávání do zánětlivé tkáně a buněk.[10]

Kumulace nanočástic v místě zánětu zvyšuje lokální koncentraci léčiva proti IBD. Nanočástice obecně podléhají buněčné internalizaci paracelulárním transportem nebo endocytózou do epiteliálních buněk gastrointestinálního traktu.[10, 21] Studie prokázaly, že akumulace závisí na velikosti částic s tím, že čím je průměr částice menší, tím je vyšší efekt akumulace v zánětlivé tkáni.[22]

O vlivu dalších fyzikálně-chemických vlastností nanočástic, kromě velikosti, na adhezi k zánětlivé tkáni je relativně málo informací. Nicméně byly popsány rozdílné výsledky týkající se vlivu povrchového náboje. Modifikace povrchového náboje mohou ovlivnit elektrostatické interakce mezi nanočásticemi a složkami gastrointestinálního traktu, přičemž by mělo dojít ke zvýšení selektivity k zánětlivé tkáni. V případě pozitivně nabitých nanočástic dochází k jejich ulpívání na povrchu sliznice v důsledku interakce mezi kladně nabitým nosičem a záporně nabitou stěvnou sliznicí. Adheze k sliznici může být výhodou, protože umožňuje lepší kontakt s povrchem sliznice pro buněčné vychytávání a uvolňování léčiva. Naproti tomu, aniontové nanočásticové systémy byly navrženy tak, aby přednostně adherovaly k zanícené tkáni prostřednictvím elektrostatické interakce s vyšší koncentrací pozitivně nabitých proteinů v zánětlivé oblasti. Aby však dosáhly zánětlivé tkáně, je potřeba, aby nosič pronikl vrstvou hlenu.[10, 23, 24] Vzhledem k malé velikosti ovšem menší částice vykazují lepší přilnavost k hlenové vrstvě, bez ohledu na jejich povrchový náboj.[22] Spíše než k imobilizaci po navázání na hlen (jako v případě kationtových nanočástic), jsou aniontové nanočástice schopny difuze hlenovou sítí v důsledku menší elektrostatické interakce s hlenem. Je však třeba poznamenat, že při průchodu gastrointestinálním traktem může dojít k navázání nosičů na další látky (např. žlučové kyseliny, mucin), které mohou náboj změnit.[10]

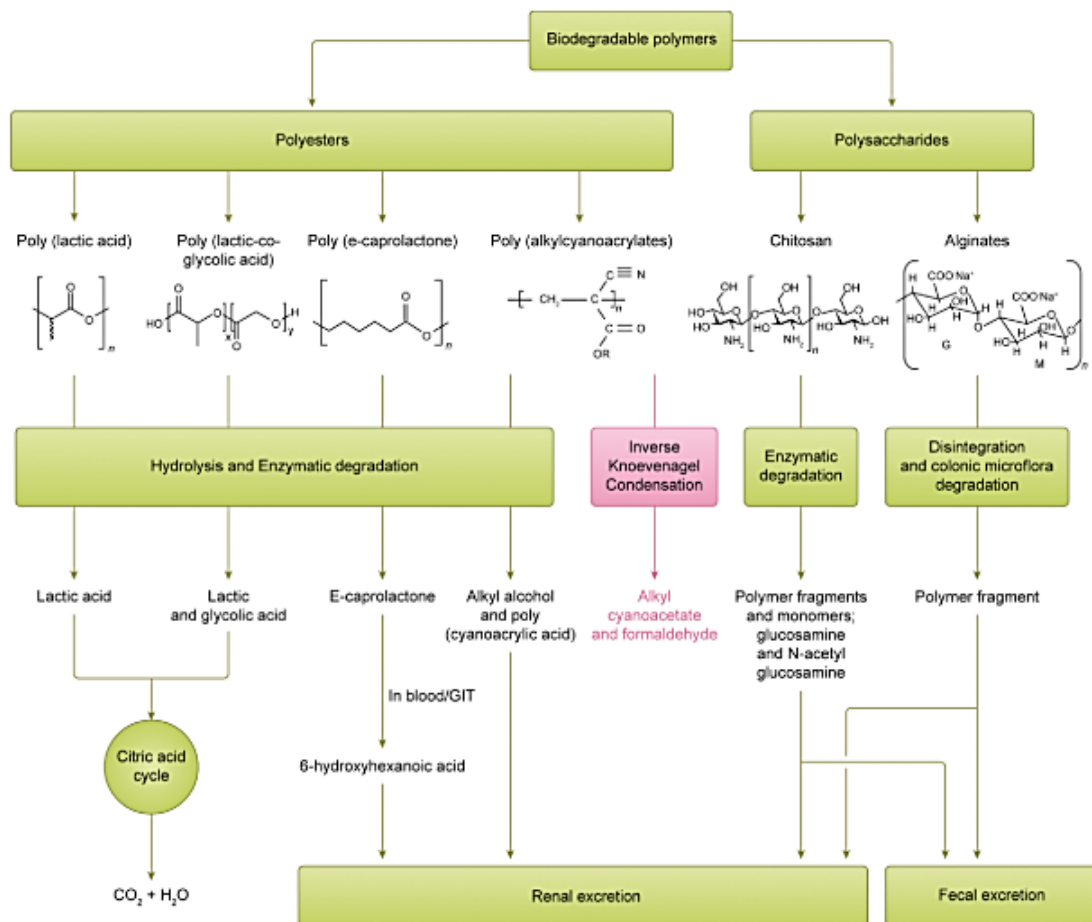
Dalším moderním přístupem je tzv. pegylace povrchu nanočástic, kdy je na povrch nanočástic navázán poly(ethylenglykol) (PEG). Dochází tak k vytvoření hydrofilní vrstvy, jež snižuje interakci nanočástic s intestinálním prostředím. Vzniklá částice je tedy hydrofilní a zároveň bez náboje a má tak vlastnosti, které minimalizují interakci a zvyšují translokaci přes hlen stejně tak jako přes mukózu, což je ideální pro dodávání léčiv cílených na IBD.[10, 25]

Použití pH-dependentních nanočásticových systémů využívá rozdílného pH v různých částech gastrointestinálního traktu. pH v terminální části ilea a tlustém střevě je obecně vyšší než v jiných oblastech gastrointestinálního traktu, tudíž dávková forma, která se rozpadá při vysokých hodnotách pH má potenciál pro místně specifické dodání do střeva. Nejjednodušší způsob představuje potažení nanočástic biokompatibilním pH-senzitivním polymerem, jako je například polymer Eudragit® S100. Řada studií *in vivo* zkoumala použití nanočástic závislých na pH pro cílení na tlusté střevo při IBD. Experimenty například prokázaly vynikající terapeutickou účinnost nanosfér s budesonidem pro zmírnění kolitidy ve srovnání s konvenčními enterosolventními mikročásticemi. Nanosféry vykazovaly vyšší hladiny v tlustém střevě a nižší systémovou biologickou dostupnost, stejně jako specifickou adhezi k ulcerované a zanícené slizniční tkáni tlustého střeva krysy.[10, 23, 26] Ačkoliv preklinické studie pH-dependentních nanosystémů byly slibné, stále zůstává velkým otázníkem interindividuální a intraindividuální variabilita pH a vyprazdňování gastrointestinálního traktu, stejně jako změna lumenálního pH v důsledku onemocnění, která může vést k selhání terapie.[10, 27, 28]

3. 3 Biodegradovatelné polymery používané v nanočásticových formulacích

Biologicky nerozložitelné polymery, jako jsou polyakrylamid a poly(methakrylát), jsou ve farmaceutických formulacích nahrazovány biodegradovatelnými polymery. Hlavním důvodem je riziko chronické toxicity v důsledku intracelulárního a tkáňového zatížení nerozložitelnými polymery.

Mezi používané biologicky rozložitelné polymery patří polyestery – kyselina polymlečná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), kyselina poly(laktid-ko-glykolová) (PLGA), poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) a poly(alkylkyanoakrylát) (PACA) – a polysacharidy alginát a chitosan.[2, 29] Na Obr. 1 je schematicky znázorněno biologické odbourávání uvedených polymerů.



Obr. 1: Schéma biologického odbourávání polymerů[29]

3. 3. 1 Polyestery

3. 3. 1. 1 Poly(α -hydroxykyseliny)

Poly(α -hydroxykyseliny), mezi které patří PLA a PLGA, jsou široce využívány pro přípravu nanočástic jako nosičů léčiv. Jsou to lineární, alifatické, syntetické polymery. Zatímco PLA je homopolymer tvořený z monomerů kyseliny mléčné, v případě PLGA se jedná o kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové.[29] Tyto polymery jsou známé pro jejich biokompatibilitu a resorbovatelnost přirozenou cestou. Navíc, u PLGA je možné upravit rychlost degradace, a tudíž i uvolňování léčiva, změnou poměru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v polymeru. Přičemž platí, že kyselina mléčná zvyšuje hydrofobicitu a kyselina glykolová zvyšuje hydrofilitu polymeru.[30]

Přítomnost esterové vazby v polymerním řetězci umožňuje jeho hydrolytickou degradaci ve vodném prostředí, přičemž jako hlavní produkty vznikají právě kyseliny

mléčná a glykolová, které jsou dále metabolizovány a eliminovány z organismu prostřednictvím citrátového cyklu. Vzhledem ke snadnému odbourávání a zdravotní nezávadnosti byly PLA a PLGA schváleny U. S. Food and Drug Administration (FDA) v terapeutických aplikacích pro humánní použití, díky čemuž jsou vyhledávanými polymery pro dodávání léčiv.[29, 31]

3. 3. 1. 2 Poly(ϵ -kaprolakton)

PCL je alifatický hydrofobní polyester syntetizovaný polymerizací ϵ -kaprolaktonu s otevřeným kruhem za přítomnosti katalyzátoru. Byl také schválen FDA pro klinické použití a dále nachází uplatnění především ve tkáňovém inženýrství, jako resorbovatelné šití a pro dodávání léčiv.

Tento polymer je odbouráván hydrolýzou. Vzhledem k vysoké hydrofobicitě je jeho odbourávání pomalé, avšak přispívá k požadovaným vlastnostem pro polymer s prodlouženým uvolňováním. K urychlení odbourávání PCL může pomoci přítomnost esterových lipáz.[29]

3. 3. 1. 3 Poly(alkylkyanoakryláty)

PACA jsou biodegradovatelné a biokompatibilní polymery, které vznikají z kyanoakrylátů polymerizací v přítomnosti vody. FDA povolila používání ethyl, *n*-butyl a oktyl-kyanoakrylátů.

In vivo jsou degradovány hydrolýzou esterů postranního řetězce, čímž vzniká alkylalkohol a poly(kyanoakrylová) kyselina, což jsou ve vodě rozpustné sloučeniny, které jsou z těla eliminovány ledvinami. Nicméně k degradaci PACA může zřídka dojít také mechanismem inverzní Knoevenagelovy kondenzační reakce za vzniku toxických produktů alkylkyanoacetátu a formaldehydu.[29]

3. 3. 2 Polysacharidy

Používanými polysacharidy v přípravě nanočástic jsou chitosan a algináty.

Chitosan je deacetylovaná forma chitinu (chemicky $\alpha(1-4)$ -2-amino-2-deoxy β -D-glukan), která je obsažena například v krunýřích korýšů. Pravděpodobně je rozkládán lysozymem a bakteriálními enzymy v tlustém střevě.

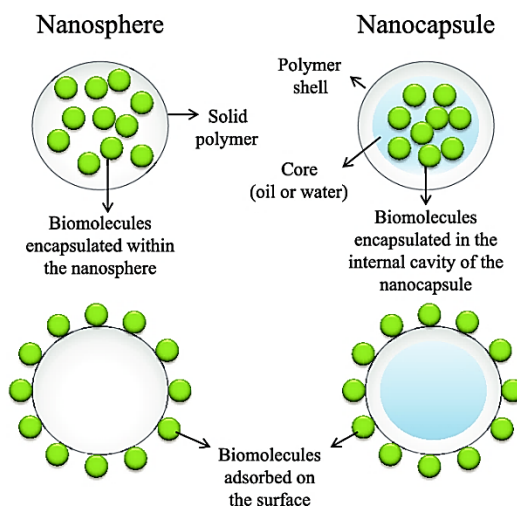
Algináty jsou podobné chitosanu. Jedná se také o bezpečné, netoxické, hydrofilní a biodegradovatelné polysacharidy, které jsou získávány extrakcí z hnědých řas.

Pro formulaci částicových nosičů léčiv mohou být dále využívány například želatina, škrob nebo albumin.[29]

3. 4 Příprava polymerních nanočástic

Pro přípravu polymerních nanočástic bylo vyvinuto a optimalizováno několik metod, které umožňují vytvořit nanočástice různých velikostí a povrchových vlastností, což hraje největší roli v jejich cíleném působení.[29, 32]

Stejně tak existují různé metody inkorporace léčiva do částic. Léčivo může být například zachyceno v polymerní matici, enkapsulováno do jádra nanočástice, obaleno polymerní membránou, chemicky navázáno na polymer nebo naadsorbováno na povrch částice (Obr. 2).[30]



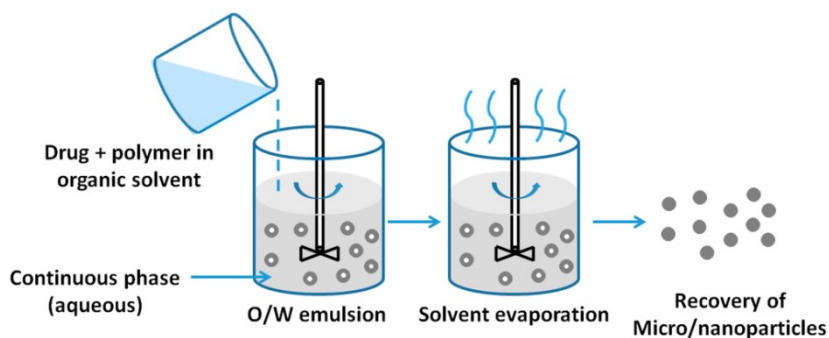
Obr. 2: Možnosti inkorporace léčiva do částic[33]

Metody přípravy nanočástic lze rozdělit do dvou skupin, podle toho, zda formulace vyžaduje polymeraci, nebo zda je jí dosahováno přímo z předem připravených polymerů. V rámci používání biodegradovatelných polymerů se jen PAGA nanočástice připravují polymerizací z příslušných monomerů. Nanočástice tvořené PLA, PLGA, PCL, chitosanem nebo alginátem jsou připravovány přímo z hotových polymerů.[29, 34]

Pro nanočásticové formulace tvořené poměrně hydrofobními polymery PLA, PLGA a PCL bylo vyvinuto několik metod založených na emulzi. Tyto metody byly původně vytvořeny pro inkorporování hydrofobních léčiv, ale postupně byly modifikovány tak, aby byly vhodné i pro hydrofilní léčiva a makromolekuly.

3. 4. 1 Emulzní odpařovací metoda

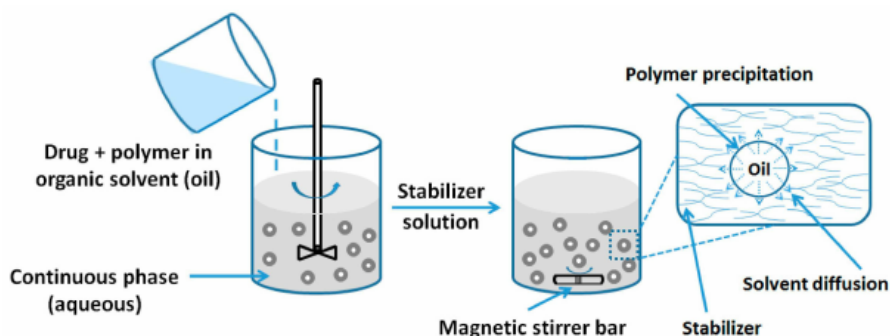
Metoda odpařování rozpouštědla spočívá v rozpuštění polymeru a léčiva v organickém, s vodou nemísitelném rozpouštědle (např. dichlormetanu nebo etylacetátu) a následné emulgaci pomocí externího zdroje energie ve vodné fázi s obsahem povrchově aktivní látky. Poté dochází za stálého míchání k odpařování rozpouštědla, což vede k formování nanočástic v suspenzi (Obr. 3). Vzhledem k tomu, že polymer a léčivo je rozpuštěno v organickém rozpouštědle a dochází ke vzniku emulze typu o/v, může být tato metoda použita k inkorporaci pouze hydrofobních léčiv. Přidáním dalšího emulgačního kroku a vytvořením emulze typu v/o/v je však umožněna inkorporace hydrofilních léčiv a makromolekul. Taková metoda se někdy označuje jako dvojitá emulzní metoda.[29, 34–36]



Obr. 3: Emulzní odpařovací metoda[36]

3. 4. 2 Metoda emulze-difuze

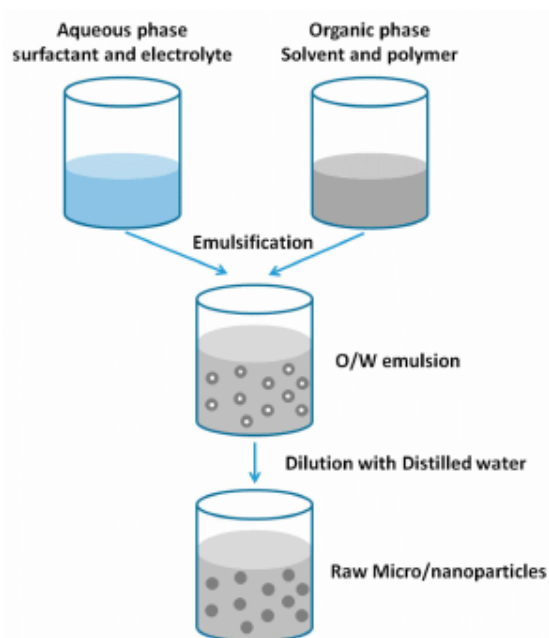
Modifikaci předchozí metody představuje metoda emulze-difuze, při které vzniká opět emulze typu o/v s tím rozdílem, že použité organické rozpouštědlo je částečně mísitelné s vodou. Následné přidání vody pak vede k difúzi rozpouštědla do vnější fáze a k vytvoření nanočástic (Obr. 4). Organické rozpouštědlo pak může být odstraněno za sníženého tlaku.[29, 34, 36]



Obr. 4: Metoda emulze-difuze[36]

3. 4. 3 Vysolování

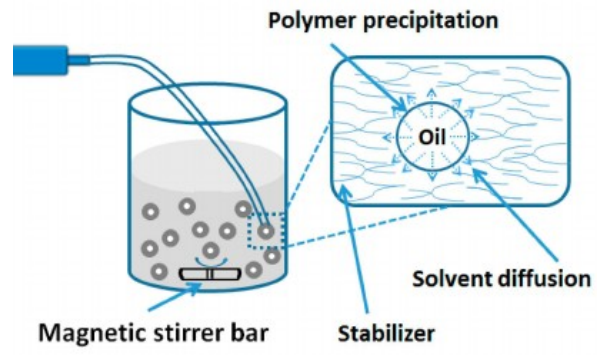
Další metoda, při které se nepoužívají chlorovaná organická rozpouštědla a velká množství surfaktantu, je vysolování. To je založeno na použití solí, například chloridu hořečnatého nebo vápenatého, které jsou schopné vyvézt organické rozpouštědlo z emulzního systému. Léčivo a polymer se nejdříve rozpustí v rozpouštědle, jako je například aceton, a poté se emulguje do vodné fáze s obsahem soli a stabilizátoru. Tato emulze typu o/v se následně zředí dostatečným množstvím vody nebo vodného roztoku, aby se usnadnila difúze acetonu do vodné fáze, čímž se indukuje tvorba nanočástic (Obr. 5). Soli se případně tam, kde je to možné, odstraní dialýzou. [29, 34, 36]



Obr. 5: Vysolování[36]

3. 4. 4 Nanoprecipitace

Další metodou je nanoprecipitace, což je neemulzní metoda, která využívá dvě navzájem mísitelná rozpouštědla, přičemž polymer a léčivo musejí být rozpustné pouze v jednom z nich. Jako rozpouštědla se nejčastěji používají aceton a voda. Po přidání roztoku polymeru v acetonu do vodné fáze dochází k difúzi acetonu do dispergačního média. Polymer se vysráží a zachycuje léčivo. To vede k rychlé tvorbě nanočástic (Obr. 6). Výhodou této metody je, že umožňuje vytvoření nanočástic s úzkou distribucí velikosti. Nejen kvůli tomu je nejpoužívanější metodou přípravy nanočástic z PLGA.[29, 35–37]



Obr. 6: Nanoprecipitační metoda[36]

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Použité přístroje

spektrofotometr Helios γ , Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zetasizer Nano series (Nano-ZS), Malvern Panalytical (Malvern, Spojené království)
analytické váhy Discovery, Ohaus (Greinfensee, Švýcarsko) – max. 210g, d = 0,1mg
váhy Kern 440-53N, Kern&Sohn (Balingen, Německo) – max. 400g, d = 0,01g
lyofilizátor Labconco FreeZone 1, Labconco (Kansas City, USA)
centrifuga Micro 7, Fisher Scientific (Hampton, USA)
třepací vodní lázeň GFL 1083, GFL (Burgwedel, Německo)
pipety Finnpiquette F2, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
magnetická míchačka Variomag telesystem, Thermo Scientific (Waltham, USA)
ultrazvuková čistička Sonorex Super 10 P, Bandelin (Berlín, Německo)
sušárna Memmert, Memmert (Schwabach, Německo)
dialyzační membrána Dialysis tubing Fisher brand, Fisher Scientific (Hampton, USA) – MWCO 3500

4.2 Použité suroviny

kyselina poly(mléčná-ko-glykolová), Katedra farmaceutické technologie FaF UK
PLGA 5/5 – kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou 50:50
PLGA 7/3 – kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou 70:30
PLGA A2 – kopolymer kyseliny DL-mléčné a glykolové větvený na 2% kyselině polyakrylové

Tabulka 2: Číselné (M_n) a hmotnostní (M_w) průměry molární hmotnosti použitých polymerů

polymer	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]
PLGA 5/5	1 700	2 400
PLGA 7/3	2 500	3 300
PLGA A2	8 600	14 400

celulosa-acetát ftalát (CAF), Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

rhodamin B (RhB), Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Pluronic® F127, Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

aceton, Penta (Chrudim, ČR)

trehalosa, Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

acetonitril (ACN), Penta (Chrudim, ČR)

35% kyselina chlorovodíková, Penta (Chrudim, ČR)

dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, Penta (Chrudim, ČR)

fosfátový pufr (phosphate buffer saline; PBS), Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

čištěná voda, příprava na FaF UK

4. 3 Pracovní postup

V rámci experimentální práce bylo připraveno celkem 24 šarží polymerních nanočástic s enkapsulovanou účinnou látkou rhodaminem B. Dvanáct šarží bylo určeno k lyofilizaci a dalších dvanáct bylo podrobena charakterizaci ihned po přípravě nanosuspenze, tzn. bez předchozího mrazového sušení. Z každého použitého typu polymeru (PLGA 5/5, 7/3 a A2) byly vytvořeny nanočástice bez acidorezistentní složky a nanočástice modifikované (acidorezistentní), tvořené příslušným typem PLGA a acidorezistentním polymerem CAF v poměru 1:1, 2:1 nebo 5:1.

4. 3. 1 Příprava nanočástic

K přípravě nanočástic byla použita metoda nanoprecipitace, kde organickou fází představoval roztok polymeru a účinné látky v acetonu, zatímco vodnou fází tvořil roztok surfaktantu ve vodě.

Při přípravě nanočástic bylo nejdříve na analytických vahách naváženo do vialky 30 mg PLGA a 0,25 mg RhB. Obě látky byly poté rozpuštěny v 1 ml acetonu. Takto připravená organická fáze byla následně pomocí pipety přidána k 10 ml 0,1% roztoku Pluronicu® F127 umístěného na magnetické míchačce v digestoři. Směs byla míchána do úplného odpaření acetonu. Průměrná doba potřebná k odpaření acetonu byla asi 2 hodiny.

Příprava šarží modifikovaných nanočástic probíhala podle stejného postupu s jediným rozdílem, kdy část celkového množství PLGA byla nahrazena acidorezistentním polymerem CAF. Složení jednotlivých šarží nanočástic (NPs) je pro přehlednost uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 3: Složení šarží nanočástic

šarže	navážky		
	PLGA [mg]	CAF [mg]	RhB [mg]
NPs bez CAF	30	-	0,25
modifikované NPs v poměru 1:1	15	15	0,25
modifikované NPs v poměru 2:1	20	10	0,25
modifikované NPs v poměru 5:1	25	5	0,25

Po odpaření acetonu byl z každé šarže odebrán vzorek o objemu 100 μ l určený k měření velikosti částic a zeta potenciálu (viz. kapitola 4. 3. 3).

Vzniklé nanočástice byly následně ze surové nanosuspenze separovány a purifikovány pomocí centrifugace. Surová nanosuspenze byla pomocí pipety rozdělena do pěti mikrozkušavek typu Eppendorf o objemu 2 ml. Purifikace probíhala ve třech 15minutových intervalech při rychlosti 10 000 RPM (otáček za minutu), odpovídající přetížení 7 200 g.

Po prvním cyklu odstředování byl z každé mikrozkušavky pipetou odebrán supernatant a sediment byl rozdispergován přidáním 1 ml čištěné vody. Poté byl vzorek podroben druhému cyklu centrifugace. Supernatant byl opět odpipetován a nahrazen 1 ml čištěné vody tak, aby došlo k rozdispergování sedimentu. V případě přítomnosti nerozdispergovatelné usazeniny byla příslušná mikrozkušavka nahrazena novou. Následoval třetí cyklus centrifugace, po kterém byl opět odebrán supernatant. Na rozdispergování sedimentu v každé mikrozkušavce byl poté použit v případě přípravy nanočástic nelyofilizovaných 1 ml čištěné vody, zatímco při přípravě nanočástic určených k lyofilizaci 1 ml 5% roztoku trehalosy, která slouží jako kryoprotektant a lyoprotektant. Vzniklá nanosuspenze byla přelita do jedné vialky a následně rozdělena na tři alikvotní části připravené k dalšímu použití, přičemž jedna alikvóta byla využita k charakterizaci nanočástic a další dvě k disolučním testům.

4. 3. 2 Lyofilizace nanočástic

Jak již bylo dříve zmíněno, k lyofilizaci bylo určeno celkem 12 šarží nanočástic. Mikrozkušavky s alikvótami purifikovaných nanočástic byly nejdříve umístěny do mrazáku a zmrazeny na teplotu -70°C . Poté byla hrdla mikrozkušavek uzavřena kousky buničiny, aby se zamezilo vypěňování vzorku a případným ztrátám nanočástic během další fáze lyofilizace. Takto připravené mikrozkušavky byly vráceny přibližně na 2 hodiny do mrazáku a poté byly pomocí termoboxu přemístěny

do lyofilizátoru, ve kterém probíhala další fáze mrazového sušení. Ta trvala 72 hodin za tlaku 0,5 mbar.

4. 3. 2. 1 Princip lyofilizace

Lyofilizace je proces, při kterém se voda nebo jiné rozpouštědlo odstraní ze zmrazeného materiálu přeměnou zmrazené vody přímo na páru, aniž by v průběhu došlo k tvorbě kapalně vody. Nedochozí tak k poškození sušeného materiálu jako při zahrnutí kapalně fáze nebo vlivem vysoké teploty při běžném sušení. Mrazové sušení je proto důležitým procesem pro přípravu vzorků a pro uchovávání a skladování biologických látek, léčiv a potravin.[38]

Průběh mrazového sušení nebo též vymrazování lze rozdělit na tři fáze. První fází je zmrazení, kdy se vlhký materiál zmrazí pod tzv. eutektický bod neboli teplotu, při které je schopen existovat jen v pevném stavu. Tím se zajistí, že nebude docházet k tání materiálu. Je však potřeba postupovat obezřetně, aby se zamezilo jeho mikroskopickému poškození. Poté následuje fáze primárního sušení, kdy je v mrazící komoře snížen tlak na několik stovek Pa a následně je dodáno tolik tepla, kolik je potřeba k sublimaci vody. Sušení trvá několik dní až hodin v závislosti na sušeném materiálu a z materiálu je během této fáze odstraněno asi 95% vody. Vznikající vodní pára je obvykle přiváděna na kondenzátor, kde se opět mění v led, který se po skončení sušení odstraní. Pokud je třeba materiál ještě více vysušit, přechází se do třetí fáze, tzv. desorpce, kdy se zvýší teplota (někdy až nad 0°C). Naruší se přitom vazby mezi vodou a pevným materiálem a odstraní se nezmrzlá voda na povrchu pevné látky. Po této fázi zůstává v sušeném materiálu asi 1 až 4% vody.[38–40]

4. 3. 3 Měření velikosti částic a zeta potenciálu

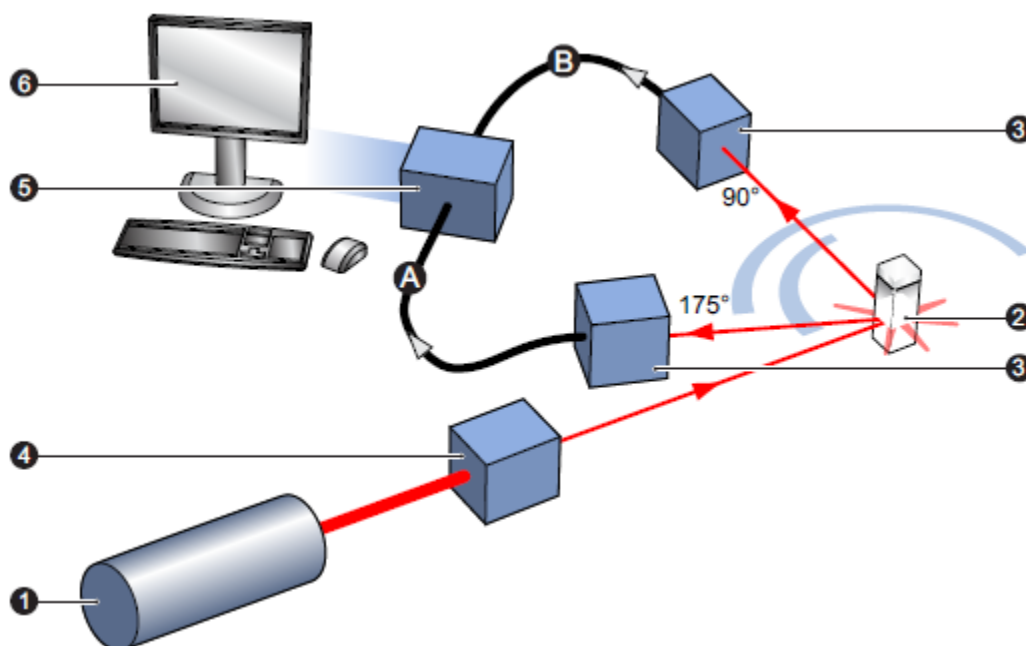
K měření velikosti částic a zeta potenciálu byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS. K odebranému vzorku surové nanosuspenze (100 µl) byl přidán 1 ml čištěné vody. Takto připravený vzorek byl přelit do plastové měrné kyvety a vložen do přístroje. Měření velikosti částic a jejich polydisperzity bylo třikrát opakováno.

Následně byl vzorek pomocí injekční stříkačky přemístěn do speciální kyvety se zahnutou kapilárou a elektrodami, sloužící k měření zeta potenciálu, a vložen do přístroje. Měření zeta potenciálu probíhalo taktéž třikrát.

4. 3. 3. 1 Princip měření velikosti částic

Měření velikosti částic na zetasizeru je založeno na dynamickém rozptylu světla (dynamic light scattering; DLS).

Částice dispergované v kapalině se pohybují tzv. Brownovým pohybem, který je způsoben náhodnými kolizemi částic s molekulami kapaliny, které je obklopují. Rychlost tohoto pohybu je závislá na velikosti koloidních částic, přičemž platí, že čím jsou částice menší, tím se pohybují rychleji a naopak.



Obr. 7: Schématické znázornění přístroje Zetasizer Nano ZS[41]

① laser, ② kyveta, ③ detektor, ④ zeslabovač, ⑤ korelátor, ⑥ počítač

Při osvětlení částic laserovým paprskem dochází kvůli jejich neustálému pohybu ke kolísání intenzity rozptýleného světla. Zetasizer právě toto kolísání intenzity rozptylu detekuje a využívá k výpočtu velikosti částic.

Aby detektor zachytil intenzitu rozptýleného světla, musí být v určitém rozmezí. K ovlivnění množství laserového světla přicházejícího do vzorku slouží tzv. attenuátor neboli zeslabovač. Ten v případě velmi malých částic nebo vzorků o nízkých koncentracích, tedy v případě, kdy se nerozšíří dostatek světla, množství laserového světla zvyšuje. Naopak u velkých částic nebo koncentrovaných vzorků, které rozptýlí příliš mnoho světla, je množství rozptýleného světla pomocí zeslabovače sníženo.[41]

Detekovaný signál je pak předán digitálnímu korelátoru, který porovnává signály v čase a odvozuje rychlost změny intenzity rozptýleného světla. Menší částice se pohybují rychleji, tudíž i rychleji nastává změna intenzity rozptýleného světla než u částic velkých. Data z korelátoru jsou následně softwarem analyzována. Výsledkem jsou informace o velikosti a distribuci velikosti částic ve vzorku.[41]

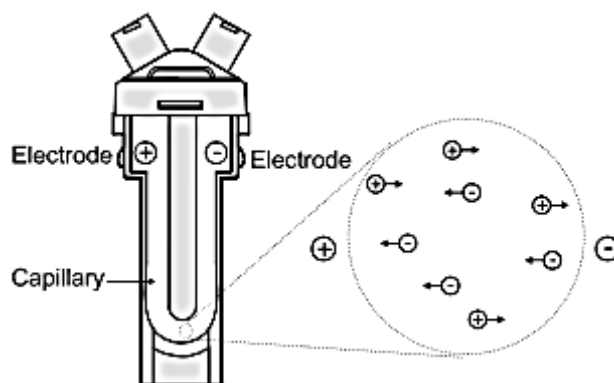
Proměřením na přístroji Zetasizer Nano ZS byla kromě velikosti zjištěna také polydisperzita nanočástic, přičemž tzv. index polydisperzity (PDI) udává míru nejednotnosti velikosti částic v suspenzi. Obecně platí, že čím je hodnota indexu polydisperzity menší, tím lepší. Za hraniční hodnotu se považuje PDI rovno 0,200.

4. 3. 3. 2 Princip měření zeta potenciálu

Zeta potenciál (ζ -potenciál) označuje elektrokinetický potenciál v koloidním systému, který vzniká na rozhraní mezi povrchem částice a okolní kapalinou. Pro farmaceutickou technologii představuje důležitý parametr, protože je rozhodující pro stabilitu koloidních soustav. Jeho hodnota určuje velikost odpudivých sil mezi stejně nabitými částicemi disperzních systémů.[42]

Pokud částice v suspenzi mají velký pozitivní nebo negativní ζ -potenciál, pak mají tendenci se navzájem odpuzovat. Naopak, pokud mají malý ζ -potenciál, převáží přitažlivé síly nad odpudivými a částice mají tendenci se shlukovat neboli flokulovat. Za stabilní se obecně považují částice se ζ -potenciálem větším než +30 mV a menším než -30 mV.[41]

Zeta potenciál je zjišťován měřením rychlosti, kterou se částice pohybují při elektroforéze (Obr. 8). V aplikovaném elektrickém poli se částice budou pohybovat k elektrodě s opačným nábojem.



Obr. 8: Schématické znázornění kyvety pro měření ζ -potenciálu a elektroforézy[41]

Rychlost pohybu částic, označovaná též jako elektroforetická pohyblivost, je mimo jiné závislá na síle elektrického pole a zeta potenciálu. Pokud známe sílu elektrického pole, je možné prostřednictvím laserové Dopplerovy velocimetrie změřit rychlost pohybu částic a následným výpočtem dle Henryovy rovnice zjistit zeta potenciál.[41, 43] Měření je také závislé na pH prostředí. V našem případě se jednalo o disperzi částic ve vodném prostředí, proto uvažujeme pH 7.

4. 3. 4 Enkapsulační efektivita, výtěžnost a drug-loading

Pro zhodnocení nanočástic z hlediska jejich přípravy byly zjišťovány následující parametry:

- enkapsulační efektivita (entrapment efficiency; EE), která udává, kolik procent z použitého celkového množství účinné látky bylo enkapsulováno do nanočástic

$$(1) \quad EE = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného RhB}}{\text{původní navážka RhB}} \cdot 100\%$$

- výtěžnost (recovery yield; RY), jež udává procentuální množství polymeru, které jsme obdrželi ve formě nanočástic po purifikačních procesech

$$(2) \quad RY = \frac{\text{hmotnost polymeru v nanočásticích}}{\text{původní navážka polymeru}} \cdot 100\%$$

- drug-loading (DL), který udává, kolik procent zaujímá enkapsulovaná účinná látka v nanočásticích

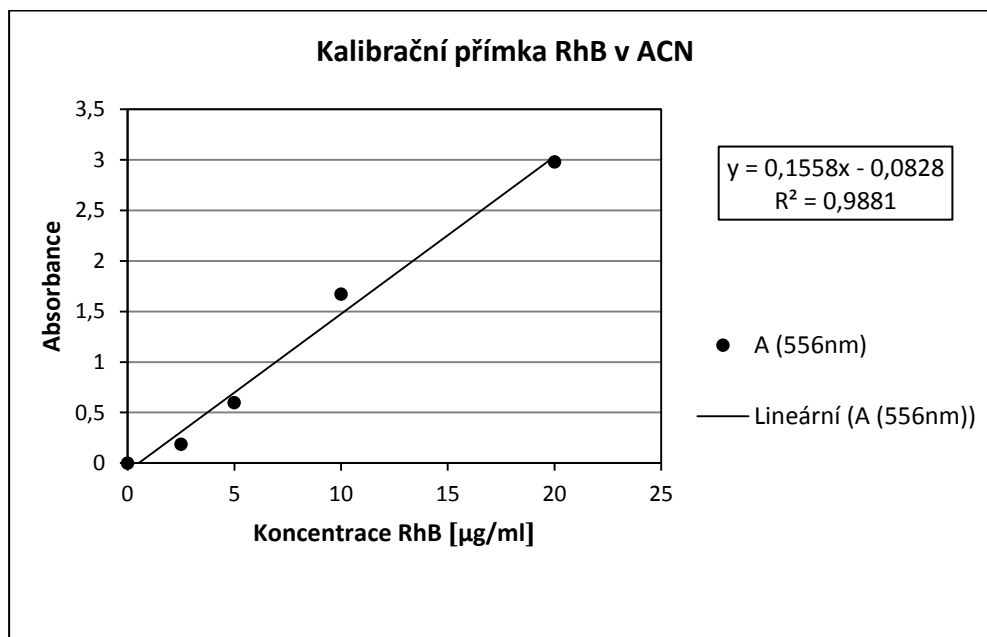
$$(3) \quad DL = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného RhB}}{\text{hmotnost nanočástic}} \cdot 100\%$$

Hodnocení bylo provedeno pouze u těch šarží nanočástic, které nebyly lyofilizovány.

Pro výpočet těchto charakteristik bylo potřeba nejdříve zjistit enkapsulované množství RhB. Alikvotní část nanosuspenze byla odstředěna pomocí centrifugy jedním desetiminutovým cyklem při rychlosti otáčení 10 000 RPM a přetížení 7 200 g. Supernatant byl odebrán a sediment byl rozpuštěn ve 4 ml acetonitrilu. Následně byl roztok spektrofotometricky proměřen v kyvetě z křemenného skla proti ACN jako slepému vzorku. Měření probíhalo při vlnové délce 556nm, což odpovídá absorpčnímu maximu roztoku RhB v ACN. Dosazením naměřené absorbance do rovnice kalibrační přímky (4) byla vypočtena koncentrace RhB v $\mu\text{g/ml}$ a přepočtem bylo zjištěno celkové enkapsulované množství RhB v nanočásticích dané šarže.

$$(4) \quad y = 0,1558x - 0,0828,$$

kde x je koncentrace RhB v $\mu\text{g/ml}$ a y je absorbance



Graf 1: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v acetonitrilu při 556nm

Po spektrofotometrickém měření byl roztok RhB v ACN kvantitativně převeden do předem zvážené vialky. Vialka s roztokem byla vložena do sušárny vyhřáté na teplotu 60°C , aby došlo k úplnému vypaření ACN. Následným zvážením byla zjištěna celková hmotnost připravených nanočástic a po odečtení enkapsulovaného množství RhB byla získána hmotnost polymerů tvořících nanočástice. Tyto hodnoty pak byly dosazeny do vztahů pro výpočty enkapsulační efektivity (1), výtěžnosti (2) a drug-loadingu (3).

4. 3. 5 Disoluce

Pro posouzení odolnosti připravených nanočástic vůči kyselému prostředí a uvolňování účinné látky z připravených nanočástic v prostředí o kyselém a fyziologickém pH v čase byly nanočástice podrobeny disolučním testům.

Testy byly provedeny v duplikátech, proto byl každý vzorek tvořen polovinou alikvotní části připravené nanosuspenze. V případě lyofilizovaných nanočástic byl vzorek připraven resuspendováním nanočástic v 1 ml čištěné vody a následným rozdělením na polovinu. Vzorek byl pak pomocí pipety vpraven do předem připravené, z jedné strany zalepené dialyzační membrány. Ta pak byla pomocí akrylátového lepidla zalepena i z druhé strany. Takto připravené membrány byly

ponořeny do příslušných disolučních médií ve vialkách umístěných v třepací vodní lázni vyhřáté na teplotu 37°C.

Při disolučních testech byla použita následující disoluční média[26, 44, 45]

- a) 15 ml 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové pH 1, ke kterým bylo v průběhu disoluce (po 2 hodinách) přidáno 5 ml 0,2M roztoku dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (zahřátého na teplotu 37°C)
- b) 15 ml 0,01M fosfátového pufru o pH 7,4

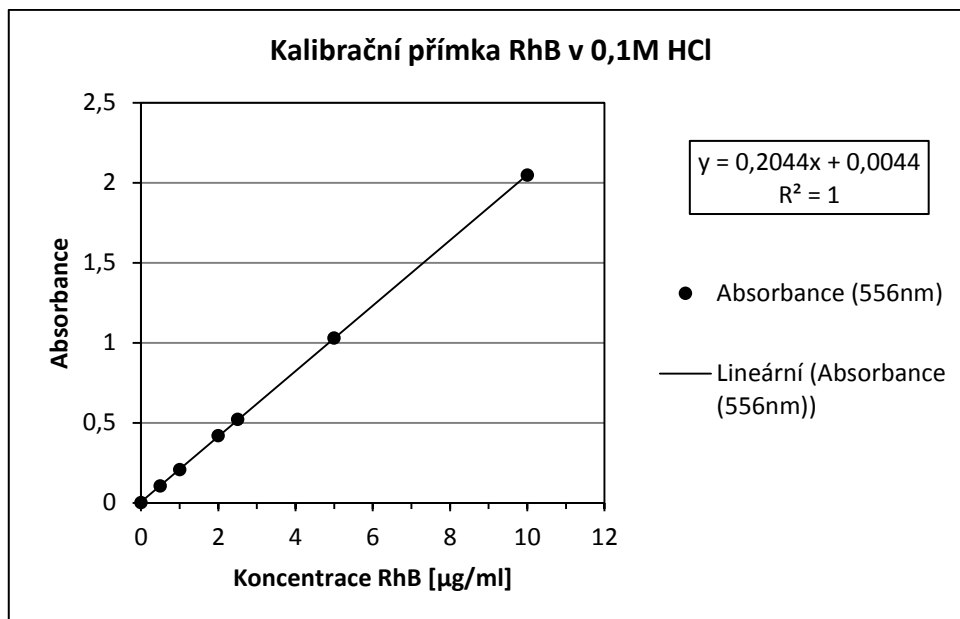
V průběhu disoluce byly pipetou odebírány vzorky o objemu 2 ml v předem stanovených časech – ½ hodiny, 1 hodina (u některých vzorků nebyl z časových důvodů odběr uskutečněn), 2 hodiny, 3 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin, 15 hodin, 19 hodin a 24 hodin. Vzorky byly hodnoceny spektrofotometricky a ihned po proměření byly vráceny zpět do testovacího média, aby byl zachován objem disolučního média ve vialkách.

Spektrofotometrické hodnocení vzorků probíhalo vždy při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu roztoku RhB v daném médiu a proti slepému vzorku tvořenému příslušným médiem. V následující tabulce jsou pro přehlednost uvedeny vlnové délky, při kterých měření probíhalo, a také rovnice kalibračních přímk pro použitá disoluční média. Proměnná x v těchto rovnicích vždy znamená koncentraci RhB v $\mu\text{g/ml}$ a y představuje naměřenou hodnotu absorbance.

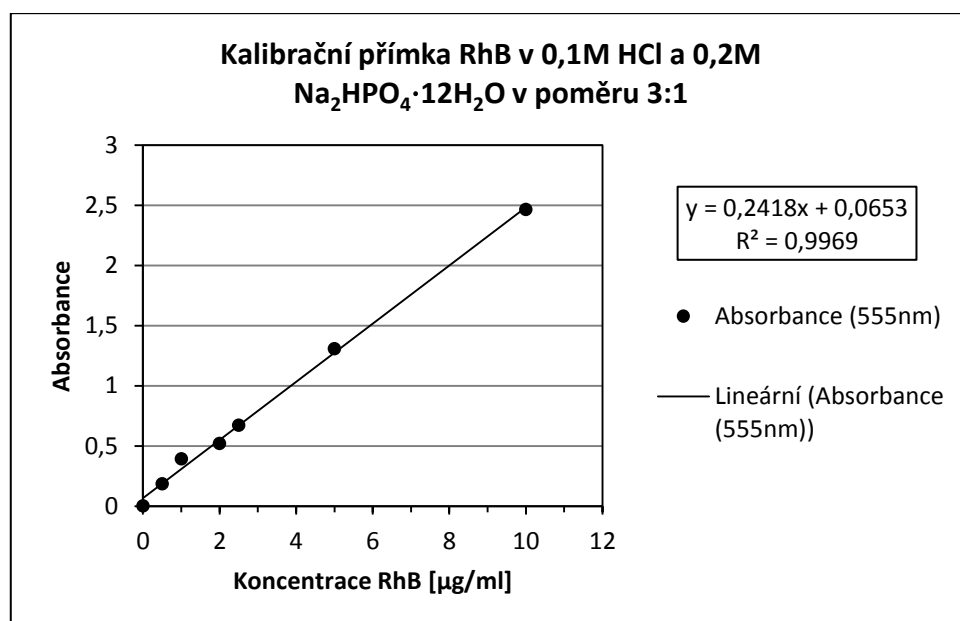
Tabulka 4: Přehled vlnových délek, při kterých probíhalo spektrofotometrické měření, a rovnic kalibračních přímk pro použitá disoluční média

disoluční médium	vlnová délka	rovnice kalibrační přímk
0,1M HCl	556 nm	(5) $y = 0,2044x + 0,0044$
0,1M HCl a 0,2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v poměru 3:1	555 nm	(6) $y = 0,2418x + 0,0653$
0,01M PBS pH 7,4	554 nm	(7) $y = 0,265x + 0,1065$

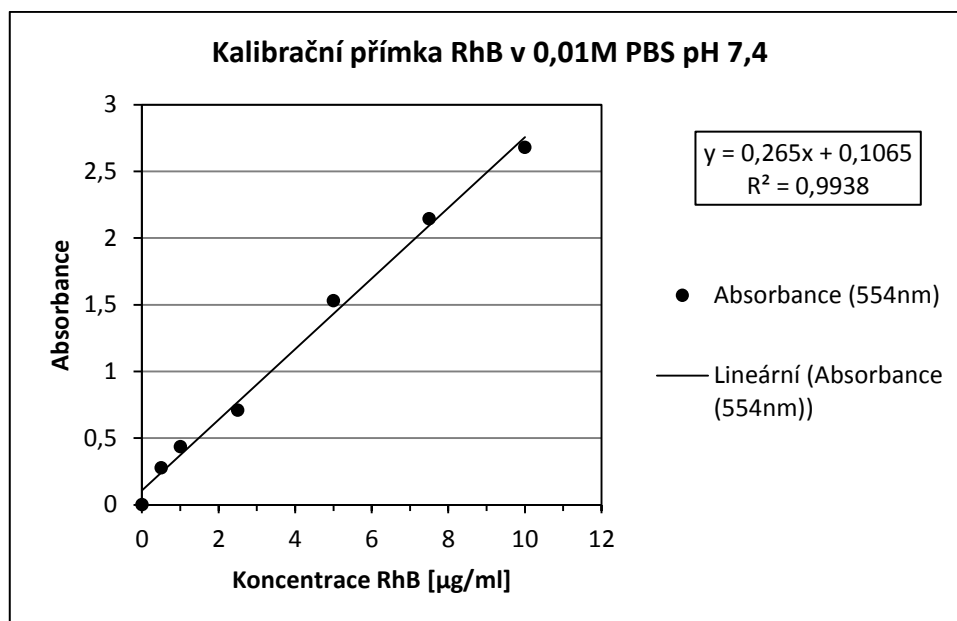
Grafy 2 až 4 zobrazují kalibrační přímk roztoků RhB v použitých disolučních médiích.



Graf 2: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové při 556 nm



Graf 3: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v 0,1M HCl a 0,2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v poměru 3:1 při 555 nm



Graf 4: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v 0,01M fosfátovém pufru o pH 7,4 při 554 nm

Dosažením naměřené absorbance do příslušné rovnice lineární regrese pak byla zjištěna koncentrace RhB. Ta byla následně přepočítána na uvolněné procentuální množství RhB v příslušném čase. Grafickým zpracováním zjištěných dat pak byly získány disoluční profily nanočástic jednotlivých šarží.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci praktické části byly připraveny polymerní nanočástice s enkapsulovaným RhB. Nanočástice se skládaly z lineárních polymerů PLGA 5/5 a 7/3 nebo z větveného polymeru A2 v různém poměru s acidorezistentním polymerem CAF. Hlavním důvodem výběru a výhodou polymerních nanočástic je jejich snadná biologická odbouratelnost. Rhodamin B byl v experimentu použit jako účinná látka z důvodu jasně růžového zbarvení roztoků, které poskytuje, a tedy možnosti spektrofotometrického hodnocení nanočástic. Zároveň je také agonistou nukleárního receptoru s potenciální protizánětlivou aktivitou.

5.1 Měření velikosti částic a zeta potenciálu

Připravená nanosuspenze byla nejdříve hodnocena z hlediska velikosti částic. Naměřené hodnoty, průměrné hodnoty velikosti částic a PDI, včetně směrodatných odchylek (SD), jsou uvedeny v Tabulka 5.

Všechny připravené nanočástice mají velikost blízkou 200 nm, což je dobrým předpokladem pro jejich retenci ve střevě, akumulaci v zánětlivé tkáni a vychytávání makrofágy. Nanočástice zároveň vyhovují požadavku na index polydisperzity, s jediným mírným překročením hraniční hodnoty u nanočástic připravených z PLGA 5/5 s CAF v poměru 1:1. Z naměřených hodnot dále vyplývá, že přídavek acidorezistentní složky nemá signifikantní vliv na velikost částic.

Tabulka 5: Velikosti připravených nanočástic a jejich polydisperzita

vzorek		velikost částic [nm]	Ø velikost částic [nm]	SD	PDI	Ø PDI	SD
PLGA 5/5	PLGA	220,3	219,8	± 0,411	0,133	0,119	± 0,019
		219,7			0,131		
		219,3			0,092		
	1:1	215,5	212,5	± 2,281	0,240	0,226	± 0,011
		211,9			0,214		
		210,0			0,224		
	2:1	194,1	194,2	± 0,660	0,143	0,139	± 0,003
		195,1			0,139		
		193,5			0,136		
	5:1	202,4	202,6	± 0,356	0,105	0,128	± 0,019
		202,3			0,152		
		203,1			0,128		
PLGA 7/3	PLGA	187,6	185,9	± 1,247	0,090	0,087	± 0,003
		184,6			0,083		
		185,6			0,089		
	1:1	187,0	188,7	± 1,268	0,158	0,173	± 0,013
		190,0			0,172		
		189,2			0,189		
	2:1	171,7	173,3	± 1,239	0,104	0,112	± 0,015
		173,6			0,133		
		174,7			0,100		
	5:1	185,5	185,6	± 0,094	0,106	0,096	± 0,008
		185,7			0,086		
		185,7			0,095		
PLGA A2	PLGA	194,1	192,0	± 1,577	0,112	0,091	± 0,016
		191,6			0,088		
		190,3			0,073		
	1:1	193,4	193,0	± 0,787	0,131	0,143	± 0,009
		193,7			0,151		
		191,9			0,148		
	2:1	185,4	184,1	± 0,899	0,090	0,113	± 0,018
		183,6			0,134		
		183,4			0,114		
	5:1	185,6	187,5	± 1,846	0,095	0,130	± 0,032
		190,0			0,172		
		186,9			0,123		

Dalším sledovaným parametrem u připravovaných nanočástic byl ζ -potenciál, jehož měření probíhalo taktéž na přístroji Zetasizer Nano ZS. Jak již bylo dříve zmíněno, tento parametr je důležitý pro charakterizaci koloidních disperzí z hlediska jejich stability, přičemž za stabilní jsou považovány soustavy, které mají hodnoty ζ -

potenciálu ± 30 mV. V opačném případě je soustava nestabilní a může mít tendenci k flokulaci. Naměřené hodnoty ζ -potenciálu připravených nanočástic, jejich průměry a směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tabulka 6.

Tabulka 6: Zeta potenciál připravených nanočástic

vzorek		ZP [mV]	$\bar{\zeta}$ ZP [mV]	SD
PLGA 5/5	PLGA	-26,3	-27,3	$\pm 0,818$
		-28,3		
		-27,2		
	1:1	-24,4	-24,4	$\pm 0,205$
		-24,6		
		-24,1		
	2:1	-20,1	-18,8	$\pm 1,257$
		-19,2		
		-17,1		
	5:1	-34,1	-34,8	$\pm 0,920$
		-36,1		
		-34,2		
PLGA 7/3	PLGA	-29,4	-29,5	$\pm 0,216$
		-29,3		
		-29,8		
	1:1	-28,8	-29,1	$\pm 1,320$
		-27,6		
		-30,8		
	2:1	-24,2	-24,5	$\pm 0,356$
		-25,0		
		-24,3		
	5:1	-27,8	-30,4	$\pm 4,450$
		-26,8		
		-36,7		
PLGA A2	PLGA	-20,4	-18,5	$\pm 1,427$
		-18,0		
		-17,0		
	1:1	-23,6	-24,7	$\pm 0,899$
		-25,8		
		-24,6		
	2:1	-21,8	-22,0	$\pm 0,170$
		-22,2		
		-21,9		
	5:1	-21,9	-21,0	$\pm 0,660$
		-20,5		
		-20,5		

Podle naměřených hodnot ζ -potenciálu lze považovat nanočástice připravené z polymerů PLGA 5/5, PLGA 7/3 i A2 za stabilní. Naměřené hodnoty ζ -potenciálu se pohybují v přibližném rozmezí od -21 mV do -35 mV. Výjimky tvoří nanočástice složené z PLGA 5/5 s CAF v poměru 2:1, s hodnotou ζ -potenciálu -18,8 mV, a nanočástice tvořené pouze polymerem A2 s hodnotou ζ -potenciálu -18,5 mV.

Z výsledků lze také vyvodit závěr, že přídavek CAF ve složení nanočástic nemá výrazný vliv na hodnotu ζ -potenciálu nanočástic.

5. 2 Hodnocení procesu enkapsulace a přípravy nanočástic

Pro charakterizaci procesu přípravy nanočástic a enkapsulace účinné látky byla zjišťována EE, DL a RY. Význam těchto parametrů, včetně výpočtů, byl popsán v kapitole 4. 3. 4. Výsledky jsou pak zaznamenány v Tabulka 7.

Tabulka 7: Enkapsulační efektivita, drug loading a výtěžnost

vzorek		% EE	% DL	% RY
PLGA 5/5	PLGA	31,28	0,63	49,17
	1:1	65,93	1,41	43,01
	2:1	52,25	1,10	41,88
	5:1	52,94	1,05	44,37
PLGA 7/3	PLGA	55,76	0,81	63,92
	1:1	78,86	1,19	61,07
	2:1	70,10	1,18	48,64
	5:1	56,27	1,01	45,42
PLGA A2	PLGA	86,31	1,18	62,66
	1:1	73,04	1,44	44,43
	2:1	77,59	1,25	51,15
	5:1	65,96	1,15	52,86

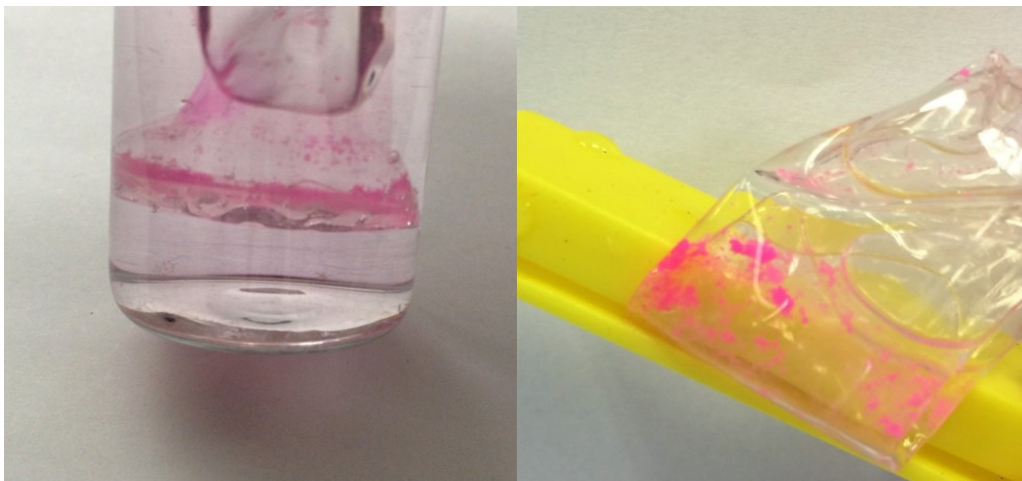
Z vypočtených hodnot vyplývá, že hydrofobní polymer PLGA 7/3 a větvený polymer PLGA A2 vykazují vyšší enkapsulační efektivitu a zároveň mají i lepší výtěžnost. V případě lineárních polymerů, tzn. PLGA 5/5 a 7/3, dochází s přídavkem CAF ke zvýšení hodnot všech sledovaných parametrů. Tento fenomén byl popsán u lipidických částic, kdy částice tvořené dvěma a více rozdílnými komponentami mají nižší míru uspořádanosti matrice. Tyto nepravidelnosti matrice vytvářejí prostor pro lepší enkapsulaci léčiva.

5. 3 Disoluce nanočástic

Na základě provedených disolučních testů lze predikovat chování nanočástic po perorálním podání. Bylo sledováno uvolňování účinné látky RhB v 0,1M kyselině chlorovodíkové při teplotě 37°C, což simuluje kyselé prostředí žaludku, a zároveň také ve fyziologickém pH.

Disolučním testům byly podrobeny jak lyofilizované nanočástice, které byly před hodnocením resuspendovány, tak nanočástice připravené v čas potřeby.

V případě lyofilizovaných nanočástic vykazovaly vzorky přibližně po ½ hodině od začátku disolučních testů makroskopické změny (Obr. 9). K tomuto jevu došlo až při disoluci v kyselém i fyziologickém pH u všech nanočástic po předchozí lyofilizaci, ačkoliv byly před disolucí řádně resuspendovány v čištěné vodě. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že došlo k inkompatibilitě mezi disolučními médii a trehalosou, která byla v experimentu použita jako lyoprotektant. Případně mohlo dojít k poškození částic již během procesu lyofilizace (např. mikrotáním). Disoluční testy probíhaly i přes vzniklé sraženiny nanočástic po dobu 24 hodin. Vzhledem ke vzniklým shlukům však nemohlo dojít k rovnoměrnému uvolňování RhB ze vzorků, a proto vzniklé disoluční profily nanočástic nemají vypovídací hodnotu a ve výsledcích nejsou uvedeny.



Obr. 9: Makroskopické změny vzorků lyofilizovaných nanočástic vzniklé při disoluci (archiv autora)

Nanočástice podrobené disolučním testům ihned po jejich přípravě nevykazovaly žádné nežádoucí makroskopické změny. V tabulkách 8 až 10 jsou uvedeny naměřené hodnoty při disoluci ve fyziologickém prostředí, v tabulkách 11 až 13 pak v prostředí kyselém. V každé tabulce jsou zaznamenány naměřené hodnoty

absorbancí pro jednotlivé vzorky v přesně stanovených časech (disoluce byla provedena v duplikátech, proto jsou v tabulkách uvedeny vždy vzorky č. 1 a 2), průměrné hodnoty absorbance a směrodatné odchylky. Dále jsou zde uvedeny koncentrace RhB (c_{RhB}), zjištěné výpočty z rovnic kalibračních přímek, a také odpovídající množství uvolněného RhB v médiu, vyjádřené jak hmotnostně (m_{RhB}), tak procentuálně vztažené k celkovému množství enkapsulovaného RhB v nanočásticích. Na grafech 5 až 10 jsou pak zobrazeny disoluční profily připravených nanočástic v kyselém, nebo fyziologickém prostředí. Pro lepší přehlednost nejsou v grafech zobrazeny chybové úsečky, nicméně platí, že hodnoty směrodatných odchylek se pohybovaly v úzkém rozmezí.

Tabulka 8: Disoluce nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v pH 7,4

PLGA 5/5		absorbance (A)								
		čas [h]								
		0	0,5	2	3	4	6	15	19	24
P L G A	vzorek č. 1	0	0,078	0,135	0,156	0,178	0,196	0,215	0,218	0,218
	vzorek č. 2	0	0,084	0,157	0,181	0,191	0,203	0,214	0,218	0,219
	∅ A	0	0,081	0,146	0,169	0,185	0,200	0,215	0,218	0,219
	SD	0	0,003	0,011	0,013	0,007	0,004	0,001	0,000	0,001
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,289	0,521	0,602	0,659	0,713	0,766	0,779	0,780
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	4,339	7,821	9,027	9,884	10,688	11,491	11,679	11,705
	% množství RhB	0	27,74	50,01	57,72	63,20	68,33	73,47	74,67	74,84
1 : 1	vzorek č. 1	0	0,095	0,248	0,290	0,321	0,338	0,369	0,385	0,396
	vzorek č. 2	0	0,130	0,257	0,291	0,334	0,319	0,335	0,342	0,367
	∅ A	0	0,113	0,253	0,291	0,328	0,329	0,352	0,364	0,382
	SD	0	0,018	0,005	0,001	0,007	0,010	0,017	0,022	0,015
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,402	0,902	1,038	1,170	1,173	1,257	1,298	1,363
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	6,027	13,527	15,563	17,545	17,598	18,857	19,473	20,438
	% množství RhB	0	19,59	43,96	50,58	57,02	57,20	61,29	63,29	66,42
2 : 1	vzorek č. 1	0	0,140	0,173	0,218	0,234	0,236	0,240	0,241	0,249
	vzorek č. 2	0	0,088	0,163	0,179	0,188	0,198	0,204	0,207	0,212
	∅ A	0	0,114	0,168	0,199	0,211	0,217	0,222	0,224	0,231
	SD	0	0,026	0,005	0,020	0,023	0,019	0,018	0,017	0,019
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,407	0,600	0,709	0,754	0,775	0,793	0,800	0,823
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	6,107	9,000	10,634	11,304	11,625	11,893	12,000	12,348
	% množství RhB	0	25,98	38,28	45,23	48,08	49,45	50,59	51,04	52,52
5 : 1	vzorek č. 1	0	0,069	0,176	0,202	0,213	0,230	0,230	0,232	0,237
	vzorek č. 2	0	0,092	0,185	0,207	0,221	0,224	0,236	0,239	0,239
	∅ A	0	0,081	0,181	0,205	0,217	0,227	0,233	0,236	0,238
	SD	0	0,012	0,005	0,002	0,004	0,003	0,003	0,003	0,001
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,288	0,645	0,730	0,775	0,811	0,832	0,841	0,850
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	4,313	9,670	10,955	11,625	12,161	12,482	12,616	12,750
	% množství RhB	0	18,10	40,59	45,99	48,80	51,05	52,40	52,96	53,52

Tabulka 9: Disoluce nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v pH 7,4

PLGA 7/3		absorbance (A)									
		čas [h]									
		0	0,5	1	2	3	4	6	15	19	24
P L G A	vzorek č. 1	0	0,077	0,130	0,192	0,239	0,288	0,311	0,343	0,355	0,358
	vzorek č. 2	0	0,199	0,233	0,293	0,321	0,330	0,340	0,345	0,343	0,347
	∅ A	0	0,138	0,182	0,243	0,280	0,309	0,326	0,344	0,349	0,353
	SD	0	0,061	0,052	0,051	0,041	0,021	0,015	0,001	0,006	0,006
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,493	0,648	0,866	1,000	1,104	1,163	1,229	1,246	1,259
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	7,393	9,723	12,991	15,000	16,554	17,438	18,429	18,696	18,884
	% množství RhB	0	28,41	37,37	49,92	57,65	63,62	67,01	70,82	71,85	72,57
1 : 1	vzorek č. 1	0	0,141	0,173	0,256	0,301	0,331	0,356	0,362	0,381	0,389
	vzorek č. 2	0	0,101	0,162	0,250	0,301	0,327	0,349	0,363	0,367	0,369
	∅ A	0	0,121	0,168	0,253	0,301	0,329	0,353	0,363	0,374	0,379
	SD	0	0,020	0,005	0,003	0,000	0,002	0,004	0,001	0,007	0,010
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,432	0,598	0,904	1,075	1,175	1,259	1,295	1,336	1,354
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	6,482	8,973	13,554	16,125	17,625	18,884	19,420	20,036	20,304
	% množství RhB	0	17,61	24,38	36,83	43,82	47,89	51,31	52,77	54,44	55,17
2 : 1	vzorek č. 1	0	0,093	0,124	0,178	0,203	0,223	0,239	0,249	0,257	0,266
	vzorek č. 2	0	0,065	0,113	0,181	0,216	0,231	0,235	0,241	0,242	0,245
	∅ A	0	0,079	0,119	0,180	0,210	0,227	0,237	0,245	0,250	0,256
	SD	0	0,014	0,006	0,002	0,006	0,004	0,002	0,004	0,008	0,011
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,282	0,423	0,641	0,748	0,811	0,846	0,875	0,891	0,913
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	4,232	6,348	9,616	11,223	12,161	12,696	13,125	13,366	13,688
	% množství RhB	0	14,49	21,74	32,92	38,43	41,64	43,47	44,94	45,76	46,86
5 : 1	vzorek č. 1	0	0,073	0,128	0,176	0,193	0,202	0,211	0,212	0,214	0,215
	vzorek č. 2	0	0,040	0,100	0,162	0,190	0,208	0,214	0,217	0,220	0,221
	∅ A	0	0,057	0,114	0,169	0,192	0,205	0,213	0,215	0,217	0,218
	SD	0	0,017	0,014	0,007	0,002	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,202	0,407	0,604	0,684	0,732	0,759	0,766	0,775	0,779
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	3,027	6,107	9,054	10,259	10,982	11,384	11,491	11,625	11,679
	% množství RhB	0	12,91	26,05	38,61	43,75	46,84	48,55	49,01	49,58	49,81

Tabulka 10: Disoluce nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v pH 7,4

PLGA A2		absorbance									
		čas [h]									
		0	0,5	1	2	3	4	6	15	19	24
P L G A	vzorek č. 1	0	0,126	0,204	0,298	0,360	0,390	0,427	0,447	0,450	0,451
	vzorek č. 2	0	0,217	0,260	0,346	0,386	0,406	0,427	0,435	0,441	0,441
	∅ A	0	0,172	0,232	0,322	0,373	0,398	0,427	0,441	0,446	0,446
	SD	0	0,046	0,028	0,024	0,013	0,008	0,000	0,006	0,005	0,005
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,613	0,829	1,150	1,332	1,421	1,525	1,575	1,591	1,593
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	9,188	12,429	17,250	19,982	21,321	22,875	23,625	23,866	23,893
	% množství RhB	0	24,56	33,23	46,12	53,43	57,01	61,16	63,17	63,81	63,88
1 : 1	vzorek č. 1	0	0,110	0,180	0,233	0,257	0,263	0,271	0,275	0,277	0,280
	vzorek č. 2	0	0,108	0,185	0,240	0,262	0,266	0,276	0,277	0,280	0,287
	∅ A	0	0,109	0,183	0,237	0,260	0,265	0,274	0,276	0,279	0,284
	SD	0	0,001	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,001	0,002	0,003
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,389	0,652	0,845	0,927	0,945	0,977	0,986	0,995	1,013
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	5,839	9,777	12,670	13,902	14,170	14,652	14,786	14,920	15,188
	% množství RhB	0	17,77	29,75	38,55	42,30	43,11	44,58	44,99	45,39	46,21
2 : 1	vzorek č. 1	0	0,088	0,149	0,204	0,235	0,247	0,267	0,271	0,275	0,277
	vzorek č. 2	0	0,062	0,128	0,197	0,236	0,249	0,262	0,274	0,275	0,275
	∅ A	0	0,075	0,139	0,201	0,236	0,248	0,265	0,273	0,275	0,276
	SD	0	0,013	0,011	0,003	0,001	0,001	0,003	0,002	0,000	0,001
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,268	0,495	0,716	0,841	0,886	0,945	0,973	0,982	0,986
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	4,018	7,420	10,741	12,616	13,286	14,170	14,598	14,732	14,786
	% množství RhB	0	12,43	22,95	33,22	39,02	41,09	43,83	45,15	45,57	45,73
5 : 1	vzorek č. 1	0	0,051	0,099	0,164	0,203	0,217	0,237	0,260	0,261	0,262
	vzorek č. 2	0	0,046	0,102	0,174	0,200	0,222	0,247	0,269	0,270	0,270
	∅ A	0	0,049	0,101	0,169	0,202	0,220	0,242	0,265	0,266	0,266
	SD	0	0,003	0,001	0,005	0,002	0,003	0,005	0,005	0,005	0,004
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,173	0,359	0,604	0,720	0,784	0,864	0,945	0,948	0,950
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	2,598	5,384	9,054	10,795	11,759	12,964	14,170	14,223	14,250
	% množství RhB	0	8,44	17,49	29,41	35,07	38,20	42,12	46,03	46,21	46,30

Tabulka 11: Disoluce nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v kyselém pH

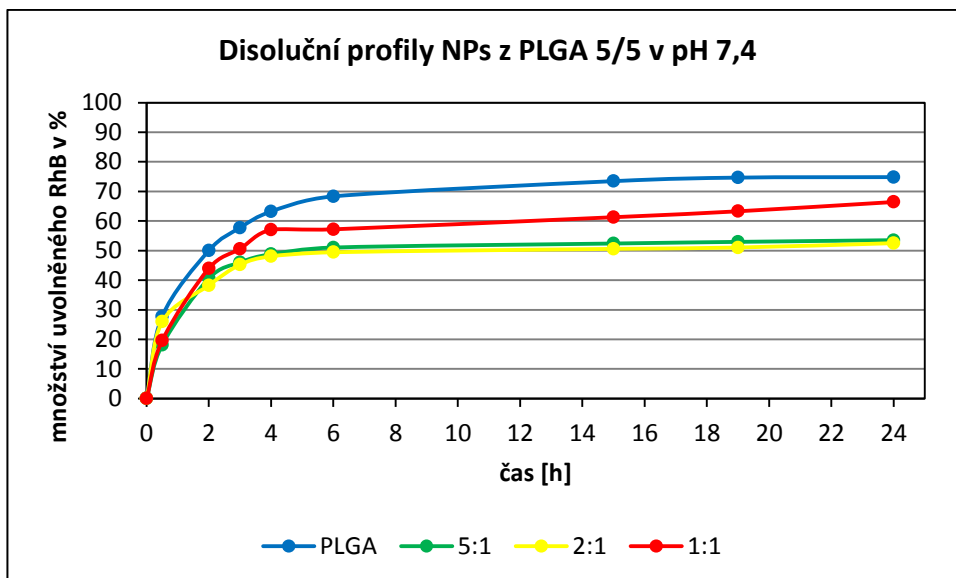
PLGA 5/5		absorbance								
		čas [h]								
		0	0,5	2	3	4	6	15	19	24
P L G A	vzorek č. 1	0	0,061	0,086	0,088	0,093	0,095	0,100	0,108	0,112
	vzorek č. 2	0	0,038	0,069	0,073	0,075	0,083	0,095	0,099	0,108
	Ø A	0	0,050	0,078	0,081	0,084	0,089	0,098	0,104	0,110
	SD	0	0,012	0,008	0,008	0,009	0,006	0,003	0,005	0,002
	c _{RhB} [µg/ml]	0	0,241	0,378	0,320	0,334	0,353	0,387	0,411	0,437
	m _{RhB} [µg] v médiu	0	3,620	5,668	6,394	6,672	7,069	7,744	8,221	8,737
	% množství RhB	0	23,15	36,24	40,88	42,66	45,20	49,51	52,56	55,86
1 : 1	vzorek č. 1	0	0,033	0,032	0,039	0,042	0,049	0,064	0,065	0,069
	vzorek č. 2	0	0,023	0,036	0,046	0,048	0,053	0,067	0,068	0,075
	Ø A	0	0,028	0,034	0,043	0,045	0,051	0,066	0,067	0,072
	SD	0	0,005	0,002	0,004	0,003	0,002	0,002	0,002	0,003
	c _{RhB} [µg/ml]	0	0,137	0,166	0,169	0,179	0,203	0,260	0,264	0,286
	m _{RhB} [µg] v médiu	0	2,048	2,487	3,376	3,574	4,051	5,203	5,282	5,719
	% množství RhB	0	6,66	8,08	10,97	11,62	13,17	16,91	17,17	18,59
2 : 1	vzorek č. 1	0	0,075	0,079	0,076	0,077	0,077	0,085	0,093	0,094
	vzorek č. 2	0	0,022	0,035	0,036	0,039	0,045	0,056	0,056	0,058
	Ø A	0	0,049	0,057	0,056	0,058	0,061	0,071	0,075	0,076
	SD	0	0,027	0,022	0,020	0,019	0,016	0,015	0,019	0,018
	c _{RhB} [µg/ml]	0	0,236	0,278	0,222	0,230	0,242	0,280	0,296	0,302
	m _{RhB} [µg] v médiu	0	3,547	4,169	4,448	4,607	4,845	5,600	5,917	6,037
	% množství RhB	0	15,09	17,73	18,92	19,59	20,61	23,82	25,17	25,68
5 : 1	vzorek č. 1	0	0,056	0,083	0,086	0,094	0,091	0,133	0,133	0,156
	vzorek č. 2	0	0,045	0,076	0,078	0,084	0,087	0,095	0,096	0,099
	Ø A	0	0,051	0,080	0,082	0,089	0,089	0,114	0,115	0,128
	SD	0	0,006	0,004	0,004	0,005	0,002	0,019	0,019	0,029
	c _{RhB} [µg/ml]	0	0,246	0,388	0,326	0,353	0,353	0,453	0,455	0,506
	m _{RhB} [µg] v médiu	0	3,693	5,814	6,513	7,069	7,069	9,055	9,095	10,127
	% množství RhB	0	15,50	24,41	25,34	29,67	29,67	38,01	38,18	42,51

Tabulka 12: Disoluce nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v kyselém pH

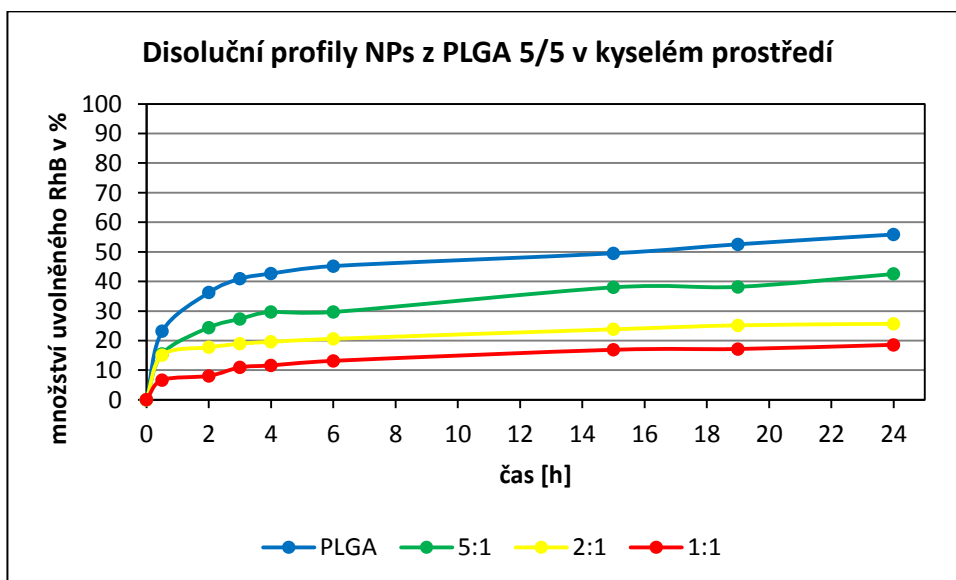
PLGA 7/3		absorbance									
		čas [h]									
		0	0,5	1	2	3	4	6	15	19	24
P L G A	vzorek č. 1	0	0,050	0,063	0,096	0,092	0,097	0,107	0,118	0,119	0,120
	vzorek č. 2	0	0,047	0,058	0,090	0,087	0,087	0,096	0,111	0,117	0,119
	∅ A	0	0,049	0,061	0,093	0,090	0,092	0,102	0,115	0,118	0,120
	SD	0	0,002	0,003	0,003	0,003	0,005	0,006	0,004	0,001	0,001
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,236	0,295	0,453	0,355	0,365	0,403	0,455	0,469	0,475
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	3,547	4,425	6,802	7,109	7,307	8,062	9,095	9,373	9,492
	% množství RhB	0	13,63	17,00	26,14	27,32	28,08	30,98	34,95	36,02	36,48
1 : 1	vzorek č. 1	0	0,007	0,007	0,018	0,020	0,021	0,025	0,038	0,044	0,046
	vzorek č. 2	0	0,015	0,018	0,036	0,037	0,038	0,041	0,048	0,049	0,050
	∅ absorbance	0	0,011	0,013	0,027	0,029	0,030	0,033	0,043	0,047	0,048
	SD	0	0,004	0,006	0,009	0,009	0,009	0,008	0,005	0,003	0,002
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,054	0,061	0,132	0,113	0,117	0,131	0,171	0,185	0,191
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	0,804	0,914	1,975	2,264	2,343	2,621	3,415	3,693	3,813
	% množství RhB	0	2,19	2,48	5,37	6,15	6,37	7,12	9,28	10,04	10,36
2 : 1	vzorek č. 1	0	0,005	0,009	0,026	0,026	0,028	0,031	0,039	0,042	0,043
	vzorek č. 2	0	0,008	0,011	0,030	0,030	0,032	0,035	0,043	0,047	0,052
	∅ A	0	0,007	0,010	0,028	0,028	0,030	0,033	0,041	0,045	0,048
	SD	0	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,005
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,032	0,049	0,137	0,111	0,119	0,131	0,163	0,177	0,189
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	0,475	0,731	2,048	2,224	2,383	2,621	3,257	3,535	3,773
	% množství RhB	0	1,63	2,50	7,01	7,61	8,16	8,97	11,15	12,10	12,92
5 : 1	vzorek č. 1	0	0,026	0,030	0,047	0,048	0,054	0,058	0,068	0,070	0,083
	vzorek č. 2	0	0,014	0,030	0,048	0,051	0,060	0,063	0,072	0,072	0,073
	∅ A	0	0,020	0,030	0,048	0,050	0,057	0,061	0,070	0,071	0,078
	SD	0	0,006	0,000	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002	0,001	0,005
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,098	0,146	0,232	0,197	0,226	0,240	0,278	0,282	0,310
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	1,463	2,194	3,474	3,932	4,527	4,805	5,560	5,639	6,195
	% množství RhB	0	6,24	9,36	14,82	16,77	19,31	20,49	23,71	24,05	26,42

Tabulka 13: Disoluce nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v kyselém pH

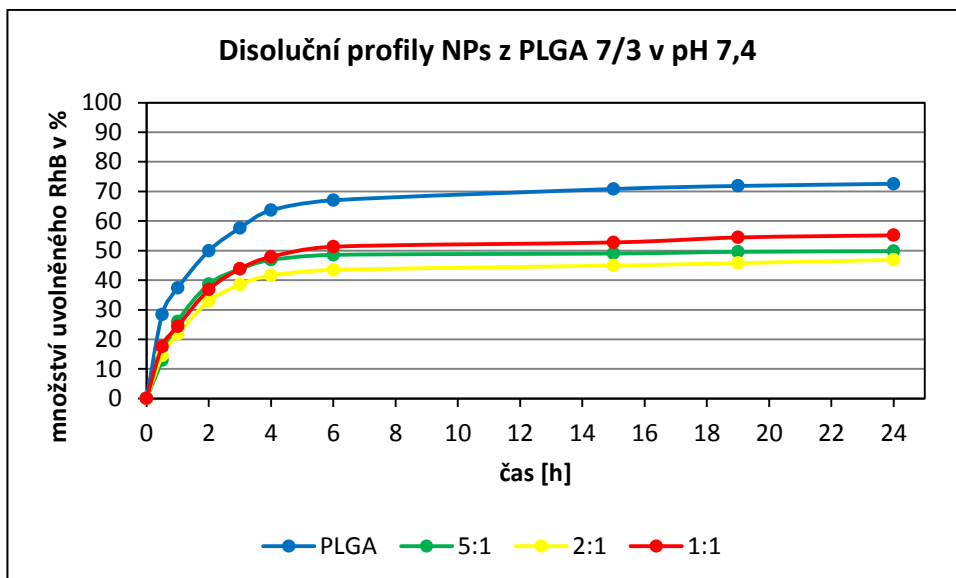
PLGA A2		absorbance									
		čas [h]									
		0	0,5	1	2	3	4	6	15	19	24
P L G A	vzorek č. 1	0	0,064	0,080	0,121	0,106	0,109	0,113	0,114	0,117	0,117
	vzorek č. 2	0	0,063	0,084	0,123	0,117	0,118	0,119	0,120	0,121	0,124
	∅ A	0	0,064	0,082	0,122	0,112	0,114	0,116	0,117	0,119	0,121
	SD	0	0,001	0,002	0,001	0,006	0,005	0,003	0,003	0,002	0,004
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,310	0,400	0,595	0,443	0,451	0,461	0,465	0,473	0,479
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	4,644	5,997	8,922	8,856	9,015	9,214	9,293	9,452	9,571
	% množství RhB	0	12,42	16,03	23,86	23,68	24,10	24,63	24,85	25,27	25,59
1 : 1	vzorek č. 1	0	0,019	0,021	0,034	0,034	0,035	0,039	0,054	0,052	0,052
	vzorek č. 2	0	0,013	0,024	0,041	0,037	0,039	0,043	0,051	0,054	0,055
	∅ A	0	0,016	0,023	0,038	0,036	0,037	0,041	0,053	0,053	0,054
	SD	0	0,003	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,078	0,110	0,183	0,141	0,147	0,163	0,208	0,210	0,212
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	1,170	1,646	2,743	2,820	2,939	3,257	4,170	4,210	4,249
	% množství RhB	0	3,56	5,01	8,34	8,58	8,94	9,91	12,69	12,81	12,93
2 : 1	vzorek č. 1	0	0,014	0,028	0,049	0,047	0,050	0,052	0,053	0,055	0,059
	vzorek č. 2	0	0,021	0,040	0,058	0,053	0,055	0,056	0,061	0,060	0,060
	∅ A	0	0,018	0,034	0,054	0,050	0,053	0,054	0,057	0,058	0,060
	SD	0	0,004	0,006	0,005	0,003	0,003	0,002	0,004	0,003	0,001
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,085	0,166	0,261	0,199	0,208	0,214	0,226	0,228	0,236
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	1,280	2,487	3,913	3,971	4,170	4,289	4,527	4,567	4,726
	% množství RhB	0	3,96	7,69	12,10	12,28	12,90	13,27	14,00	14,13	14,62
5 : 1	vzorek č. 1	0	0,034	0,034	0,054	0,045	0,052	0,055	0,059	0,059	0,059
	vzorek č. 2	0	0,021	0,046	0,062	0,062	0,064	0,065	0,069	0,072	0,073
	∅ A	0	0,028	0,040	0,058	0,054	0,058	0,060	0,064	0,066	0,066
	SD	0	0,006	0,006	0,004	0,008	0,006	0,005	0,005	0,007	0,007
	c _{RhB} [μg/ml]	0	0,134	0,195	0,283	0,212	0,230	0,238	0,254	0,260	0,262
	m _{RhB} [μg] v médiu	0	2,011	2,925	4,242	4,249	4,607	4,766	5,083	5,203	5,242
	% množství RhB	0	6,53	9,50	13,78	13,81	14,97	15,48	16,51	16,90	17,03



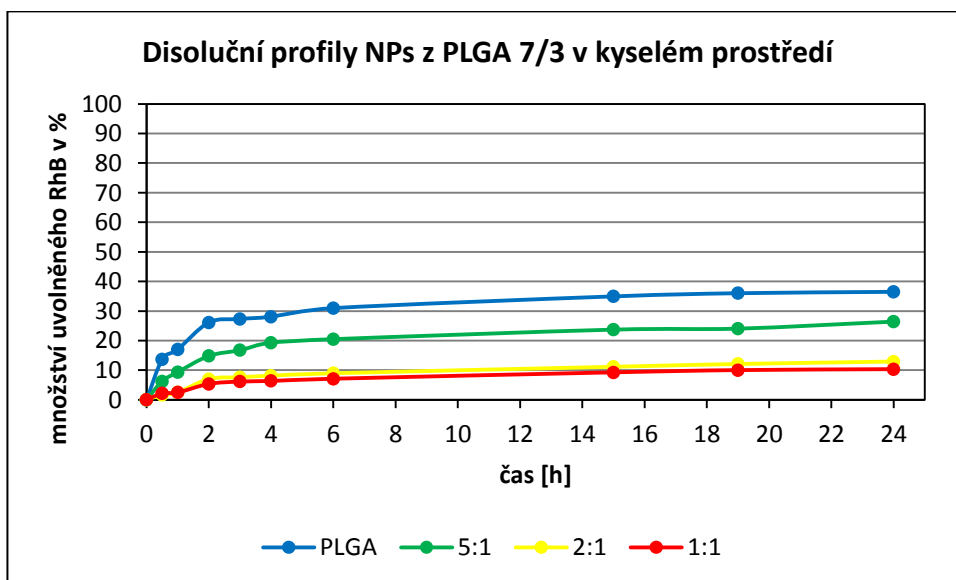
Graf 5: Disoluční profily nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v pH 7,4



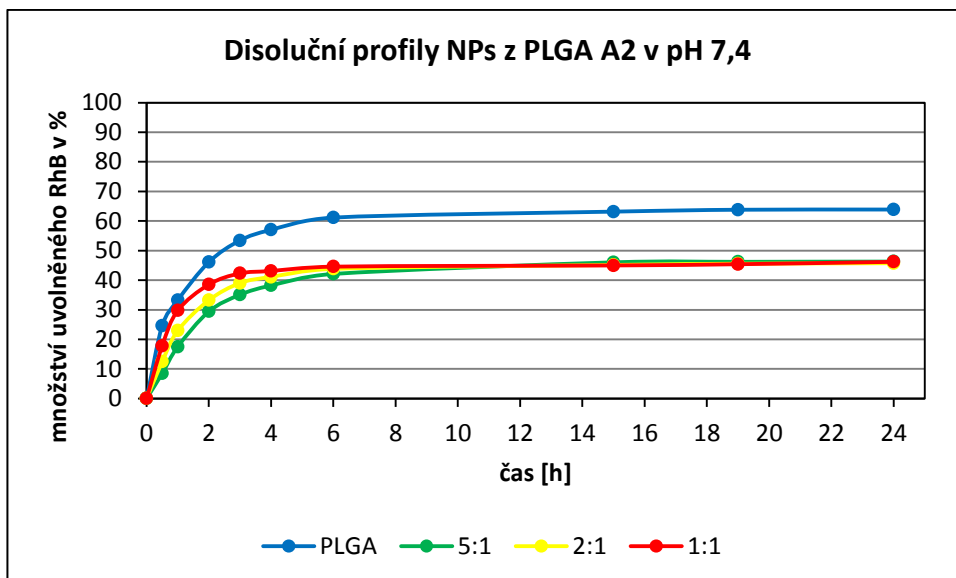
Graf 6: Disoluční profily nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v kyselém pH



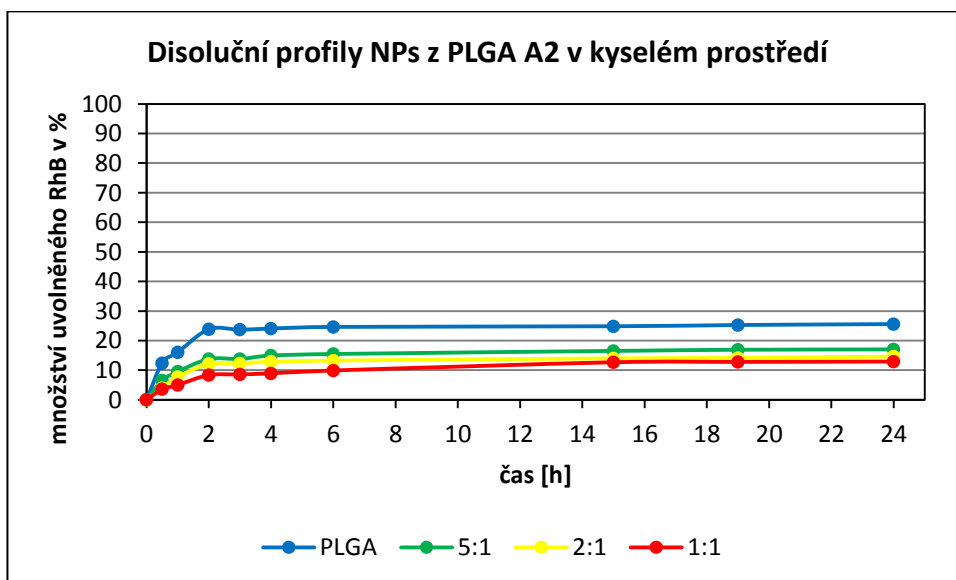
Graf 7: Disoluční profily nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v pH 7,4



Graf 8: Disoluční profily nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v kyselém pH



Graf 9: Disoluční profily nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v pH 7,4

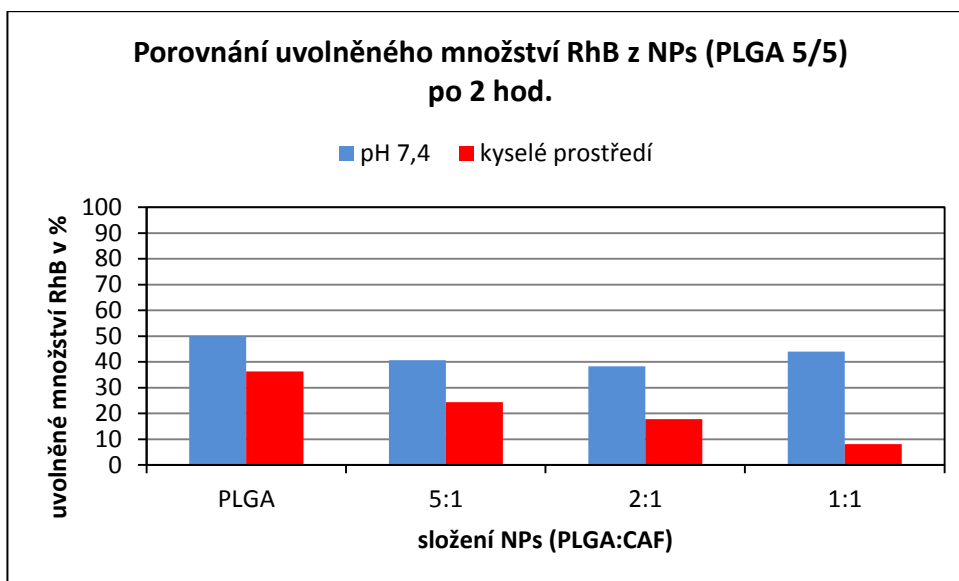


Graf 10: Disoluční profily nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v kyselém pH

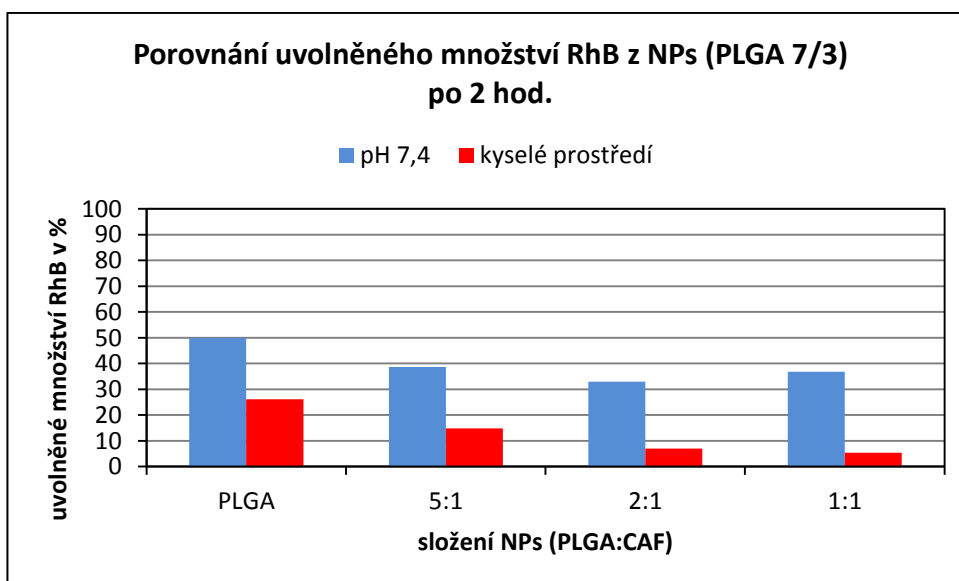
Z disolučních profilů vyplývá, že uvolňování RhB z polymerních nanočástic ve fyziologickém prostředí je lehce sníženo, pokud je v nanočástici podíl acidorezistentního polymeru. Během disoluce dochází u vzorků s podílem CAF k uvolnění přibližně do 50 % enkapsulovaného RhB, zatímco u nanočástic tvořených pouze PLGA dosahují tyto hodnoty až 70 %.

V kyselém prostředí pak dochází k výraznému snížení uvolněného množství RhB ze všech typů nanočástic, což svědčí o jejich acidorezistentnosti. V grafech 11

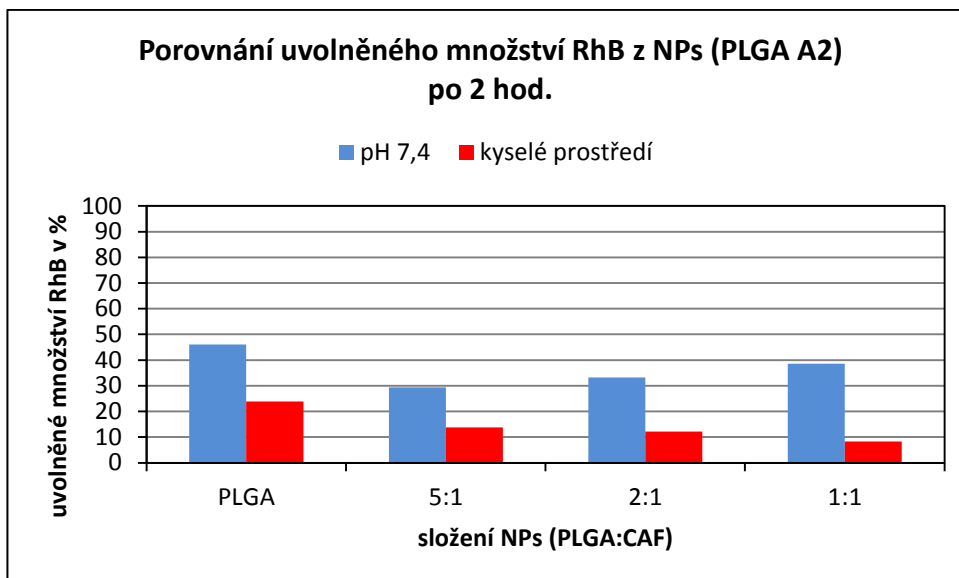
až 13 je pro srovnání znázorněno, kolik procent enkapsulovaného RhB se uvolní z jednotlivých typů nanočástic po 2 hodinách v kyselém a fyziologickém prostředí. Limit 2 hodin byl zvolen vzhledem k předpokládané délce pasáže nanočástic žaludkem v případě jejich perorálního podání. Z těchto grafů vyplývá, že čím větší je podíl acidorezistentní složky v nanočásticích, tím méně RhB se z nanočástic v kyselém prostředí uvolní.



Graf 11: Porovnání uvolněného množství rhodaminu B z nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v jednotlivých disolučních médiích po 2 hodinách

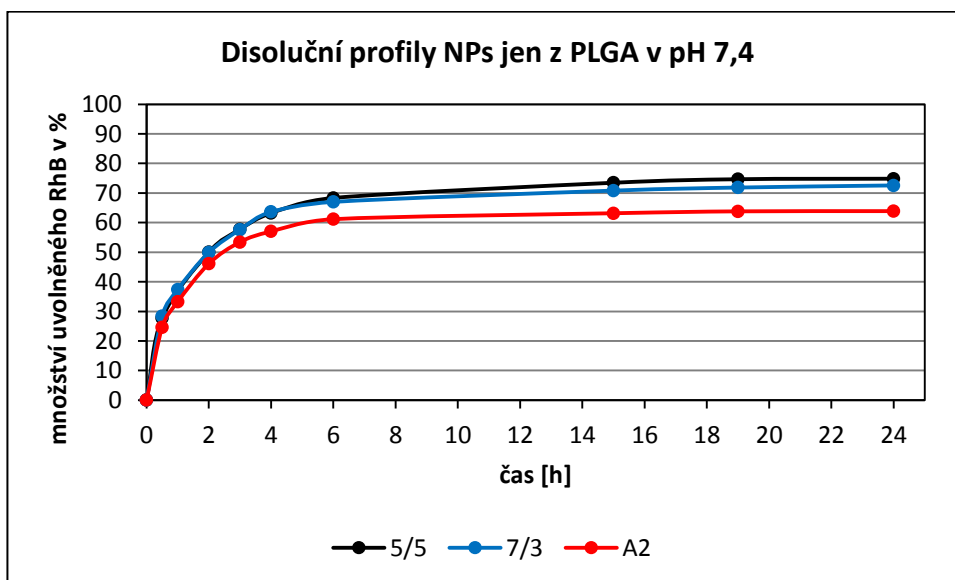


Graf 12: Porovnání uvolněného množství rhodaminu B z nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v jednotlivých disolučních médiích po 2 hodinách

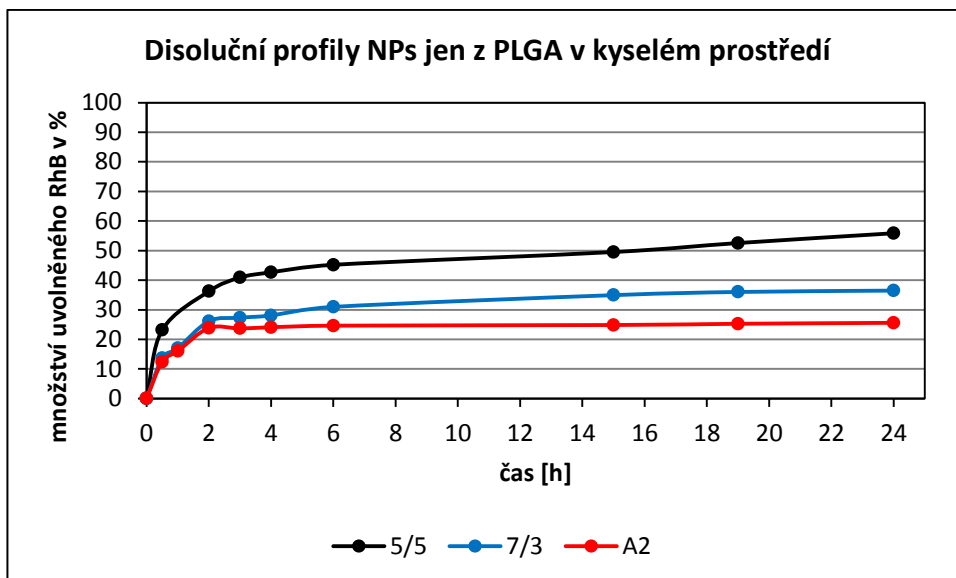


Graf 13: Porovnání uvolněného množství rhodaminu B z nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v jednotlivých disolučních médiích po 2 hodinách

Určitá odolnost vůči kyselému prostředí je zřejmá také u nanočástic, které jsou tvořeny pouze PLGA, přičemž nejméně se uvolňuje RhB z nanočástic tvořených polymerem A2. Disoluční profily nanočástic bez CAF jsou zobrazeny v grafech 14 a 15.



Graf 14: Porovnání disolučních profilů nanočástic jen z PLGA v pH 7,4



Graf 15: Porovnání disolučních profilů nanočástic jen z PLGA v kyselém pH

Fenomén určité acidorezistence polymerů nejspíš souvisí s jejich rozvětveností a lipofilitou. Polymer A2 je jediným použitým rozvětveným polymerem. PLGA 5/5 a 7/3 patří mezi polymery lineární. Z hlediska rostoucí lipofility je lze seřadit následovně PLGA A2, 5/5 a 7/3 jako nejlipofilnější.

Polymer A2 obsahuje ve své struktuře nejvíce terminálních karboxylových funkčních skupin. Lze předpokládat, že v kyselém prostředí pravděpodobně dochází k protonizaci těchto funkčních skupin a tím ke zvýšení hydrofobicity. Nanočástice se pak vlivem hydrofobních interakcí stává „kompaktnější“ a dochází tak k uvolnění menšího množství RhB.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na využití polymerních nanočástic jako nosičů léčiv v terapii nespecifických střevních zánětů. Byly vyzdvíženy patofyziologické aspekty onemocnění a z nich vyplývající požadavky na vlastnosti nanočásticových systémů.

V rámci experimentální části byly nanoprecipitační metodou připraveny polymerní nanočástice s enkapsulovanou modelovou látkou RhB. Byl zjišťován vliv acidorezistentního polymeru CAF na velikost a zeta potenciál připravených nanočástic. Proces enkapsulace a přípravy nanočástic byl hodnocen z hlediska enkapsulační efektivity, výtěžnosti a drug-loadingu. Uvolňování účinné látky z nanočástic pak bylo hodnoceno disolučními testy v kyselém prostředí a prostředí o pH 7,4.

Bylo zjištěno, že přídavek CAF nemá výrazný vliv ani na velikost ani zeta potenciál připravených nanočástic. Velikost připravených nanočástic splňuje předpoklady pro účinnou kumulaci v místě zánětu a vychytávání makrofágy. Zároveň všechny nanočástice vyhovují požadavku na index polydisperzity. Vyšší enkapsulační efektivita a výtěžnost byla prokázána u nanočástic tvořených hydrofobnějším polymerem PLGA 7/3 a na karboxyly bohatým, větveným PLGA derivátem A2. V případě použití lineárních polymerů (PLGA 5/5 a 7/3) došlo se zvyšujícím se podílem CAF v nanočásticích ke zvýšení EE, RY i DL. Při disolučních testech byla prokázána odolnost připravených nanočástic vůči kyselému prostředí. Se zvyšujícím se podílem CAF došlo ke snížení uvolňování RhB. Nanočástice tvořené zejména větvenou PLGA vykazovaly také určitou míru acidorezistence, která nejspíše souvisí s četností protonizovatelných volných skupin.

7 SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
5-ASA	5-aminosalicylová kyselina
CAF	celulosa-acetát ftalát
CN	Crohnova choroba
DL	drug loading
DLS	dynamický rozptyl světla (z angl. <i>dynamic light scattering</i>)
EE	enkapsulační efektivita (z angl. <i>entrapment efficiency</i>)
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (z angl. <i>enhanced permeability and retention</i>)
FDA	Food and Drug Administration
IBD	nespecifické střevní záněty (z angl. <i>inflammatory bowel diseases</i>)
NPs	nanočástice
PACA	poly(alkylkyanoakryláty)
PBS	fosfátový pufr (z angl. <i>phosphate buffer saline</i>)
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PDI	index polydisperzity
PEG	poly(etylglykol)
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)
RhB	rhodamin B
RY	výtěžnost (z angl. <i>recovery yield</i>)
SD	směrodatná odchylka
UC	ulcerózní kolitida
ZP	zeta potenciál

8 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázky

Obr. 1: Schéma biologického odbourávání polymerů[29].....	17
Obr. 2: Možnosti inkorporace léčiva do částic[33].....	19
Obr. 3: Emulzní odpařovací metoda[36]	20
Obr. 4: Metoda emulze-difuze[36]	20
Obr. 5: Vysolování[36]	21
Obr. 6: Nanoprecipitační metoda[36]	22
Obr. 7: Schématické znázornění přístroje Zetasizer Nano ZS[41]	27
Obr. 8: Schématické znázornění kyvety pro měření ζ -potenciálu a elektroforézy[41]	28
Obr. 9: Makroskopické změny vzorků lyofilizovaných nanočástic vzniklé při disoluci (archiv autora).....	38

Tabulky

Tabulka 1: Rozdíly mezi Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou[12]	11
Tabulka 2: Číselné (M_n) a hmotnostní (M_w) průměry molární hmotnosti použitých polymerů	23
Tabulka 3: Složení šarží nanočástic	25
Tabulka 4: Přehled vlnových délek, při kterých probíhalo spektrofotometrické měření, a rovnic kalibračních přímek pro použitá disoluční média.....	31
Tabulka 5: Velikosti připravených nanočástic a jejich polydisperzita	35
Tabulka 6: Zeta potenciál připravených nanočástic	36
Tabulka 7: Enkapsulační efektivita, drug loading a výtěžnost	37
Tabulka 8: Disoluce nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v pH 7,4	40
Tabulka 9: Disoluce nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v pH 7,4	41
Tabulka 10: Disoluce nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v pH 7,4....	42
Tabulka 11: Disoluce nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v kyselém pH	43
Tabulka 12: Disoluce nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v kyselém pH	44

Tabulka 13: Disoluce nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v kyselém pH	45
--	----

Grafy

Graf 1: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v acetonitrilu při 556nm.....	30
Graf 2: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové při 556 nm.....	32
Graf 3: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v 0,1M HCl a 0,2M Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O v poměru 3:1 při 555 nm	32
Graf 4: Kalibrační přímka roztoku rhodaminu B v 0,01M fosfátovém pufru o pH 7,4 při 554 nm.....	33
Graf 5: Disoluční profily nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v pH 7,4	46
Graf 6: Disoluční profily nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v kyselém pH.....	46
Graf 7: Disoluční profily nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v pH 7,4	47
Graf 8: Disoluční profily nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v kyselém pH.....	47
Graf 9: Disoluční profily nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v pH 7,4	48
Graf 10: Disoluční profily nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v kyselém pH	48
Graf 11: Porovnání uvolněného množství rhodaminu B z nanočástic z PLGA 5/5 v různém poměru s CAF v jednotlivých disolučních médiích po 2 hodinách	49
Graf 12: Porovnání uvolněného množství rhodaminu B z nanočástic z PLGA 7/3 v různém poměru s CAF v jednotlivých disolučních médiích po 2 hodinách.....	49
Graf 13: Porovnání uvolněného množství rhodaminu B z nanočástic z PLGA A2 v různém poměru s CAF v jednotlivých disolučních médiích po 2 hodinách.....	50
Graf 14: Porovnání disolučních profilů nanočástic jen z PLGA v pH 7,4	50
Graf 15: Porovnání disolučních profilů nanočástic jen z PLGA v kyselém pH.....	51

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Co je nano? - Nanotrade.cz* [online]. 2019 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <http://www.nanotrade.cz/co-je-nano>
- [2] RABIŠKOVÁ, Miloslava. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia* [online]. 2007, **17**(5), 495–501 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Nanocastice-pro-lekove-formy/6-H-ix.magarticle.aspx>
- [3] EHRMANN, Jiří a Michal KONEČNÝ. Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů. *Medicína pro praxi* [online]. 2011, **8**(10), 435–437 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/10/09.pdf>
- [4] PFEIFEROVÁ, Martina. *Pacientská organizace PACIENTI IBD z.s* [online]. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: https://www.nemocnice-horovice.cz/data/moxie/PPT/Pacientska_organizace.pdf
- [5] Crohn's and Colitis UK. *Crohn's and Colitis UK* [online]. 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.crohnsandcolitis.org.uk/about-inflammatory-bowel-disease>
- [6] LOFTUS, Edward V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* [online]. 2004, **126**(6), 1504-1517 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.01.063. ISSN 00165085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508504004627>
- [7] PATKOVÁ, Anna. *Vliv bilirubinu na progresi nespecifických střevních zánětů*. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd.
- [8] VLČEK, Jiří a Magda VYTRŽÍSALOVÁ. *Klinická farmacie II*. Praha: Grada Publishing, 2014, s. 83-107. ISBN 978-80-247-4532-9.
- [9] AUGUSTIN, Goran. Acute Inflammatory Bowel Disease. *Acute Abdomen During Pregnancy* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018, 2018-09-15, , 345-384 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1007/978-3-319-72995-4_8. ISBN 978-3-319-72994-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/978->

- [10] HUA, Susan, Ellen MARKS, Jennifer J. SCHNEIDER a Simon KEELY. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2015, **11**(5), 1117-1132 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.nano.2015.02.018. ISSN 15499634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415000684>
- [11] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 2012, s. 231-232. ISBN 978-80-247-3530-6.
- [12] *Rozdíly mezi Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou* [online]. 2018 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <https://www.strevni-zanety.cz/rozdily-mezi-mc-a-uc>
- [13] LUKÁŠ, Milan. Farmakoterapie idiopatických střevních zánětů. *Praktické lékárenství* [online]. 2009, **5**(4), 164-167 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2009/04/03.pdf>
- [14] DOUDA, Tomáš. Pokroky v terapii idiopatických střevních zánětů. *Interní medicína* [online]. 2017, **19**(3), 110–115 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://internimedicina.cz/pdfs/int/2017/03/03.pdf>
- [15] LUKÁŠ, Milan. Léčiva používaná k terapii zánětlivých střevních onemocnění. *Compendium - Léčiva používaná v podmínkách ČR*. 5. vyd. Praha: Panax Co, s.r.o., 2018, s. 27–34. ISBN 978-80-902806-7-0.
- [16] ANTONELLI, Elisabetta, Vincenzo VILLANACCI a Gabrio BASSOTTI. Novel oral-targeted therapies for mucosal healing in ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2018, **24**(47), 5322-5330 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.3748/wjg.v24.i47.5322. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v24/i47/5322.htm>
- [17] XIAO, Bo a Didier MERLIN. Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2012, **9**(11), 1393-1407 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1517/17425247.2012.730517. ISSN 1742-5247. Dostupné z:

- <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2012.730517>
- [18] KOZIOLOVÁ, E., K. VENCLÍKOVÁ a T. ETRYCH. Polymer-drug conjugates in inflammation treatment. *Physiological research* [online]. 2018, **67**(2), 281-292 [cit. 2019-04-29]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/67/67_S281.pdf
- [19] YANG, Libo, James S CHU a Joseph A FIX. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, **235**(1-2), 1-15 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00004-2. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517302000042>
- [20] SI, Xiao-Ying, Didier MERLIN a Bo XIAO. Recent advances in orally administered cell-specific nanotherapeutics for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **22**(34), 7718-7726 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.3748/wjg.v22.i34.7718. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i34/7718.htm>
- [21] MOULARI, Brice, Arnaud BEDUNEAU, Yann PELLEQUER a Alf LAMPRECHT. Nanoparticle Targeting to Inflamed Tissues of the Gastrointestinal Tract. *Current Drug Delivery* [online]. 2013, **10**(1), 9-17 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.2174/1567201811310010004. ISSN 15672018.
- [22] LAMPRECHT, Alf, Ulrich SCHÄFER a Claus-Michael LEHR. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharmaceutical Research* [online]. 2001, **18**(6), 788-793 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1023/A:1011032328064. ISSN 07248741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1011032328064>
- [23] ALI, H., B. WEIGMANN, M.F. NEURATH, E.M. COLLNOT, M. WINDBERGS a C.-M. LEHR. Budesonide loaded nanoparticles with pH-sensitive coating for improved mucosal targeting in mouse models of inflammatory bowel diseases. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, **183**(1), 167-177 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.039. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914001849>
- [24] HONARY, S a F ZAHIR. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-

- Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2013, **12**(2), 255-264 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.4314/tjpr.v12i2.19. ISSN 1596-9827. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/88554>
- [25] HICKEY, John W., Jose Luis SANTOS, John-Michael WILLIFORD a Hai-Quan MAO. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **219**, 536-547 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.006. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915301759>
- [26] MAKHLOF, Abdallah, Yuichi TOZUKA a Hirofumi TAKEUCHI. PH-Sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally induced colitis rat model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2009, **72**(1), 1-8 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.12.013. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641109000046>
- [27] COCO, Régis, Laurence PLAPIED, Vincent POURCELLE, Christine JÉRÔME, David J. BRAYDEN, Yves-Jacques SCHNEIDER a Véronique PRÉAT. Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles: Comparison of different strategies. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **440**(1), 3-12 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.017. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312006928>
- [28] LIU, Lin, WenDong YAO, YueFeng RAO, XiaoYang LU a JianQing GAO. PH-Responsive carriers for oral drug delivery: challenges and opportunities of current platforms. *Drug Delivery* [online]. 2017, **24**(1), 569-581 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1080/10717544.2017.1279238. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2017.1279238>
- [29] TAMMAM, Salma N., Hassan M. E. AZZAZY a Alf LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, **11**(4), 555-577 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1166/jbn.2015.2017. ISSN 15507033.
- [30] HANS, M.L a A.M LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery

- and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, **6**(4), 319-327 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00117-1. ISSN 13590286. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028602001171>
- [31] KAPOOR, Deepak N, Amit BHATIA, Ripandeep KAUR, Ruchi SHARMA, Gurvinder KAUR a Sanju DHAWAN. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery* [online]. 2015, **6**(1), 41-58 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.4155/tde.14.91. ISSN 2041-5990. Dostupné z: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/tde.14.91>
- [32] BENNET, Devasier a Sanghyo KIM. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* [online]. InTech, 2014, 2014-07-25, , 257-310 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.5772/58422. ISBN 978-953-51-1628-8.
- [33] SAALLAH, Suryani a I. Wuled LENGGORO. Nanoparticles Carrying Biological Molecules: Recent Advances and Applications. *KONA Powder and Particle Journal* [online]. 2018, **35**, 89-111 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.14356/kona.2018015. ISSN 0288-4534. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/kona/35/0/35_2018015/_article
- [34] RAO, J. Prasad a Kurt E. GECKELER. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2011, **36**(7), 887-913 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011000232>
- [35] BÁRTA, Michal. *Příprava polymerních farmaceutických nanočástic: optimalizace procesu*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie.
- [36] WANG, Yichao, Puwang LI, Thao TRUONG-DINH TRAN, Juan ZHANG a Lingxue KONG. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials* [online]. 2016, **6**(2) [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.3390/nano6020026. ISSN 2079-4991. Dostupné z:

<http://www.mdpi.com/2079-4991/6/2/26>

- [37] VENCL, Jáchym. *Optimalizace separace a purifikace polymerních nanočástic*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie.
- [38] LABCONCO. *FreeZone® 1 Liter Benchtop Freeze Dry Systems User's Manual* [online]. 2004 [cit. 2019-02-16]. Dostupné z: www.labconco.com
- [39] NIREESHA, G. R., L. DIVYA, C. SOWMYA, N. VENKATESHAN, M. N. BABU a V. LAVAKUMAR. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal Of Novel Trends In Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **3**(4), 87–98 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: www.ijntps.org
- [40] *Lyofilizace* [online]. 2014 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/kot/wp-content/uploads/2010/01/Lyofilizace_2014-podklady-3x2.pdf
- [41] MALVERN. Zetasizer Nano User Manual [online]. [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.pdf>
- [42] LÁZNÍČKOVÁ, Alice a Vladimír KUBÍČEK. *Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2014, s. 130-132. ISBN 978-80-246-2791-5.
- [43] MALVERN. Zetasizer Nano Series. *Malvern Instruments Ltd* [online]. 2014, 20 [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/>
- [44] *General Chapters: DISSOLUTION* [online]. [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_c711.html
- [45] TOMIC, I., A. VIDIS-MILLWARD, M. MUELLER-ZSIGMONDY a J-M. CARDOT. Setting accelerated dissolution test for PLGA microspheres containing peptide, investigation of critical parameters affecting drug release rate and mechanism. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **505**(1-2), 42-51 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.048. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316302575>