

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Studium lyofilizovaných chitosanových částic s proteiny

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Kateřina Komárková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Komárková**
Osobní číslo: **C22370**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Studium lyofilizovaných chitosanových částic s proteiny**
Téma práce anglicky: **Study of Lyophilized Protein-bound Chitosan Particles**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V teoretické části diplomové práce se zaměřte se na aplikace polymerních částic s obsahem chitosanu v biomedicíně/ bioanalytice, v systémech označených jako drug delivery. Zabývejte se možnostmi skladování a konzervace částic (nano, submikro a makro – velikostí), včetně procesu lyofilizace. Dohleďte možné účinky kryoprotektantů na klinické aplikace částic.

Experimentální část:

1. Příprava chitosanových submikročástic s proteiny
2. Charakterizace částic – DLS, PI, zeta potenciál
3. Detekce účinnosti vazby proteinu na částice a hodnocení uvolňování proteinů
4. Optimalizace podmínek lyofilizace částic s proteiny, charakterizace částic

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Science direct; odborné knihy.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Studium lyofilizovaných chitosanových částic s proteiny jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2024

Kateřina Komárková v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní doc. Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, cenné rady a profesionální vedení při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací submikročástic založených na chitosanu, jako nosičového systémů pro cílené doručování léčiv. V teoretické části jsou shrnuty klíčové vlastnosti nosičových systémů, jejich aplikace v biomedicíně a jejich stabilita během skladování a po lyofilizaci. Experimentální část popisuje přípravu a charakterizaci submikročástic z chitosanu a tripolyfosfátu sodného a submikročástic z chitosanu a polykaprolaktonu s ovalbuminem a epiteliálním růstovým faktorem. U obou nosičových systémů byly zkoumány podmínky lyofilizace, účinnost adsorpce a zachycení proteinů do částic a kinetika uvolňování proteinu z částic.

KLÍČOVÁ SLOVA

nosičové systémy, submikročástice, chitosan, polykaprolakton, lyofilizace, kryoprotektiva, adsorpce, zachycení, uvolňování, ovalbumin

TITLE

Study of Lyophilized Protein-bound Chitosan Particles

ANNOTATION

The diploma thesis deals with preparation and characterization of chitosan-based submicroparticles as carriers for targeted drug delivery system. It summarizes the characteristics of carrier systems, their application in biomedicine and storage options, including lyophilization process. The experimental part is focused on the preparation and characterization of submicroparticles made of chitosan and sodium tripolyphosphate and submicroparticles made from chitosan and polycaprolactone. The lyophilization process of these carrier systems, the efficiency of ovalbumin adsorption, the efficiency of protein entrapment and the kinetics of protein release were studied.

KEYWORDS

Carrier systems, submicroparticles, chitosan, polycaprolactone, lyophilization, cryoprotectants, adsorption, entrapment, ovalbumin

OBSAH

| | |
|--|----|
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 11 |
| SEZNAM TABULEK | 11 |
| SEZNAM GRAFŮ | 13 |
| SEZNAM ROVNIC | 13 |
| SEZNAM ZKRATEK | 14 |
| ÚVOD | 15 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST | 16 |
| 1.1. Systémy cíleného doručování léčiv | 16 |
| 1.2. Biopolymery v cíleném doručování léčiv | 18 |
| 1.2.1. Vlastnosti nosičových systémů | 18 |
| 1.2.2. Přírodní biopolymery | 20 |
| 1.2.3. Syntetické biopolymery | 22 |
| 1.3. Nosičové systémy z chitosanu a tripolyfosfátu | 23 |
| 1.3.1. Chitosan | 23 |
| 1.3.2. Tripolyfosfát sodný | 26 |
| 1.3.3. Iontropní gelovatění | 26 |
| 1.3.4. Léčba malignit | 28 |
| 1.3.5. Slizniční vakcíny | 28 |
| 1.4. Nosičové systémy z chitosanu a polykaprolaktonu | 30 |
| 1.4.1. Polykaprolakton | 30 |
| 1.4.2. Nanočástice | 31 |
| 1.4.3. Nanovlákná | 31 |
| 1.4.4. Skafoldy | 32 |
| 1.5. Vazba proteinů k nosičům | 33 |
| 1.5.1. Adsorpce | 33 |
| 1.5.2. Zachycení | 34 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1.5.3. | Enkapsulace | 34 |
| 1.5.4. | Epiteliální růstový faktor a hojení ran | 35 |
| 1.6. | Charakterizace submikročástic..... | 37 |
| 1.6.1. | Dynamický rozptyl světla | 37 |
| 1.6.2. | Hydrodynamická velikost..... | 38 |
| 1.6.3. | Polydisperzní index | 39 |
| 1.6.4. | Zeta potenciál..... | 39 |
| 1.7. | Podmínky pro skladování nosičových systémů | 39 |
| 1.7.1. | Vliv teploty na skladování | 40 |
| 1.7.2. | Vliv pH na skladování | 40 |
| 1.7.3. | Lyofilizace | 41 |
| 2. | CÍL PRÁCE..... | 47 |
| 3. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 48 |
| 3.1. | Pomůcky a přístroje..... | 48 |
| 3.2. | Reagencie a chemikálie | 49 |
| 3.3. | Příprava roztoků | 50 |
| 3.4. | Příprava částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného..... | 52 |
| 3.5. | Příprava částic z chitosanu/polykaprolaktonu..... | 52 |
| 3.6. | Dialýza částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného | 54 |
| 3.7. | Lyofilizace částic | 54 |
| 3.7.1. | Lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného..... | 55 |
| 3.7.2. | Lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného se zachyceným proteinem | 56 |
| 3.7.3. | Lyofilizace částic chitosanu/polykaprolaktonu | 56 |
| 3.8. | Adsorpce ovalbuminu na částice | 57 |
| 3.9. | Zachycení proteinu do struktury částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného | 59 |
| 3.10. | Kinetika uvolňování proteinu z částic..... | 59 |

| | |
|---|----|
| 3.11. Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninového testu | 60 |
| 3.11.1. Pierce™ BCA Protein Assay Kit..... | 61 |
| 3.11.2. Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit – metoda v mikrozkušavkách Eppendorf | 62 |
| 3.11.3. Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit – metoda v mikrotitrační destičce | 63 |
| 3.12. Fyzikálně-chemická charakterizace částic | 65 |
| 3.12.1. Stanovení hydrodynamické velikosti částic a polydisperzního indexu ... | 65 |
| 3.12.2. Stanovení zeta potenciálu | 65 |
| 4. VÝSLEDKY A DISKUZE | 66 |
| 4.1. Příprava a charakterizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu s adsorbovaným proteinem..... | 67 |
| Optimalizace podmínek lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu | 67 |
| Hodnocení účinnosti adsorpce proteinů na částice z chitosanu/tripolyfosfátu | 73 |
| 4.2. Příprava a charakterizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu se zachyceným proteinem..... | 75 |
| Lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu se zachyceným proteinem. | 76 |
| Hodnocení účinnosti zachycení proteinu do struktury částic z chitosanu/tripolyfosfátu | 77 |
| Kinetika uvolňování proteinů z částic z chitosanu/tripolyfosfátu | 78 |
| 4.3. Příprava a charakterizace částic z chitosanu/polykaprolaktanu s adsorbovaným proteinem..... | 82 |
| Optimalizace podmínek lyofilizace částic z chitosanu/polykaprolaktanu | 83 |
| Hodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu na částice z chitosanu/polykaprolaktanu | 85 |
| Kinetika uvolňování ovalbuminu z částic z chitosanu/polykaprolaktanu | 86 |

| | |
|--|-----|
| 4.4. Porovnání účinnosti vazby a uvolňování proteinů z částic | 87 |
| Porovnání účinnosti vazby proteinů na částice z chitosanu/tripolyfosfátu a z chitosanu/polykaprolaktonu | 88 |
| Porovnání kinetiky uvolňování proteinu adsorbovaného na částice a zachyceného ve struktuře částic | 89 |
| ZÁVĚR..... | 90 |
| ZDROJE LITERATURY | 91 |
| PŘÍLOHY | 108 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Chemická struktura chitosanu [44]..... | 23 |
| Obrázek 2: Chemická struktura tripolyfosfátu sodného [57]..... | 26 |
| Obrázek 3: Ionotropní gelovatění částic CS/TPP, upraveno dle [63]..... | 27 |
| Obrázek 4: Chemická struktura polykaprolaktonu [70]..... | 30 |
| Obrázek 5: Používaná lyofilizační vialka..... | 68 |
| Obrázek 6: Sraženina v rozpuštěném lyofilizátu částic z CS/TPP s mannitolem (5%, 2 ml) . | 70 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Pipetáž reagensů do lyofilizačních vialek pro částice z CS/TPP..... | 55 |
| Tabulka 2: Lyofilizační program..... | 56 |
| Tabulka 3: Pipetáž reagensů do lyofilizačních vialek pro částice z CS/PCL..... | 57 |
| Tabulka 4: Pipetáž pro přípravu standardů pro kalibraci Pierce TM BCA testu..... | 62 |
| Tabulka 5: Pipetáž pro přípravu standardů pro kalibraci Micro BCATM testu pro metodu v mikrokumavkách Eppendorf..... | 63 |
| Tabulka 6: Pipetáž pro přípravu standardů pro kalibraci Micro BCA TM testu pro metodu v mikrotitrační destičce..... | 64 |
| Tabulka 7: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu pro částice z CS/TPP (počet opakování: 3)..... | 67 |
| Tabulka 8: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP lyofilizací a filtrací (počet opakování: 3)..... | 69 |
| Tabulka 9: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě a po dialýze do deionizované vody (počet opakování: 3)..... | 70 |
| Tabulka 10: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze do deionizované vody a lyofilizaci s kryoprotektivem trehalóza o koncentraci 5% w/v v objemu 2 ml (počet opakování: 3)..... | 71 |
| Tabulka 11: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze do deionizované vody a lyofilizaci s kryoprotektivem trehalóza o koncentraci 2,5% w/v v objemu 2 ml (počet opakování: 3)..... | 72 |
| Tabulka 12: Účinnost adsorpce a vazebná kapacita nosiče vztažená na 2 mg částic z CS/TPP (počet opakování: 3)..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| Tabulka 13: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu pro částice z CS/TPP po zachycení OVA a EGF (počet opakování: 3) | 75 |
| Tabulka 14: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP s navázaným proteinem po lyofilizaci (počet opakování: 3)..... | 76 |
| Tabulka 15: Účinnost zachycení a vazebná kapacita nosiče vztažená na 2 mg částic CS/TPP (počet opakování: 3)..... | 77 |
| Tabulka 16: Naměřená koncentrace alikvotů uvolněného ovalbuminu z částic z CS/TPP po přechodí adsorpci v koncentracích a v procentech uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)..... | 79 |
| Tabulka 17: Naměřená koncentrace alikvotů uvolněného ovalbuminu s EGF z částic z CS/TPP se zachyceným proteinem vyjádřena v koncentracích a v procentech uvolněných proteinů (počet opakování: 3)..... | 81 |
| Tabulka 18: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu pro částice z CS/PCL po přípravě a po dialýze (počet opakování: 3) | 83 |
| Tabulka 19: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/PCL po lyofilizaci s různými kryoprotektivy o různých koncentracích a objemech (počet opakování: 3) | 84 |
| Tabulka 20: Účinnost adsorpce a vazebná kapacita nosiče vztažená na 2 mg částic z CS/PCL (počet opakování: 3)..... | 85 |
| Tabulka 21: Naměřená koncentrace alikvotů uvolněného ovalbuminu z částic z CS/PCL po přechodí adsorpci vyjádřena v koncentracích a v procentech uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)..... | 86 |
| Tabulka 22: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě | 108 |
| Tabulka 23: Vliv objemu na vlastnosti CS/TPP částic po lyofilizaci s trehalózou (2,5 % w/v) po filtraci | 108 |
| Tabulka 24: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě a po dialýze v destilované vodě | 109 |
| Tabulka 25: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze v deionizované vodě a po lyofilizaci s trehalózou (5 % w/v, 2 ml) | 109 |
| Tabulka 26: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze v deionizované vodě a po lyofilizaci s trehalózou (2,5 % w/v, 2 ml) | 110 |
| Tabulka 27: Vlastnosti částic z CS/TPP se zachyceným ovalbuminem a zachyceným EGF po přípravě..... | 110 |
| Tabulka 28: Vlastnosti částic z CS/TPP se zachyceným ovalbuminem a zachyceným EGF po lyofilizaci s trehalózou (2,5% w/v, 2 ml) | 111 |
| Tabulka 29: Vlastnosti částic z CS/PLC po přípravě a po dialýze..... | 111 |

| | |
|--|-----|
| Tabulka 30: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s trehalózou (5 % w/v) | 112 |
| Tabulka 31: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s trehalózou (2,5 % w/v) | 112 |
| Tabulka 32: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s mannitolem (5 % w/v) | 113 |
| Tabulka 33: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s mannitolem (1 % w/v) | 113 |

SEZNAM GRAFŮ

| | |
|--|----|
| Graf 1: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinu soupravou Pierce TM BCA Protein Assay Kit..... | 74 |
| Graf 2: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinu soupravou Micro BCA TM Protein Assay Reagent Kit – metoda ve zkumavkách Eppendorf..... | 77 |
| Graf 3: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinu soupravou Micro BCA TM Protein Assay Reagent Kit – metoda v mikrotitrační destičce..... | 79 |
| Graf 4: Kinetika uvolňování adsorbovaného ovalbuminu z částic z CS/TPP vyjádřena pomocí kumulace hodnot koncentrací uvolněného ovalbuminu..... | 80 |
| Graf 5: Kinetika uvolňování zachyceného ovalbuminu a EGF z částic z CS/TPP vyjádřena pomocí kumulace hodnot koncentrací uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)... | 81 |
| Graf 6: Kinetika uvolňování adsorbovaného ovalbuminu z částic z CS/PCL vyjádřena pomocí kumulace hodnot koncentrací uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)..... | 87 |
| Graf 7: Porovnání vazby proteinů ovalbuminu a EGF na částice z CS/PCL a CS/TPP a (počet opakování: 3)..... | 88 |
| Graf 8: Porovnání kinetiky uvolňování proteinu adsorbovaného na částice a zachyceného ve struktuře částic vyjádřené pomocí kumulace procent uvolněného proteinu (počet opakování: 3)..... | 89 |

SEZNAM ROVNIC

| | |
|---|----|
| Rovnice 1: Účinnost vazby | 58 |
| Rovnice 2: Vazebná kapacita nosiče..... | 58 |
| Rovnice 3: Výpočet množství uvolněného ovalbuminu vyjádřeného v procentech | 60 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------|---|
| CD | znak CD, z angl. Cluster of Differentiation |
| CS | chitosan |
| DDS | system cíleného doručování léčiv, z angl. Drug Delivery System |
| DLS | dynamický rozptyl světla |
| EGF | epiteliální růstový faktor |
| EGFR | receptor epiteliálního růstového faktoru |
| ErbB | rodina receptorů, také známá jako EGF receptorová rodina nebo receptorová rodina typu I |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, z angl. Food Drug Administration |
| Hep-G2 | lidská buněčná linie pocházející z hepatocelulárního karcinomu |
| MAN | mannitol |
| MCF-7 | lidská buněčná linie pocházející z karcinomu prsou |
| MTT | test pro stanovení metabolické aktivity granulocytů |
| NTA | nanoparticle tracking analysis |
| PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu |
| PCL | poly- ϵ -kaprolakton |
| PDI | polydisperzní index |
| pI | izoelektrický bod |
| PEG | polyethylenglykol |
| pKa | disociační konstanta |
| PTFE | polytetrafluorethylen |
| RCF | relativní centrifugační síla |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| RES | retikuloendoteliální systém |
| TPP | tripolyfosfát sodný |
| TRE | trehalóza |
| UZ | ultrazvuk |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor |

ÚVOD

Standardní cesty podání léčiva v dnešní době nejsou schopny plnit mnoho pokročilých terapeutických potřeb, včetně cílení, široké použitelnosti na makromolekuly a aktivace ve správný čas a na správném místě v těle. Tato omezení vedla k rozsáhlému výzkumu zaměřenému na vývoj systémů cíleného doručování léčiv, které zvyšují terapeutickou účinnost a minimalizují nežádoucí vedlejší účinky léčiv. Systémy pro cílené doručování léčiv mohou být založeny na mikro-, submikro- a nanočásticích, nanovláčkách a hydrogelech. Tyto nosiče mohou být využity jako slizniční vakcíny, systémy pro hojení ran, transdermální náplasti, inhalátory, implantáty, nosiče pro genovou terapii a k léčbě malignit.

Nosiče mohou být připraveny z přírodních i syntetických polymerů. Velkou pozornost vědců si získal chitosan, což je přírodní polysacharid vyráběný deacetylací chitinu, který se nachází v cytoskeletu korýšů. Tento polymer je ideálním kandidátem pro nosičové systémy, protože je netoxický, biokompatibilní, biologicky odbouratelný, málo imunogenní, bioadhezivní snadno modifikovatelný, což umožňuje jeho kombinaci s velkým množstvím látek.

Cílem této práce bylo připravit biokompatibilní stabilní monodisperzní nosič z chitosanu s vysokou účinností adsorpce a schopností postupného uvolňování proteinů. I krátkodobé skladování nanočástic je problematické z hlediska jejich stability, proto je značná část této diplomové práce zaměřena na lyofilizaci částic a optimalizaci jejich podmínek. V práci byly zvoleny dva typy submikročástic, a to částice z chitosanu a tripolyfosfátu sodného a z chitosanu a polykprolaktinu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Systémy cíleného doručování léčiv

Léčiva se v současné době nejčastěji podávají perorální, intramuskulární a intravenózní cestou. Většina nízkomolekulárních léčiv se podává perorálně pomocí pilulek. Pilulky nabízejí pohodlí předem stanovených a odměřených dávek, přenositelnost, definovanou dobu dávkování a celkovou neinvazivní povahu podávání. Jsou však omezeny neschopností dodávat větší terapeutické molekuly, jako jsou proteiny. Injekce jsou narozdíl od pilulek schopny dodat makromolekuly, jako např. proteiny, ale způsob jejich podání je invazivní. Standardní cesty podání léčiva tedy nejsou schopny splnit řadu pokročilých terapeutických potřeb, včetně cíleného účinku, široké použitelnosti na makromolekuly a uvolnění ve správný čas a na správném místě v těle. Tato omezení zahájila rozsáhlý výzkum zaměřený na vývoj systémů cíleného doručování léčiv (nosičových systémů) [1].

Systém cíleného doručování léčiv je definován jako nosič, který umožňuje zavedení terapeutické látky do těla a je schopen specificky zacílit místo, kde se lék v těle uvolňuje a ovlivnit rychlost jeho uvolňování [2]. Nosičové systémy tedy chrání aktivní látku před rychlou clearance nebo degradací, zlepšují rozpustnost léčiva a jeho farmakokinetický profil. Tímto způsobem řízeného zacílení na místo působení je také významně snížena expozice léčiva vůči necílovým tkáním, stejně tak jeho toxicita a vedlejší účinky a je maximalizována jeho terapeutická účinnost [3].

Nosičové systémy mohou být využity jako slizniční vakcíny, systémy pro hojení ran, nosiče pro genovou terapii nebo k léčbě malignit [4]. Tyto systémy mohou mít podobu mikro-, submikro- a nanočástic, nanovláken, transdermálních náplastí, inhalátorů, implantátů, konjugátů protilátka-lék a dalších [1]. Jedním z největších problémů ale zůstává dodávání léčiv do určitých tkání, jako je například mozek. Překonání hematoencefalické bariéry pro doručení léku je nyní možné díky nosičovým systémům pro dodávání léčiv [4].

Velký zájem vědců přitahuje slizniční cesta podání léčiva (která může být nazální, pulmonální, orální a vaginální), protože umožňuje lokální dodávání aktivní látky do cílových tkání nebo do cirkulace neinvazivní cestou [5]. Slizniční vakcíny mohou účinně indukovat ochranné imunitní reakce proti patogenům v místě sliznice a indukovat antigenně specifické humorální a buňkami zprostředkované imunitní reakce v celém těle. Vhodnými nosičovými systémy pro slizniční vakcíny jsou polymerní submikročástice, které enkapsulují

nebo zachycují vakcinační antigeny a dodávají je do určitých buněk, díky jejich schopnosti rozpoznávat receptor pro buňky. [6].

Léčba chronických ran a velkých popálenin je nákladná, protože rány jsou náchylné k infekci a často vyžadují chirurgické ošetření [7]. Hlavním cílem péče o rány je uzavřít ránu, zabránit infekci a minimalizovat tvorbu jizvy. Je dobře známo, že růstové faktory a cytokiny hrají důležitou roli při hojení ran. Mnoho předchozích studií prokázalo různé přínosy exogenních růstových faktorů, jako jsou epidermální růstový faktor (EGF), destičkový růstový faktor a fibroblastový růstový faktor. Tyto produkty jsou však často drahé a vyžadují vícenásobné podávání, protože mají nízkou stabilitu a krátký poločas rozpadu. K překonání těchto problémů se výzkumníci zaměřili na vývoj růstových faktorů začleněných do nosičových systémů [8].

Genová terapie je technika používaná k nápravě vadných genů zapojených do nemocí. Je tedy slibným přístupem pro léčbu dědičných nebo získaných onemocnění, jako jsou těžká kombinovaná imunodeficience a rakovina. Klíčovým momentem této technologie je dopravit terapeutický gen do cílového místa a zajistit jeho včlenění do genomu pacienta. Pro tento účel jsou vyvíjeny různé nosičové systémy, včetně virem zprostředkovaných i nevirových technik přenosu genů. Z hlediska bezpečnosti je snaha od virových vektorů upustit a nahradit je nevirovými vektory, nicméně tyto systémy nejsou tak účinné [9]. Nevirové vektory prokázaly několik výhod pro přenos genů, včetně lepší biokompatibility, vyšší kapacity a schopnosti specificky upravovat své povrchy [10]. Mezi používané neviróvé nosiče patří kationtové lipozomy, micely, polymery a anorganické nanočástice [11].

Rakovina je jedním z nejglobálnějších problémů veřejného zdraví, který je spojen s vysokou úmrtností a s vysokými náklady na zdravotní péči. Nejčastěji používanou metodou pro léčbu rakoviny je chemoterapie. Ta zahrnuje použití agresivních léčiv, které napadají, jak rakovinové, tak zdravé buňky, což způsobuje závažné vedlejší účinky [12]. Nosičové systémy poskytují specifitu cílení na rakovinové buňky, schopnost překonat biologické bariéry nádoru a řízené uvolňování léčiv. Takto lze zvýšit terapeutické účinky a minimalizovat systémové vedlejší účinky chemoterapeutik [13]. Nejčastějším nástroji výzkumu rakoviny se staly nosičové systémy v podobě nanočástic, nanovláken, lipozomů a micel [12].

1.2. Biopolymery v cíleném doručování léčiv

Rozmanitost a všestrannost polymerních materiálů přitahuje vědecký zájem o jejich použití v různorodých oblastech [14]. Konkrétně farmaceutický výzkum je zaměřen na vývoj vehikul pro cílené doručování léčiv [15]. 20. století zaznamenalo pozoruhodné pokroky v syntéze polymerů a ve zlepšení vlastností biodegradabilních polymerních molekul [16].

Dle původu lze rozlišit dvě kategorie biopolymerů – přírodní a syntetické. Přírodní polymery mají vynikající biokompatibilitu, jsou plně obnovitelné a ve srovnání se syntetickými polymery vykazují menší toxicitu. [14].

1.2.1. Vlastnosti nosičových systémů

Kvalitní nosičové systémy jsou biokompatibilní, biologicky odbouratelné, netoxické a schopné dodávat účinné látky do místa působení [15]. V žádném případě nesmí vyvolávat stálý zánětlivý účinek, ani produkovat toxické rozkladné produkty. Nejdůležitější vlastností těchto polymerů, je jejich schopnost biodegradace, při níž vznikají látky, které při vylučování z těla nepoškozují tělo, ani životní prostředí. Většina polymerů je dostupná v přírodě, levná, snadno zpracovatelná a jednoduše chemicky modifikovatelná [16].

Donedávna byly za slibné nosiče léčiv považovány lipozomy, organické a anorganické nanočástice a hydrogely. Polymery je však převyšují ve vlastnostech, jako je udržitelnost, biokompatibilita a biologická rozložitelnost [15]. Přesto je aplikace těchto biologicky odbouratelných polymerů jako nosičů léčiv problematická s ohledem na kompatibilitu polymeru s tělesnými tkáněmi [16].

Velikost nosičových systémů

Velikost nosičových systémů přímo určuje plochu povrchu nosičových systémů, která je k dispozici pro interakci s biologickým prostředím. Je to tedy kritická fyzikálně-chemická vlastnost ovlivňující osud nanonosičů *in vivo* [17]. Každý orgán je schopen propustit nosičové systémy o jiné velikosti. Alveoly mohou zachytit částice o průměru několika mikrometrů. Nosičové systémy s velikostí 150 nm mohou vstupovat do mikroprostředí nádoru nebo do endotelu jater. Do srdeční tkáně jsou schopny vstoupit systémy o velikosti 100-150 nm. Menší částice o velikosti 20–100 nm mohou být distribuovány do kostní dřeně a sleziny. Glomerulus v ledvinách a Langerhansovy ostrůvky v pankreatu mají menší póry o průměru kolem 10–15 nm [18]. Částice s průměrem menším než 10 nm procházejí renální filtrací přes stěnu glomerulární kapiláry, nejsou reabsorbovány a jsou vyloučeny z těla [17].

Dalším způsobem zacílení nosičových systémů do cílových orgánů je prostřednictvím pohlcení fagocyty. Tyto buňky imunitního systému jsou schopny pohltit částice větší než 150 nm. Poté se hromadí v orgánech, zejména v játrech a slezině, kde jsou eliminovány. Tímto způsobem je aktivní látka z částic uvolněna z makrofágů a doručena do cílového orgánu [18].

Tvar nosičových systémů

Tvar nosičových systémů je klíčovou fyzikálně-chemickou vlastností nanonosičů, která do značné míry určuje osud *in vivo*. Na tvaru je závislá cesta podání léčiva. Zatímco sférické nanočástice jsou nejčastěji vyvíjené pro podání ústně, očně a na kůži, většina nesférických polymerních nosičových systémů je podávána žilně nebo inhalací. [19].

Studie naznačují že tvar nosičového systému hraje důležitou roli při jejich pohlcení makrofágy [17]. Elipsoidní částice k povrchu makrofágů adherují efektivněji, než sférické částice nebo zploštělé elipsoidy. Naopak zploštělé elipsoidní částice jsou lépe internalizovány než sférické nebo elipsoidní částice [20]. Nesférické částice mají také větší plochu povrchu, což vede k pevnější přilnavosti ke stěnám, ve srovnání s jejich sférickými protějšky [19]. Přestože většina současných nosičových systémů v rámci preklinických nebo klinických studií má kulový tvar, jedinečné vlastnosti nesférických nanonosičů mohou poskytnout nové možnosti systémů doručování léčiv [17].

Povrchový náboj nosičových systémů

Povrchový náboj ovlivňuje osud nosičových systémů v krevním řečišti. Vzhledem k přítomnosti různých negativně nabitých plazmatických proteinů, tj. globulinu a albuminu, jsou však kladně nabitě nosiče zachyceny a odstraněny retikuloendoteliálním systémem (RES) [17]. Kladně nabitě nanonosiče často způsobují nespecifickou cytotoxicitu vůči normálním buňkám, což má za následek významné nežádoucí účinky. Výhoda kladného náboje však spočívá v jeho významně vyšší afinitě k negativně nabitým buněčným membránám, což je nezbytné pro adsorpci na buňky a penetraci membránou [21].

Oproti tomu nosičové systémy s negativním nábojem se mohou vyhnout adsorpci proteinů a může tak být prodloužena jejich doba strávená v krevním oběhu. Vzhledem ke slabé interakci mezi aniontovými nanonosiči a záporně nabitými buněčnými membránami je buněčná internalizace nanonosičů často neefektivní. Tento problém je pojmenován také jako „dilema náboje“ [22].

Dále je tu rozpor mezi stabilitou v krevním oběhu a uvolněním léčiva. Jak bylo uvedeno výše, záporně nabitě nosičové systémy jsou stabilnější v krevním řečišti. Taková stabilita však může do značné míry ohrozit uvolňování terapeutik v místě působení, zvláště když jsou tato terapeutika vázána na nosičové systémy prostřednictvím elektrostatických interakcí [22]. Na druhou stranu u nosičových systémů s menší stabilitou může dojít k předčasně nežádoucímu uvolnění terapeutik do krevního řečiště, což způsobuje sníženou terapeutickou účinnost a závažné nežádoucí účinky [23].

Nelze jasně určit, zda jsou pro klinickou aplikaci výhodnější nosičové systémy s kladným, či záporným nábojem, proto je věnována stále větší pozornost výzkumu nanonosičů, které mají schopnost změny náboje [20].

Hydrofobicita

Hydrofobicita povrchu nosičového systému nejen ovlivňuje opsonizaci, ale také určuje farmakokinetiku a biodistribuci nanonosičů [17]. Na hydrofobní částice v těle jsou přednostně navázány plazmatické proteiny (proteinová korona) a poté jsou částice odstraněny pomocí RES [24]. V posledních desetiletích bylo zkoumáno mnoho strategií ke snížení nežádoucí clearance RES změnou povrchové hydrofóbnosti nanonosičů. Připojení hydrofilních polymerů, jako je polyethylenglykol (PEG), poloxamer, dextran, chitosan, poloxamin, poly(oxyethylen) a mnoho dalších, se ukázalo jako jeden z nejslibnějších přístupů. Velmi účinná byla PEGylace, o které bude pojednáno dále [17].

1.2.2. Přírodní biopolymery

Chitosan (CS), neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan je přírodní polysacharid získávaný deacetylací chitinu. Mezi jeho výrazné vlastnosti patří mukoadhezivita, hemokompatibilita a biodegradabilita. Také je netoxický a antioxidační, protinádorové a antimikrobiální vlastnosti [25].

Kyselina hyaluronová je makromolekulární lineární mukopolysacharid, který se skládá ze střídavě spojených dvou sacharidových jednotek kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu. Mezi její vlastnosti patří biokompatibilita, biologická rozložitelnost, vysoká elasticita [26]. Její špatná stabilita a krátký biologický poločas však omezují její použití. K překonání těchto problémů lze kyselinu hyaluronovou modifikovat [27]. Deriváty kyseliny hyaluronové jako nosiče léčiv proto přispívají k zahušťování léčiva, postupnému uvolňování,

transdermální absorpci a zlepšují zacílení léčiva její vazbou na transmembránový glykoprotein CD44. Tyto deriváty mají podobu gelů, filmů, nanočástic a mikročástic [26].

Alginát je polysacharid extrahovaný z hnědých mořských řas, včetně *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* a *Macrocystis pyrifera*. Alginát má schopnost tvořit hydrogel zesíťováním s ionty Ca^{2+} prostřednictvím procesu ionotropního gelovatění, obvykle při pH vyšším, než 6. Jako síťovadla se používají také ionty Ba^{2+} nebo Zn^{2+} . Alginát lze použít i ve formě dendrimerů, nanokrystalů, emulzí, lipozomů, pevných lipidových nanočástic, micel a polymerních nanočástic [28]. Alginát je používán v mnoha biomedicínských aplikacích kvůli jeho biokompatibilitě, nízké toxicitě a bohatým zdrojům. Tento polysacharid je atraktivní jako nosičový systém pro hojení ran, tkáňové inženýrství a podávání léčiv [29].

Agaróza je polysacharid, tvořený galaktózovými a 3,6-anhydrogalaktózovými podjednotkami. Má schopnost polymerovat do trojrozměrných hydrogelů už při pokojové teplotě. Tyto hydrogely jsou biokompatibilní a nejsou toxické. Díky své porézní struktuře a hydrofilní funkční skupině jsou schopny absorbovat vodu, mají tedy potenciál jako zásobník léčiva v transdermální náplasti. Nízká adsorpční schopnost hydrogelů pro hydrofobní molekuly léčiva, vede k jejich pomalému uvolňování [30]. Výzkum se také věnuje agarózovým skafoldům k podpoře diferenciaci kmenových buněk na chondrocyty [31].

Dextran je polysacharid s (1→6) α -glykosidovými vazbami mezi glukózovými monomery. Stupeň a povaha větvících jednotek jsou určeny bakteriálním kmenem produkujícím dextran. V přírodě je dextran produkován hlavně extracelulárně ze sacharózy několika bakteriemi mléčného kvašení [32]. Nanočástice založené na dextranu mají vynikající rozpustnost ve vodě, velkou vnitřní viskozitu a krátkou dobu skladování. Dextranové hydrogely lze využít k podpoře neovaskularizace a dermální regenerace u popálenin třetího stupně [33].

Celulóza je polysacharid, složený z podjednotek β -D-glukózy spojené (1→4) β -glykosidovou vazbou. Celulóza je užitečná v systémech cíleného doručování léčiv, kvůli svému vysokému poměru plochy k objemu a vysoké polymerizaci, díky které má vysokou kapacitu pro vazbu terapeutických činidel. Její vynikající vlastnosti, jako je vysoká mechanická pevnost, tuhost, biokompatibilita a obnovitelnost, jsou prospěšné pro navrhování pokročilých systémů pro dodávání léčiv, ve kterém hraje roli buď jako pomocná látka, nebo jako nosič. Nosičové systémy z celulózy lze rozdělit do tří skupin: celulózové nanokrystaly, celulózová nanovlákna a bakteriální celulóza. Celulóza má obrovský potenciál pro vývoj nosičových systémů [34].

Kolagen je bílkovina a vynikající materiál pro nosičové systémy, díky své vysoké biokompatibilitě. Systémy s řízeným uvolňováním léčiva, založené na kolagenu, se často používají pro regeneraci kůže a kostí, jejichž hlavní složkou je kolagen. Nejčastěji je využíván ve formě hydrogelů [35].

Želatina je přírodní, biokompatibilní bílkovina s nízkým imunogenním potenciálem, která má dlouhou historii aplikací v potravinářské, kosmetické, farmaceutické a lékařské oblasti. Fyzikální a chemické vlastnosti želatiny, zejména její hustota zesíťování, kinetika degradace a vlastnosti gelu z ní činí vhodný nosičový systém. V současné době je výzkum využití želatiny v oblasti medicíny zaměřen především na enkapsulaci a cílené dodávání látek, jako jsou protirakovinná léčiva, proteiny a vakcíny. Želatina také vylepšuje vlastnosti léčiv, např. terapeutické účinky, kinetické parametry degradace *in vivo* a snižuje jejich vedlejší účinky [36].

1.2.3. Syntetické biopolymery

Kyselina polymléčná je termoplastický polymer patřící do rodiny α -hydroxykyselin. Získává se jako produkt fermentace rostlinného škrobu z kukuřice, cukrové třtiny, brambor a řepy. Polymer je poté syntetizován přímou polykondenzací kyseliny mléčné nebo polymerací dimeru laktidu s otevřením kruhu a za použití vhodného katalyzátoru [37]. Kyselina polymléčná má formu mikročastic nebo nanočastic. Mikročastice lze snadno připravit, především technikami odpařování rozpouštědla v emulzi a po odstranění rozpouštědla ztvrdnou a enkapsulují hydrofilní nebo hydrofobní léčiva. Uvolňování léčiva je řízeno především difúzními mechanismy z nerozpustné matrice [38].

Polyethylenglykol (PEG) je polyether schválený pro různé aplikace v léčivech, potravinách a kosmetice. PEG si získal svou oblíbenost díky své vysoké flexibilitě struktury, biokompatibilitě, netoxicitě a vysoké rozpustnosti ve vodě [39]. Jednou z jeho vynikajících vlastností je takzvaný „stealth-effect“, objevený v roce 1990 na modifikovaných lipozomech, který popisuje schopnost chránit molekuly proti nespecifickým interakcím s krevními složkami (např. opsonizace). Kovalentní i nekovalentní vazba PEG na makromolekuly se nazývá PEGylace. Při dodávání léčiv může být PEGylace rozdělena do tří kategorií – připojení PEG k proteinům, k malým molekulám léčiv a k jiným polymerům, což je často spojeno s tvorbou nanonosičů. S připojením řetězců PEG se některé prospěšné vlastnosti tohoto polymeru přenášejí na farmakologicky aktivní sloučeniny, což může zlepšit dostupnost léčiv v biologických systémech, jejich farmakokinetiku a farmakodynamiku, ochranu před metabolickými enzymy, snížit imunogenicitu a zpomalit renální clearance. PEGylace má

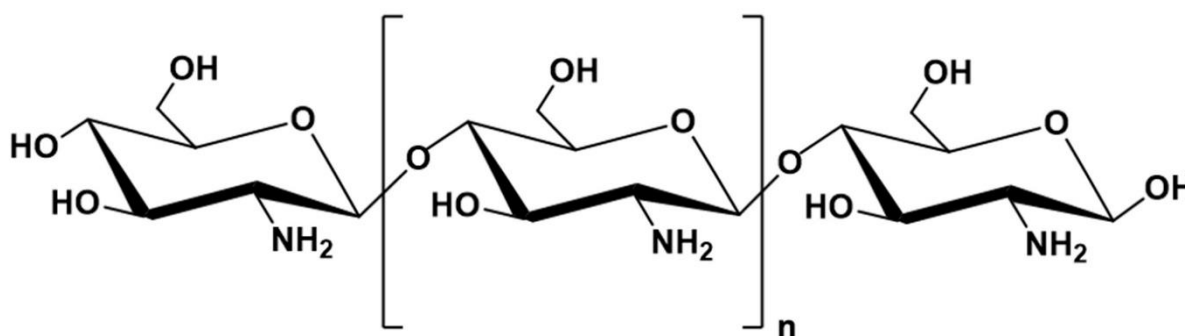
také dvě velké nevýhody. Při velkém množství má tento polymer tendenci se hromadit v orgánech, nebo může aktivovat imunitní odpověď v organismu v důsledku aktivace komplementu, což může vyústit v hypersenzitivní reakci a následně až v anafylaktický šok [40].

1.3. Nosičové systémy z chitosanu a tripolyfosfátu

1.3.1. Chitosan

Chitosan je přírodní amino-polysacharid, který vzniká deacetylací chitinu. Chitin je druhý nejrozšířenější polysacharid na zemi. Nejčastěji se vyskytuje jako složka exoskeletu korýšů, hmyzu a měkkýšů, nebo jako hlavní polymer buněčných stěn u některých hub a řas [41].

Chitosan obsahuje jednu primární aminoskupinu a dvě volné hydroxylové skupiny pro každou stavební jednotku C6 (Obr. 1). Díky volným aminoskupinám chitosan nese kladný náboj, proto reaguje s mnoha negativně nabitými molekulami [42]. Tyto skupiny z něj dělají dobrý chelatační ligand schopný vázat se na různé kovové ionty. Dále mohou být tyto aminoskupiny protonovány, což zajišťuje rozpustnost chitosanu ve zředěných kyselých roztocích. Chitosan je nerozpustný ve vodě a ve většině organických rozpouštědel, naopak je rozpustný ve většině vodných roztoků kyselin, jako je např. kyselina octová, citrónová, mravenčí, mléčná a další kyseliny, které mají pKa nižší, než 6,5 [43].



Obrázek 1: Chemická struktura chitosanu [44]

Vlastnosti chitosanu

Tento polymer je ideálním kandidátem pro nosičové systémy, protože je netoxický, biokompatibilní, biologicky odbouratelný, málo imunogenní a bioadhezivní. Navíc je jeho struktura podobná kolagenu, a proto může být použit k napodobení extracelulární matrix. Dále byly prokázány jeho bakteriostatické, fungistatické, hemostatické, hypocholesterolemické, protizánětlivé a antioxidační účinky. Jedna z nejdůležitějších vlastností

chitosanu, spočívá v jeho schopnosti přechodně otevřít těsná spojení epitelu, a to jak ve formě roztoku, tak nosiče. To vede ke zvýšení permeace makromolekul přes dobře organizované epitely, jako je nosní, střevní, oční, bukální a plicní. Další vlastností chitosanu, která zvyšuje zájem o tento polymer, je flexibilita jeho molekulární struktury, což usnadňuje chemické modifikace, které se provádějí za účelem dalšího zlepšení jeho vlastností, jako je rozpustnost nebo mukoadheze. Chitosan lze modifikovat vazbou na jeho hydroxylové nebo primárními aminové skupiny. Lze tak vytvořit chitosan methylovaný, thiolovaný, karboxylovaný, PEGylovaný a další [45].

Jednou z nejčastějších modifikací chitosanu je sulfatace, tedy zavedení skupiny SO_3^- do struktury chitosanu. Sulfatační činidla mohou být koncentrovaná kyselina sírová, oleum, anhydrid kyseliny sírové, oxid sírový, kyselina chlorsírová a další. Sulfatovaný chitosan je strukturně velmi podobný heparinu, proto má potenciál pro využití jako antikoagulační činidlo. Poloha SO_3^- skupiny ovlivňuje účinnost sulfatovaného chitosanu jako antikoagulancia, *N*-sulfatovaná forma chitosanu vykazovala 23% aktivitu heparinu a jeho *O*-sulfatovaná forma vykazovala 45% aktivitu heparinu *in vitro*. Sulfatace také zvyšuje antimikrobiální aktivitu chitosanu [46].

Molekulová hmotnost chitosanu je vyjádřena jako průměr všech molekul ve vzorku a je ovlivněna způsobem přípravy chitosanu [47]. Na základě molekulové hmotnosti lze chitosan rozdělit na chitosan s nízkou, střední a vysokou molekulovou hmotností [48]. Molekulová hmotnost komerčně dodávaného chitosanu se pohybuje mezi hodnotami 10 – 100 000 kDa [47]. Nejpoužívanější a nejjednodušší metodou, kterou lze měřit molekulovou hmotnost, je viskozimetrie. Dále lze tuto vlastnost určit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, osmometrie nebo rozptylu světla. Molekulová hmotnost chitosanu dále ovlivňuje jeho vlastnosti, jako je viskozita a rozpustnost [48].

Stupeň deacetylace je poměr glukosaminových jednotek k *N*-acetylglukosaminovým jednotkám a je ovlivňován podmínkami deacetylační reakce. Nejčastěji se pohybuje v rozmezí od 70 % do 95 % [47]. Stupeň deacetylace ovlivňuje mechanické vlastnosti chitosanu. Konkrétně vyšší stupeň deacetylace vykazuje vyšší čistotu a pomalejší degradaci. Stupeň deacetylace lze testovat pomocí spektroskopických metod, jako je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, rentgenová difrakce a nukleární magnetická rezonance [48].

V terapeutických aplikacích jsou omezení chitosanu způsobena jeho sníženou rozpustností a zvýšením stupněm bobtnání ve vodném prostředí. To následně vede k rychlému uvolňování léčiva. Například průchod chitosanu oblastí tlustého střeva je téměř neomezený kvůli jeho vysoké rozpustnosti v kyselých žaludečních tekutinách, což někdy vede k prudkému

uvolnění léku v žaludku. Kromě toho může spousta faktorů ovlivnit jeho vlastnosti, včetně nízké mechanické odolnosti, a neexistuje žádná kontrola velikosti jeho hydrogelových pórů a stupně zesíťování. Ačkoli se mnoho výzkumníků pokoušelo vyřešit tato omezení prostřednictvím různých výrobních metod, vlastnosti chitosanu nejsou zcela optimalizovány [44].

Formy chitosanu

Mikročástice a nanočástice jsou nejslibnější z aplikačních systémů pro slizniční dodávání léčiv a antigenů. Oba nosičové systémy díky své velikosti a povrchovém náboji chrání léčivo před enzymatickou degradací, zlepšují jejich penetraci přes slizniční epitel, zvyšují účinnost léčiva a snižují jeho toxicitu [5].

Chitosanová nanovlákna o velikostech od 1 do 1000 nm, mají velký potenciál v hojení ran. Chitosan má vysokou strukturní podobnost s glykosaminoglykany, které jsou hlavními složkami extracelulární matrice, což z něj činí nejvhodnějšího kandidáta přírodního polymeru pro matrice pro regeneraci tkání. Chitosan umožňuje vytvoření silné hemostatické zátky díky elektrostatickým interakcím mezi negativně nabitými membránami červených krvinek a jeho kladně nabitými aminoskupinami. Podporuje také intracelulární mobilizaci vápenatých iontů k usnadnění adheze krevních destiček, agregace a aktivace v místě poranění. Je známo, že chitosan snižuje oxidační stres a zvyšuje antioxidační aktivitu plazmy v lidském těle. Chitosanová nanovlákna podporují zmnožení neutrofilů a makrofágů v místě rány, a tak podporují zánět a reepitelizaci [49].

Hydrogely jsou materiály s trojrozměrným uspořádáním [50], které v nadbytečném množství vody bobtnají a tím pojmu velké množství vody [51], aniž by ztratily svou strukturu [50]. Charakteristickým rysem hydrogelů je schopnost měnit svůj objem a vlastnosti v reakci na vnější podněty, jako je pH, teplota, iontová síla a elektrické pole [51]. Jejich vysoký obsah vody, vysoká bezpečnost, nízká cena a vlastnosti pro uvolnění léčiv nebo tkáňovou adhezi vedly ke zvýšení použití v léčebných terapiích, zejména jako systémy dodávání léčiv pro léčbu nádorů [50]. Hlavní poptávka trhu s biomateriály je v oblastech kardiovaskulárních implantátů, ortopedických implantátů, intravaskulárních katetrů, katetrů močových cest, obvazů na rány, nitroočních čoček a biosenzorů. Biokompatibilitu materiálu pro tato využití lze zlepšit potažením materiálů hydrogely s obsahem chitosanu [51].

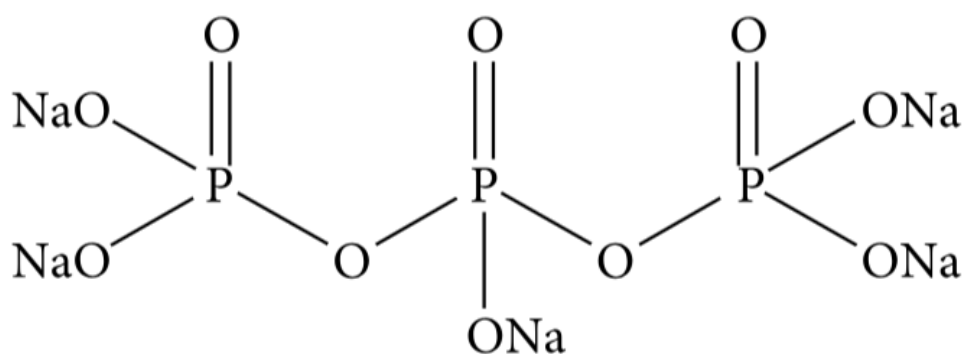
Z chitosanu je možné připravit mikrosférické částice různých velikostí. Kombinací mikrosfér a léčiv se lze vyhnout použití organických rozpouštědel a denaturaci antigenních proteinů. Chitosanové mikrosféry mají porézní strukturu, díky které jsou antigenní proteiny

nejen adsorbovány na povrchu, ale mohou být také zabudovány do vnitřního povrchu. Tyto mikrosféry mohou řídit uvolňování proteinových léčiv a zvyšovat absorpci antigenního proteinu [52].

1.3.2. Tripolyfosfát sodný

Tripolyfosfát sodný (TPP) (Obr. 2) je amorfní ve vodě rozpustný lineární polyfosforečnan [53], vyráběný neutralizací kyseliny fosforečné uhličitanem sodným [54]. Tripolyfosfát je klasifikován Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako obecně uznávaná bezpečná látka a spolu s dalšími polyfosfáty je schválen pro použití jako potravinářský doplněk. V USA a v Evropě ho nalezneme v široké škále potravin včetně ovoce, nápojů, masa a mořských plodů, a to samostatně, nebo v kombinaci s jinými fosfáty. Tripolyfosfát je na etiketách identifikován kódem potravinářské přídatné látky E451 a je schopen působit jako pufr, emulgátor a sekvestrant [55].

Ve farmaceutické technologii tripolyfosfát vzbudil zvláštní zájem jako složka nano-, submikro- a mikročásticových systémů chitosanu [55]. V roce 1989 Bodmeier et al. [56] poprvé popsali enkapsulaci léčiva ionotropní gelací v důsledku tvorby intermolekulárních a intramolekulárních příčných vazeb kladně nabitého chitosanu a polyaniontového tripolyfosfátu. Mezi hlavní výhody této metody patří jednoduchost, netoxičita a vývoj při pokojové teplotě a bez použití organických rozpouštědel [55].



Obrázek 2: Chemická struktura tripolyfosfátu sodného [57]

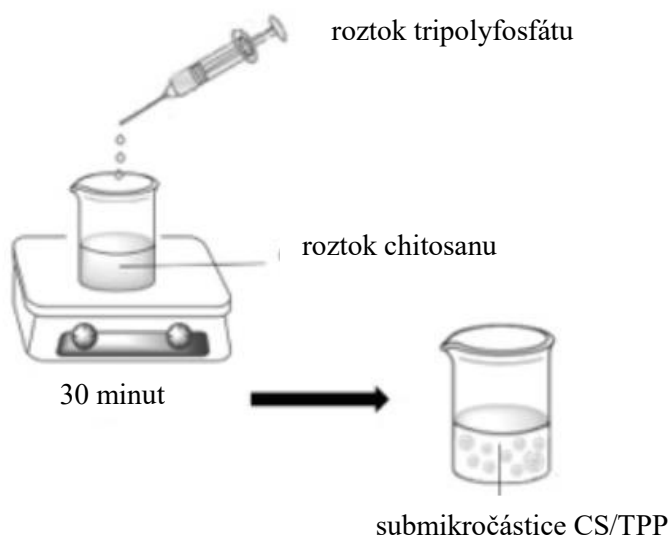
1.3.3. Ionotropní gelovatění

Ionotropní gelovatění biopolymerů si získalo oblibu vědců kvůli své schopnosti tvorby biokompatibilních systémů [58], jako jsou gelové kuličky, mikro-, submikro- a nanočástice, hydrogely a vlákna [59] pro použití v biomedicínské oblasti. Tato metoda využívá

elektrostatických interakcí, ke kterým dochází mezi polyionty a opačně nabitými specifickými síťovacími činidly v definovaném rozsahu koncentrace a/nebo pH. Ionotropní gelovatění vyžaduje mírné reakční podmínky, nicméně jemná regulace rychlosti gelovatění je náročný úkol, a to kvůli velmi rychlému samovolnému síťování mezi polymerem a síťovacím činidlem [58].

Chitosan gelovává přidáním tripolyfosfátu do jeho kyselého roztoku, po kapkách a za stálého míchání (Obr. 3). Oproti zdlouhavým postupům zesíťování je ionotropní gelovatění nenáročný proces [59]. Tripolyfosfát sodný je polyaniont a může interagovat pomocí elektrostatických sil s chitosanem, který působí jako kationt. V kyselých roztocích je jednoduchá vazba NH_2 molekuly chitosanu protonizována za vzniku NH_3^+ iontu, který interaguje s tripolyfosfátem za vzniku sférických částic [60]. Hustota zesíťování, krystalinita a hydrofilita zesíťovaného chitosanu umožňuje modulaci uvolňování léčiva a rozšiřuje rozsah jeho potenciálních aplikací při dodávání léčiv [61].

Chitosan může kromě tripolyfosfátu gelovatět i s dalšími činidly, jako je například níže uvedený polykaprolakton, nebo sírany. Borges et al. [62] připravili částice z chitosanu a síranu sodného potažené alginátem s enkapsulovaným rekombinantním povrchovým antigenem hepatitidy B pro orální vakcinaci [62].



Obrázek 3: Ionotropní gelovatění částic CS/TPP, upraveno dle [63]

1.3.4. Léčba malignit

Léčba malignit je v současné době založena na použití cytotoxických chemoterapeutických léčiv, jejichž účinek je navržen tak, aby přímo poškozoval DNA nebo nespecifickým způsobem inhiboval replikaci buněk. Tento mechanismus zapříčiňuje smrt, jak nádorových buněk, tak zdravých buněk. Neschopnost protinádorových léčiv adekvátně odlišit maligní buňky od zdravých představuje hlavní omezení v léčbě malignit [64].

Cannavà et al. [64] připravili nanočástice chitosanu a tripolyfosfátu potažené kyselinou hyaluronovou s enkapsulovaným vinblastinem. Kyselina hyaluronová je přírodní polymer, který je internalizován buňkami pomocí aktivního transportu transmembránovým glykoproteinem CD44. Tyto receptory jsou přítomny ve velkém množství buněk, jako jsou makrofágy a lymfocyty, ale jsou nadměrně exprimovány i v mnoha typech rakovinných buněk, a proto představují vhodný marker pro zacílení nádoru. Z tohoto důvodu mohou nosičové systémy, které vystavují kyselinu hyaluronovou na povrchu, zvýšit intracelulární akumulaci léčiva, konkrétně v rakovinných buňkách nadměrně exprimujících CD44. Tím se lze vyhnout vážným vedlejším účinkům souvisejícím s léčbou rakoviny. Vinblastin je alkaloidní lék, který vykazuje cytotoxickou aktivitu a zastavuje buněčný růst v metafázi vazbou na mikrotubulární proteiny mitotického vřetenka. Nejčastěji je používán jako farmaceutická strategie proti různým typům malignit, jako je leukémie, Hodgkinův lymfom, nemalobuněčný karcinom plic, rakovina prsu a další [64].

K vyhodnocení protirakovinného účinku těchto částic byly provedeny *in vitro* studie na buňkách lidské myeloidní leukémie K-562. Tato studie prokázala významnou schopnost nanočástic vázat se na CD44 transmembránové receptory exprimované na buněčných površích K-562. Nanočástice byly zcela internalizovány během 6 hodin a byla registrována 60% úmrtnost buněk. Byla tedy vyslovena hypotéza, že částice z CS/TPP potažené kyselinou hyaluronovou s enkapsulovaným vinblastinem mají protirakovinný účinek a vedlejší účinky léčiva byly v důsledku použití nanočástic sníženy [64].

1.3.5. Slizniční vakcíny

V současnosti existuje vakcinace proti více než 25 onemocnění [65]. Slizniční forma vakcíny je dostupná pouze proti pěti z nich, a to konkrétně proti břišnímu tyfu, choleře, obrně a rotavirům, které jsou podávány perorálně a proti chřipce, která je podávána ve formě nosního spreje [66]. Většina vakcín se podává intramuskulární cestou, která má určitá omezení. Obvykle mají svaly málo antigen prezentujících buněk, včetně dendritických buněk a makrofágů [67] a podání tou to cestou je bolestivé a invazivní.

Intranazální cesta pro podání vakcíny naopak nabízí několik výhod, jednou z nich je bezbolestná a neinvazivní cesta podání. Antigenem aktivované imunitní buňky v nosní lymfoidní tkáni se běžně také nacházejí i v lymfoidních tkání souvisejících s hrtanem a průduškou a uplatňují své obranné aktivity v těchto hlavních místech působení chřipkové infekce [68]. Makrofágy pohltnou vakcínu, během jejich migrace do lokálních lymfatických uzlin se stanou se zralými a prezentují antigen T buňkám pro indukci lokální imunitní odpovědi [69].

Chitosan je atraktivní prostředek pro intranazální podávání vakcíny. Díky jeho mukoadhezivním vlastnostem by mohla být překonána mukociliární clearance, čímž by byla prodloužena doba setrvání složky vakcíny na nosní sliznici. Chitosan podporuje paracelulární transport antigenu nosní sliznicí. Slouží jako imunopotenciační činidlo ke zvýšení imunogenicity a účinnosti vakcíny. Krom toho anotovaná data prokazují, že chitosanové nanočástice indukují jak slizniční, tak systémové imunitní reakce na zachycený antigen po intranazálním podání vakcíny [67].

V současnosti dostupné slizniční vakcíny proti chřipce jsou vyrobeny buď z inaktivovaných celých virů, nebo z virových podjednotek. Ve studii, kterou vedl Sawaengsak [67] byly nanočástice z chitosanu a tripolyfosfátu použity k enkapsulaci hemaglutininu pro štěpnou vakcínu proti chřipkovému viru. Technika ionotropního gelovatění je postup bez použití organického rozpouštědla a tepla, je tedy vhodný pro citlivé molekuly, jako je vakcinační chřipkový antigen hemaglutinin použitý v této studii [67].

Zavedené nanočástice z chitosanu a tripolyfosfátu s enkapsulovaným hemaglutininem v této studii měly kladný povrchový náboj 21,93 mV, což poukazovalo na vhodnou vlastnost pro intranazální aplikaci vakcíny. Kladně nabitě nanočástice byly navázány k záporně nabitým glykoproteinům hlenu a také k dendritům některých dendritických buněk, které vyčnívají přes paracelulární spojení epitelálních buněk. Byla prokázána vyšší imunogenicita těchto nanočástic s hemagutininem štěpené vakcíny, oproti štěpené vakcíně pouze s hemaglutininem. Dále byla prokázána vyšší účinnost ochrany proti nízkým i vysokým expozicím vysoce virulentním virem chřipky u vakcinačního antigenu enkapsulovaného v částicích, než u vakcíny s volným hemaglutininem [67].

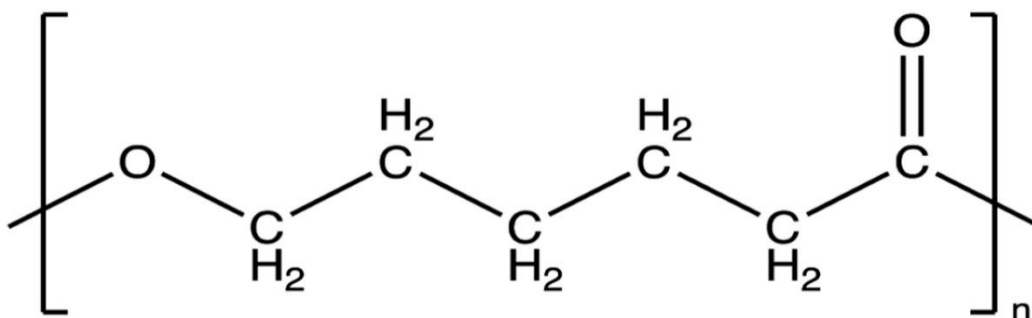
Celkové výsledky ukázaly, že nanočásticový nosič vyrobený v této studii je vhodným transportním vehikulem a adjuvans, které nejen zvýšilo imunogenicitu vakcíny proti chřipce, ale také zvýšilo ochranu zapouzdřeného antigenu vakcíny. Celkově vzato, nanočástice vynalezené v této studii jsou účinným a bezpečným transportním vehikulem a adjuvans pro testovanou vakcínu proti chřipce [67].

1.4. Nosičové systémy z chitosanu a polykaprolaktonu

1.4.1. Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL) je semikrystalický, vysoce elastomerní, hydrofobní a biodegradabilní polymer charakterizovaný skelným přechodem při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a bodem tání při $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Je syntetizován polymerací s otevřením kruhu ϵ -kaprolaktonu. FDA schválila Polykaprolakton jako biokompatibilní polymer pro výrobu implantovatelných zařízení. Jedná se o pomalu se rozkládající polymer, který obvykle vyžaduje 2 až 3 roky pro svou úplnou degradaci. Proto je často používán jako kopolymer s jinými degradovatelnými polymery, jako je např. polyester [70]. Ve zdravotnictví se PCL využívá v podobě nanočástic, nanovláken, filmů nebo skafoldů. Nanočástice a nanovlákná jsou zkoumány pro léčbu rakoviny a tenkovrstvé filmy byly původně vyvíjeny pro léčbu očních onemocnění [71]. Skafoldy z PCL se využívají pro rekonstrukci kostí, chrupavek i kostní tkáň [72]. V současné době se vývoj nosičových systému z PCL rozšiřuje na další aplikace, jako je systémová preexpoziční profylaxe HIV, antikoncepce a protizánětlivá léčba [71].

Práce s polykaprolaktonem s sebou nese jistá úskalí. Současné výrobní techniky nanonosičů založených na PCL, jmenovitě extrakce či odpařování emulzního rozpouštědla, separace fází a sušení rozprašováním bohužel dosahují nízkých účinností. Další překážkou je nutnost použití organických rozpouštědel jako je methylenchlorid, methanol, aceton, ethylacetát a další během procesu výroby nosičových systémů. Organické látky představují významné toxikologické problémy v klinické aplikaci, pokud nejsou z nosičových systémů odstraněny [72].



Obrázek 4: Chemická struktura polykaprolaktonu [70]

1.4.2. Nanočástice

Nanočástice z CS/PCL jsou zkoumány pro jejich velký potenciál nosičového systému léčiv při léčbě na rakoviny. Úspěšná byla enkapsulace léčiv, jako např. cisplatina, doxorubicin a gentamicin sulfát [72].

Většina v současnosti dostupných protirakovinných látek se v oběhu vyskytuje velmi krátkou dobu a má nedostatečnou rozpustnost ve vodě, proto je jejich terapeutická účinnost do určité míry omezena. Dosud se pro chemoterapii používají různé typy syntetických a přírodních protirakovinných léčiv. Z mnoha přírodních léčiv pro léčbu rakoviny přitahuje pozornost vědců kurkumin, protože může senzibilizovat rakovinné buňky a vyvolat apoptózu rakovinných buněk [73].

Zhou et al. [73] vyvinuli galaktosylované částice z CS/PCL s kurkuminem jako systém doručování léčiv pro léčbu nádorů jater. Nanočástice byly galaktosylovány z důvodu dosažení specifity cílené na hepatocyty. Tyto nosičové systémy byly testovány na buněčné nádorové linii HepG2. Bylo zjištěno, že protirakovinná aktivita kurkuminu zachyceného uvnitř nanočástic byla zachována. U tohoto léčiva byla prokázána pozoruhodně zvýšená schopnost indukovat apoptózu senzibilizovaných buněk HepG2. Po dobu 72 hodin byla rychlost apoptózy buněk HepG2 až šestkrát vyšší než při léčbě volným kurkuminem. Galaktosylované částice z CS/PCL se zachyceným kurkuminem jsou tedy vhodným nosičem pro léčbu nádorů jater [73].

1.4.3. Nanovlákná

Polykaprolaktonová nanovlákná vykazují kromě biokompatibility další vynikající vlastnosti, včetně mechanických vlastností a velké plochy. Jsou dobře transformovatelná do různých tvarů, dlouhodobě zadržují léčivo a umožňují kontrolu jeho uvolňování. Tyto vlastnosti jsou klíčové pro lokální dodávání protirakovinných látek k eliminaci recidivy nádorů a urychlení regeneraci tkání během nebo po léčbě a po resekci tumoru. Pro zlepšení vlastností nanovláken z PCL byly v různých studiích smíchány roztok PCL a roztok CS. U takto připravených nanovláken byly uvedeny zlepšené vlastnosti, jako např. jejich rychlejší biologická odbouratelnost, vyšší mukoadhezivní vlastnosti a snazší adsorpce k buňkám [74].

Ahmady et al. [74] připravili alginátové nanočástice s enkapsulovaným kapsaicinem. Dále byla metodou elektrostatického zvláknění vyrobena nanovlákná z CS/PCL v různých poměrech pro potažení nanočástic nanovláknem a byl zkoumán jejich potenciál jako nosičového systému pro léčbu rakoviny. U tohoto nosičového systému byla prokázána velmi vysoká hydrofilita a doba potřebná pro uvolnění léčiva byla čtyřikrát prodloužena. Účinky

těchto systémů byly testovány v podobě testu buněčné viability lidských dermálních fibroblastů a testu indukce apoptózy v buněčné linii karcinomu prsu MCF-7, které byly vyhodnoceny pomocí MTT testu. Výsledky těchto testů potvrdily biokompatibilitu fyziologické testované buněčné linie, stejně jako významnou cytotoxicitu proti testované rakovině buněčné linii. Alginátové částice s enkapsulovaným kapsaicinem potaženy CS/PCL nanovlákný mohou být použity jako dlouhodobě působící a lokálně cílený nosičový systém v léčbě rakoviny [74].

1.4.4. Skafoldy

Kromě cíleného dodávání léčiv je polykaprolaton také široce využíván v oblasti tkáňového inženýrství k poskytování specifické mikroarchitektury a *in vivo* mechanické podpory pro regeneraci poškozených buněk nebo tkání. V dnešní době je snaha zkombinovat funkce cíleného dodávání léčiv a skafoldů [72].

Díky nízké teplotě tání, mechanickým vlastnostem, biokompatibilitě a rozložitelnosti je PCL vhodná látka pro 3D tisk skafoldů. Jeho začlenění do tkáně je ovšem obtížné, proto je vhodná jeho kombinace s přírodními hydrogely, jako je například chitosan, kolagen, kyselina hyaluronová, alginát a další [75]. Bez této úpravy také může dojít ke slabé enkapsulaci nebo předčasnému uvolnění léčiva [76].

V dnešní době se pro lokální léčbu infekcí v kostech používají jako nosiče antibiotik mikrosféry polymetakrylátu, označované také jako kostní cement. Tento materiál uvolňuje léčivo velmi pomalu a není v těle odbouráván, tudíž je nutné ho chirurgicky odstranit po dvou až třech týdnech od implantace. López-González et al. [75] v preklinické studii navrhli nový hybridní 3D tištěný skafold na bázi hydrogelu z CS/PCL s enkapsulovaným antibiotikem vankomycinem jako nosičový systém pro lokální léčbu chronických kostních infekcí. Tyto skafoldy byly shledány jako biokompatibilní a bioaktivní. Po testu na mezenchymálních kmenových buňkách z lidské kostní dřeně, které nevykazovali žádné funkční změny, byla prokázána netoxicity tohoto nosičového systému. Zkoumané nosiče také vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, které jsou považovány za patogeny, jenž nejčastěji zapříčiňují kostní infekce. Vyvinutý nosičový systém by tedy mohl být užitečný pro dosažení řízeného a účinného lokálního uvolňování vankomycinu, ale k potvrzení jsou zapotřebí další preklinické studie *in vivo* na zvířecích modelech [75].

1.5. Vazba proteinů k nosičům

1.5.1. Adsorpce

Adsorpce je proces, kdy se molekula nebo iont přítomný v plynném nebo kapalném skupenství, přilne k povrchu pevné látky nebo kapaliny. Jde o povrchový proces, to znamená, že adsorbovaná látka nedifunduje do struktury povrchu [77].

Lze definovat dva druhy adsorpce, a to fyzikální a chemickou adsorpci. Během fyzikální adsorpce látka přilne k povrchu v důsledku Van der Waalsových sil, jedná se tedy o přitažlivé síly v důsledku slabých elektrostatických interakcí mezi molekulami. O chemickou adsorpci se jedná, pokud je látka na povrchu vázána chemickou vazbou, nejčastěji kovalentní vazbou [77].

Adsorpce proteinů na povrchy je v těle běžný jev, protože je často prvním krokem v mnoha biologických procesech, jako je např. transmembránová signalizace nebo kaskáda koagulace krve. Bohužel v těle dochází také k patologické adsorpci, např. adsorpce proteinu na různé povrchy může vyvolat adhezi částic, bakterií nebo buněk, které mohou podporovat zánětlivé kaskády, což může mít negativní dopad na zdraví pacienta [78]. Další nežádoucí adsorpce může nastat, pokud se proteiny adsorbují na implantát a vyvolávají imunitní reakce [79].

Podmínky, za kterých se provádějí experimenty s adsorpcí proteinů, mají rozhodující vliv na adsorpční chování. Parametry, které ovlivňují adsorpci nejvíce jsou teplota, pH, iontová síla a složení pufru [78].

Teplota má vliv jak na rovnovážný stav, tak na kinetiku adsorpce bílkovin. Při vyšších teplotách se množství adsorbovaného proteinu se zvyšuje. Při ohřátí směsi je zvýšena rychlost pohybu molekul, a tedy i proteinu, který se pak rychleji a častěji dostává do kontaktu s povrchem sorbentu [78]. Když jsou proteiny vystaveny zvýšeným teplotám, dochází ke změně jejich konformace. Tento jev je žádaný, pokud je při změně konformace obnaženo vazebné místo proteinu. Nicméně může dojít k nevratné konformační změně a tím i ke ztrátě specifických funkcí proteinu. Tato teplota přechodu se ukázala být důležitým ukazatelem tepelné stability proteinu a může se mezi proteiny lišit [79].

pH určuje elektrostatický stav proteinů. Pokud hodnota pH odpovídá izoelektrickému bodu (pI) proteinu, počet záporných a kladných nábojů je v rovnováze a molekula je neutrální. V tomto případě je vzájemné elektrostatické odpuzování proteinů minimalizováno, což zapříčiňuje vyšší hustotu adsorbovaných proteinů na povrchu [78]. Pokud je pH nižší, než je pI, proteiny jsou nabitý kladně. Pokud je pH vyšší, než je pI, proteiny jsou nabitý záporně

[80]. Pokud protein a substrát nesou opačné náboje, rychlost adsorpce je vysoká, protože jejich elektrostatická přitažlivost urychluje migraci směrem k povrchu [78].

1.5.2. Zachycení

Zachycení (z anglického entrapment) je metoda imobilizace, kdy jsou biomolekuly, či buňky zachyceny ve struktuře nosiče [81]. Tato metoda tedy vyžaduje syntézu polymerního nosiče v přítomnosti zachycovaného proteinu [82]. Protein je obklopen monomerními jednotkami nosiče, které v jeho přítomnosti polymerují a tím ho uzavírají do mřížky. Na stabilizaci proteinu v matrici se podílejí buď nekovalentní, nebo kovalentní vazby [83, str. 37].

Mezi nejpoužívanější způsoby zachycení patří ionotropní gelovatění, želatinace vyvolaná teplotou a organická polymerace [84]. Jako nosičové systémy jsou nejvhodnější gely, vlákna nebo mikrokapsle, které mohou být z alginátu, kolagenu, želatiny, polyakrylamidu, silikonového kaučuku, polyuretanu a dalších. Důležitou roli v procesu zachycení hraje porozita nosiče. Pokud jsou póry malé, zachycení proteinu je problematické, až nemožné a lze provést pouze adsorpci proteinu. Pokud jsou póry naopak příliš velké, protein je z částic uvolňován předčasně [81]. Mezi výhody zachycení v polymerní síti patří ochranu proteinu, který po zachycení není v přímém kontaktu s prostředím, zlepšení jeho stability a snížená šance na denaturaci a vyluhování [82]. Nevýhody tohoto typu imobilizace jsou omezení difuze, abraze nosného materiálu během používání nebo nízká nosnost matrice [81].

1.5.3. Enkapsulace

Enkapsulaci lze definovat jako technologii balení pevných, kapalných nebo plynných materiálů do tenkých polymerních povlaků, které tvoří malé částice zvané mikrokapsle [81]. Enkapsulované látky se volně vznášejí v prostoru jádra, ale jsou omezeny semipermeabilní membránou z polymerů, která je izoluje od prostředí [85]. Enkapsulovat lze mikroorganismy, živé buňky i multienzymové systémy [81]. Látka může být enkapsulována z mnoha důvodů, jako je např. ochrana reaktivního materiálu před jeho prostředím, bezpečná a pohodlná manipulace s materiály, které jsou toxické nebo škodlivé a z důvodu modifikace fyzikálních vlastností léčiva [86].

Správná volba materiálu mikrokapslí je velmi důležitá, protože ovlivňuje účinnost enkapsulace a stabilitu systému. Ideální materiál stěny mikrokapsle nesmí reagovat s jádrem, měl by mít schopnost udržet jádro uvnitř kapsle a měl by poskytnout maximální ochranu jádra před vlivy prostředí. Většina materiálů však nemá všechny tyto požadované vlastnosti a v běžné

praxi je nutno smíchat dva nebo více materiálů. Vhodné polymery pro enkapsulaci jsou škrob, celulóza, chitosan, alginát, želatina a další [85].

Nejdůležitějším parametrem pro enkapsulaci je porozita polymeru, protože pokud jsou póry moc velké, dojde k uvolnění jádra předčasně. Dále uvolňování ovlivňují faktory, jako je těkavost jádra, poměr mezi materiálem jádra a stěny, velikost částic a stupeň viskozity materiálu stěny [86].

V kinetických studiích uvolňování léčiv *in vitro* jsou nejčastěji zkoumány 2 mechanismy – difúze a eroze. Během procesu difúze je léčivo uvolňováno po koncentračním gradientu přímo přes síť polymeru, nebo prochází skrz póry částic, aniž by byla narušena jejich struktura. Proces eroze lze rozlišit na povrchovou a objemovou erozi. Během povrchové eroze dochází k degradaci povrchu polymeru, během které je uvolněno léčivo. Rychlost eroze je tedy větší než přítok vody do částic, což je vhodné pro dodávání léků, které nesmějí přijít do kontaktu s vodou. Kinetika povrchové eroze je snadno kontrolovatelná a reprodukovatelná. Během objemové eroze voda proniká do objemu polymeru, což má za následek homogenní degradaci celé částice. Rychlost, kterou voda proniká do jádra, je větší než rychlost eroze, proto je vysoce pravděpodobné, že polymery uvnitř hmoty budou hydrolyzovány. Objemová eroze je méně předvídatelná než povrchová eroze a nechrání léky kontaktem s vodou [87].

1.5.4. Epiteliální růstový faktor a hojení ran

Epiteliální růstový faktor (EGF) je polypeptid o velikosti 6 kDa sestávající se z 53 aminokyselinových zbytků a tří intramolekulárních disulfidových můstků [88]. Byl detekován v různých tělesných tekutinách, jako jsou sliny, mateřské mléko, plodová voda, moč, plazma a střevní tekutina. EGF hraje důležitou roli v regulaci buněčného růstu, migrace, apoptózy, proliferace a diferenciaci buněk [89]. Toho je docíleno navázáním EGF na jeho receptor EGFR na různých tkáních. EGFR, je transmembránová receptorová tyrosinkináza typu I. Po navázání EGF na receptor EGFR vznikají homo-, či heterodimery s jinými členy rodiny EGFR/ErbB. Takto jsou aktivovány vnitřní tyrosinkinázy, jejichž zakoncentrování vede k aktivaci signálních drah, které ovlivňují buněčnou proliferaci, diferenciaci a další výše uvedené biologické procesy. Regulace této signalizační dráhy je důležitá, jak v normálním vývoji, tak v reparaci patofyziologických stavů, jako jsou např. regenerace tkáně včetně hojení vředů či ran, regenerace tkáně po ischemickém-reperfučním poškození a další. Dále bylo prokázáno, že EGF s jinými růstovými faktory vyvolává synergické účinky na expanzi kmenových buněk. Toho lze docílit pomocí kombinované terapie nebo prostřednictvím EGF iniciované upregulace jiných

růstových faktorů, jako je vaskulární endoteliální růstový faktor, růstový faktor hepatocytů atd. EGF je také sám o sobě silný regulátor kmenových buněk v různých tkáních, jako jsou neurální kmenové buňky, zárodečné kmenové buňky, kmenové buňky myokardu, mezenchymální kmenové buňky, keratinocytové kmenové buňky a další [90].

Regenerace ran zůstává aktivním polem výzkumu v oblasti regenerace kůže a tkáňového inženýrství. Kůže je největší fyzickou bariérou proti vnějším silám, k jejíž poraněním může dojít v důsledku náhodných poranění, resekce nádoru, diabetických vředů a dalších. Poranění kůže vyžadují rychlou léčbu a mohou zvýšit pravděpodobnost infekce, invalidity a smrti, protože exponovaná podkožní tkáň je citlivá na mikrobiální kolonizaci. Zpoždění hojení zvyšuje potřebu dalších léčebných opatření. Během léčby rány je vyžadována častá výměna obvazů, aby se pacienti vyhnuli infekci, jejíž riziko přetrvává, dokud kůže neobnoví svou bariérovou funkci. V reakci na chronické trauma mohou různá poškození, včetně stresu, špatného průtoku krve a otoků, bránit hojení [91].

Hojení kožních ran začíná bezprostředně po poranění a skládá se z několika překrývajících se fází: hemostáza, zánět, proliferace a remodelace. Tyto fáze probíhají díky dobře organizované interakci mezi různými typy buněk, včetně krevních destiček, keratinocytů, fibroblastů, endoteliálních buněk a makrofágů [92]. Keratinocyty, hlavní buněčná složka epidermis, jsou rozhodující pro reepitelizaci rány. Za normálních podmínek je kožní systém tvořen několika vrstvami keratinocytů, které vytváří fyzickou bariéru mezi prostředím a organismem, a tím chrání tělo před vnějšími činiteli a patogeny. Jakmile dojde k poranění, keratinocyty podstoupí procesy migrace, proliferace a diferenciaci, aby byla zachována integrita kožní bariéry. Mezi stimuly, které podněcují aktivaci keratinocytů, patří růstové faktory včetně EGF, cytokiny a chemokiny [92]. Kromě toho EGF nejen podporuje tvorbu granulační tkáně, ale také stimuluje motilitu fibroblastů, která indukuje adhezivní vlastnosti mezi buňkami, čímž vylepšuje proces časného uzavření rány [93]. Epidermální růstový faktor je jedním z nejlépe charakterizovaných růstových faktorů při hojení kožních ran [92].

V procesu hojení akutních ran je EGF sekretován hlavně krevními destičkami, makrofágy a fibroblasty a je zvýšena jeho produkce během krátké doby po poranění. [92]. Naopak v procesu hojení chronických ran nastává snížení produkce EGF a jeho receptoru. Jedním z důvodů je chybná lokalizace EGFR v cytoplasmě keratinocytů namísto v jejich membráně. To pravděpodobně přispívá k inhibici reepitelizace [90].

Účinek EGF na hojení ran je závislý na koncentraci. Bylo prokázáno, že při vyšších dávkách EGF je dosaženo vyšší rychlosti hojení. Vyšší dávky EGF však vyvolávají otázky bezpečnosti, protože opakovaná aplikace EGF může vyvolat hyperplazii a hypertrofii kožních

keratinocytů a fibroblastů, a také podpořit angiogenezi, což může zejména u imunosuprimovaných pacientů predisponovat k rozvoji rakoviny. Dosavadní klinické údaje však ukázaly, že léčba EGF je dobře tolerována a nejsou pozorovány žádné významné nežádoucí účinky [90].

Podávání EGF jako léku s sebou nese dva velké problémy. Prvním z nich je jeho vysoká cena. Druhým je krátký poločas rozpadu a nízká stabilita EGF, proto je pro účinnou léčbu vyžadováno vícenásobné podání. K překonání těchto nevýhod se výzkumníci zaměřili na vývoj nosičových systémů s adsorbovanými, enkapsulovanými či zachycenými růstovými faktory [8].

Li et al. [91] připravili nanočástice z CS/TPP s kurkuminem, na které byl adsorbován EGF. Hydrodynamická velikost částic byla 210 nm, polydisperzní index byl 0,21, zeta potenciál odpovídal hodnotě 12,82 mV a účinnost adsorpce proteinu byla 35,94 %. EGF navázaný na submikročástečích vykazoval vynikající proliferativní účinky pro fibroblasty a v rozmezí koncentrací 0–500 µg/ml vůči fibroblastům nevykazoval toxicitu. Antibakteriální aktivita kurkuminu vůči kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* byla zachována. Připravený systém byl tedy bezpečný, netoxický a vykazoval antibakteriální vlastnosti. Na potkaním modelu byly chirurgicky vytvořeny rány o průměru 2,5 cm do hloubky 2 mm, tedy až do *dermis*. Na rány byly jednou denně nástřikem aplikovány 2 ml nanočástic s 0,8 mg kurkuminu a 2 µg EGF. Dvanáctý den této léčby byly rány uzavřeny z 98 %. Histologická analýza také potvrdila změny v expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, vyšší úroveň angiogeneze, sníženou infiltraci zánětlivých buněk a zvýšené ukládání kolagenu, což urychlilo reepitelizaci. Připravené nanočástice byly bezpečné a netoxické s prokázanými léčebnými účinky a měly potenciál pro hojení a léčbu kožních ran způsobených resekci nádoru, cukrovkou i náhodnými poraněními [91].

1.6. Charakterizace submikročásteč

1.6.1. Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla, také známý jako fotonová korelační spektroskopie, umožňuje neinvazivní a nedestruktivní detekci částic ve velikostním rozmezí od nanometrů až po mikrometr v průměru. Je to široce rozšířená technika v biologických vědách a je používána pro posouzení velikosti částic [94].

Částice, emulze a molekuly v suspenzi podléhají Brownovu pohybu. Vlivem tepelného pohybu dochází ke srážkám částic a jejich směr a síla jsou náhodné. Během měření jsou částice

ozářeny laserem pod určitým úhlem a je detekováno světlo rozptýlené částicemi. Intenzita rozptýleného světla však kolísá v důsledku Brownova pohybu částic. Čím menší částice je, tím rychleji se pohybuje a tím rychleji kolísá intenzita rozptýleného světla. Analýza těchto fluktuací intenzity poskytuje údaj o rychlosti Brownova pohybu a tím i velikosti částic [95]. Pomocí této metody lze měřit hydrodynamickou velikost, polydisperzní index a zeta potenciál.

1.6.2. Hydrodynamická velikost

Velikost a tvar částic hrají důležitou roli při přenosu genů do buněk a také významně ovlivňují distribuci částic v těle. Obecně platí, že malá velikost a velký povrch částic může vést k jejich agregaci, což ztěžuje manipulaci s částicemi v kapalné i suché formě a také vede k omezenému naplnění léčiva a jeho prudkému uvolňování. Tyto praktické problémy musí být překonány dříve, než mohou být částice klinicky použity [96].

Velikost částic lze měřit několika technikami. Metodou dynamického rozptylu světla je měřena hydrodynamická velikost (DLS), což je hydrodynamický průměr částic, který odpovídá průměru koule o stejném difuzním koeficientu jako má měřená částice. DLS prezentuje zdánlivou velikost dynamické hydratované částice zahrnující jak rozpouštědlové, tak tvarové efekty [97].

Na podobném principu jako DLS pracuje metoda „nanoparticle tracking analysis“ (NTA). Tato technika kombinuje laserovou mikroskopii s rozptylem světla s kamerou, která umožňuje vizualizaci a záznam nanočástic v suspenzi. Software NTA je pak schopen identifikovat a sledovat jednotlivé nanočástice pohybující se Brownovým pohybem a spojuje pohyb s velikostí částic podle Stokes-Einsteinovy rovnice [98].

Velikost částice také lze měřit pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Elektronový mikroskop generuje paprsek elektronů, které dopadají na částice, jsou jimi rozptýleny a následně zachyceny detektorem. Tato metoda poskytuje detailní 3D obraz povrchu částic [99]. Oproti DLS velikost měřená pomocí SEM vyjadřuje průměr ekvivalentní projektované ploše částic, tedy bez jejich hydratačního obalu [100].

Průměrná DLS částic z CS/TPP závisí na dvou základních faktorech – poměru CS:TPP a jejich bobtnacích vlastnostech. Mezi další parametry ovlivňující velikost částic patří rychlost míchání, koncentrace CS a TPP, stupeň deacetylace CS, iontová síla teplota a pH. [101].

1.6.3. Polydisperzní index

Úspěšná výroba bezpečných, stabilních a účinných nosičových systémů vyžaduje přípravu homogenních populací o určité velikosti. Po přípravě musí být nanonosiče charakterizovány, aby byla zajištěna jejich účinnost pro aplikace *in vitro* a *in vivo*. Termín polydisperzita se používá k popisu stupně nestejnomyšlosti distribuce velikosti částic [18]. Pokud všechny částice tvořící nosičový systém mají stejnou nebo přibližně stejnou velikost, systém je označován jako monodisperzní. Pokud velikost částic, které tvoří nosičový systém, je různá, systém je označován jako polydisperzní [102].

Parametr používaný k definici rozsahu velikostí systémů nanonosičů se nazývá polydisperzní index (PDI). PDI je číslo vypočítané z dvouparametrového přizpůsobení korelačním datům (kumulativní analýzou). Tento index je bezrozměrný a je škálován tak, že hodnoty menší než 0,05 znázorňují vysoce monodisperzní systémy a hodnoty PDI větší než 0,7 ukazují, že vzorek má velmi širokou distribuci velikosti částic [18].

1.6.4. Zeta potenciál

Zeta potenciál je povrchový náboj částic, který výrazně ovlivňuje jejich stabilitu v suspenzi prostřednictvím elektronického odpuzování mezi částicemi. Pokud mají všechny částice v médiu velký negativní nebo pozitivní zeta potenciál, pak budou mít tendenci se navzájem odpuzovat a nebudou mít tendenci se shlukovat. Zeta potenciál je nejvíce ovlivňován molekulovou hmotností chitosanu, koncentrací chitosanu a rychlostí míchání částic při jejich přípravě. Obecně jsou částice považovány za stabilní, pokud je jejich zeta potenciál vyšší než +30 mV nebo nižší než -30 mV [103].

Zeta potenciál má také vnitřní hodnotu v biologických systémech. [104]. Jak již bylo zmíněno výše, povrchový náboj má vliv na opsonizaci, stabilitu nosičových systémů v oběhu i schopnosti částic proniknout do cílových buněk.

1.7. Podmínky pro skladování nosičových systémů

Stabilita částic je důležitá pro jejich potenciální použití jako nosičové systémy. Proto je zásadní pochopení vztahů mezi podmínkami skladování a stabilitou [105].

Slováková et al. [106] sledovali změny DLS a PDI částic připravených z CS/TPP v poměru 2:1 při skladování 14 dnů při 4 °C. Hodnoty DLS velikosti se pohybovaly okolo 225 nm a k významným změnám ani k tvorbě velkých agregátů nedošlo. PDI vzrostlo z hodnoty 0,4 na hodnotu 0,6, což značilo rozšíření velikosti distribuce částic v průběhu času. Tyto podmínky skladování částic v suspenzi nezaručují zachování vlastností částic [106].

1.7.1. Vliv teploty na skladování

Morris et al. [105] připravili částice z CS/TPP v poměru 6:1 v 0,2 M acetátovém pufru o pH 4,3. Po přípravě byla DLS částic v rozmezí 90–120 nm. DLS byla znovu měřena po 12 měsících skladování při teplotách 4 °C, 25 °C a 40 °C. Teplota 40 °C byla pro skladování naprosto nevhodná. Pokles velikosti nanočástic byl patrný již po 1 měsíci skladování a po 6 měsících nanočástice v podstatě zmizely – došlo k jejich rozpadu. To bylo pravděpodobně způsobeno poklesem molární hmotnosti chitosanu v důsledku hydrolyzy způsobující štěpení jeho polymerních řetězců. PDI byl 1,4 – 7,6 nebo nad mezí detekce, systém byl tedy velice polydisperzní. Při 4 °C a 25 °C byla DLS 110 ± 40 nm nanočástic podobná jako u čerstvě připravených vzorků. Směrodatná odchylka byla vyšší a PDI byl 1,2 – 1,4, systém má tedy velmi širokou distribuci velikosti částic, a proto je nevhodný pro klinické použití. V této studii ovšem nebyly měřeny další parametry, jako zeta potenciál nebo tvar částic, ovšem bylo prokázáno, že acetátový pufr není vhodný pro skladování submikročásteček v žádné z výše zkoumaných teplot [105].

1.7.2. Vliv pH na skladování

Tsai et al. [107] skladovali submikročástice ve fosfátovém pufru po dobu 97 dnů. Částice byly z CS/TPP připraveny v poměru 5:2 o průměrné velikosti 306,5 nm a byly ultrazvukovány výkonem 29 W na 2 mg/mn suspenze po dobu 4 minut při 25 °C. Nejprve bylo zkoumáno pH pufru nejpříznivější pro skladování [107].

Do suspenze částic byl přidán pětinasobný objem fosfátového pufru o pH 5,5; 7,5 a 9,9. Po jedné hodině při 25 °C se však velikosti zmenšily na 160,6 nm pro pH 5,5, na 127,8 nm pro pH 7,5 a na 111,2 nm pro pH 9,9. Velikost nanočástic byla nižší při vyšším pH suspenzí. Tento jev byl způsoben polykationtovou vlastností CS. V roztocích s nižším pH se molekuly CS prodlužují díky vyšší protonaci, a to vede ke zvýšení DLS nanočástic. Naopak v roztocích s vyšším pH se molekula CS zmenšuje v důsledku nižší protonace a tvoří více inter-či intramolekulárních vodíkových vazeb, což vede k menší DLS nanočástic. Pro skladování byl zvolen fosfátový pufr o pH 7,5 [107].

Částice byly sledovány po dobu 97 dnů. Změny velikosti nanočástic byly klasifikovány do fází okamžité změny, období stárnutí částic a období bobtnání a agregace. Ve fázi okamžité změny částic došlo ke zmenšení částic v důsledku jejich přenesení do fosfátového pufru a s tím spojenými, výše zmíněnými procesy. Časové rozpětí do ukončení okamžité fáze záviselo na počáteční velikosti nanočástice. Čím větší částice byly, tím déle tato fáze trvala a pohybovala se v rozmezí hodin. Fáze stárnutí začala v momentě počátku změny

intermolekulárních vazeb a možnou ztrátou kapaliny z částic. Změna velikosti částic v této fázi byla minimální a částice do ní přešly během prvních deseti dní. Ve fázi bobtnání a agregace je bobtnání způsobeno přítokem vody do nanočástic v důsledku osmotických jevů. Bobtnání může vést až k prasknutí polymerní matrice částic. Agregace je způsobena Brownovým pohybem, který zesiluje kolizi mezi nanočásticemi a usnadňuje adhezi a následně agregaci, čímž je zvětšena velikost nanočástic při dlouhodobém skladování. [107]. Fosfátový pufr tedy není vhodný pro skladování nanočástic.

1.7.3. Lyofilizace

Při vývoji sterilních farmaceutických léčivých produktů je důležité udržovat trvanlivost léčivého produktu. Látky, které tvoří nestabilní vodné nebo organické roztoky, je nutné převést na pevnou látku použitím vhodných sušících technik, aby bylo možné skladovat tyto látky po delší dobu. K tomu slouží metoda zvaná lyofilizace. Téměř 50 % aktuálně prodávaných biofarmaceutických produktů na seznamech schválených FDA a Evropskou agenturou pro léčivé přípravky využívá lyofilizaci jako výrobní proces. Lyofilizace má totiž potenciál inhibovat nebo redukovat fyzikální a chemickou degradaci systému [108].

Lyofilizace je metoda, která dlouhodobě zlepšuje stabilitu léčivých přípravků přeměnou roztoku nestabilních molekul na pevnou látku procesem sublimace. Proces sublimace zahrnuje přeměnu zmrzlého ledu přímo na páry, aniž by procházel kapalnou fází. K tomu dochází při teplotě a tlaku pod trojným bodem vody [108].

Proces lyofilizace se skládá ze tří částí – zamrazení, primární (neboli sublimační) sušení a sekundární (neboli desorpční) sušení. Nejprve je směs nutno rychle zamrazit na teploty okolo -50 až -100 °C, v čase 12 až 35 hodin. Rychlé zmrazení snižuje tepelnou denaturaci léčiv a zabraňuje pění během vakuového sušení [109]. Je tedy zásadním krokem celého lyofilizačního procesu, protože může ovlivnit kvalitu konečného produktu změnou jeho integrálních vlastností [110].

Při primárním (sublimačním) sušení je postupně zvyšována teplota a snižován tlak v lyofilizátoru [109]. V tomto procesu je teplo přenášeno z police přes lyofilizační vialku do zmrazeného roztoku. Led sublimuje a vytvořená vodní pára prochází vysušenou částí produktu na povrch vzorku, poté je přenesena přes komoru do kondenzátoru. Na konci sublimačního kroku je vytvořena porézní zátka, jejíž póry odpovídají velikosti, předešlých ledových krystalů [111]. Produkt je tak dehydratován a je odstraněno 90-95 % vody. [109] K tomuto procesu dochází v při extrémně nízkých tlacích. Teplota se udržuje obvykle mezi -40 až -20 °C, aby se zabránilo strukturálním změnám ve složení způsobeným nadměrným

teplem. Je důležité poznamenat, že jev sublimace ovlivňuje pouze zmrzlou vodu, zatímco nezmrzlé kapaliny v matrici vzorku zůstávají nedotčeny [110].

Po sublimačním vysušení na povrchu zdánlivě suché struktury zůstává zbytková vlhkost. Ta je odstraněna sekundárním (desorpčním) sušením při vyšší teplotě než je teplota primárního sušení [109] a může dosahovat i hodnot vyšších, než je 0 °C [110]. Zbývající vlhkost lyofilizátu po skončení tohoto kroku je 0,5-3 %. Lyofilizáty je nutno pro udržení nízké vlhkosti uzavřít v lyofilizační vialce pomocí špuntů a víčka nebo vakuově zabalit. Nejčastěji jsou lyofilizáty skladovány při pokojové nebo chladničkové teplotě [109].

Kvalitní lyofilizát by měl mít nízký obsah zbytkové vlhkosti, měl by být dlouhodobě stabilní a neměly by být narušeny fyzikální a chemické vlastnosti původního produktu. Částice po lyofilizaci musí být snadno resuspendovány a musí zachovávat aktivitu léčiva. Pro dosažení všech těchto cílů je zásadní optimalizovat výrobní proces léčiva a zaměřit se na tři hlavní aspekty, které se podílejí na stabilitě částic: složení nanočástic, proces lyofilizace a podmínky skladování lyofilizátů [112].

Lyofilizace je také jednou z běžných sušících technik, přednostně používaná pro stabilizaci biologických makromolekul včetně proteinů a peptidů. Biomakromolekuly jsou citlivější, než nízkomolekulární léčiva a jejich lyofilizační proces vyžaduje zvláštní pozornost kvůli udržení biologické aktivity. Důležitý rozdíl mezi lyofilizací nízkomolekulárních léčiv a biomakromolekul je citlivost těchto látek na stres vyvolaný lyofilizačním procesem, který může být mezifázový a dehydratační. Kroky zmrazení a sušení lyofilizačního procesu také mohou způsobit rozvinutí a změnu struktury proteinu [108].

Lyofilizace má však určité nevýhody. Během tohoto procesu může docházet k agregaci v důsledku silných inter- a intramolekulárních vodíkových vazeb nebo fúzi nanočástic a tvorba ledových krystalů může vést k jejich destabilizaci. To se projeví na DLS a PDI nanočástic, které jsou po lyofilizaci vyšší. Tento jev byl zaznamenán v pracích [111] a [113]. Naopak studie [96] toto tvrzení vyvrací, zkoumané částice měly po lyofilizaci výrazně menší DLS i PDI. Tyto rozdíly ve studiích lze přičíst různým faktorům, jako je čistota chitosanu, stupeň deacetylace a reakční poměry látek. Na výsledek má dále vliv předchozí úprava roztoků, např. dialýza pro odstranění nečistot, či volných chemikálií a následující úprava suspenzí částic např. centrifugace a filtrace. Těmito metodami lze předejít tvorbě agregátů nebo vzniklé agregáty odstranit z roztoků [114].

Faktory ovlivňující lyofilizaci

Objem vzorku je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících lyofilizaci. Je známo, že pevná látka po zamrazení zaujímá větší plochu, než když byla ve fázi kapalné, proto by objem vzorku bez použití kryoprotektiv neměl přesáhnout více, než 50 % kapacity nádoby. Nižší objem vzorku zkracuje dobu zamrazení, jelikož při nižším objemu má vzorek větší plochu, která je vystavena zamrazení a sušení. V důsledku toho je účinnost lyofilizačního procesu výrazně vylepšena [110].

Nejčastěji se k lyofilizaci využívají vialky ze skla, kvůli jejich vynikající chemické odolnosti. Základní složení skleněných vialek je 80 % oxidu křemičitého, 13 % oxidu boritého, 4 % oxidu sodného a 3 % ostatních složek. Skleněné vialky určené pro použití při lyofilizaci by měly mít nízký expanzní koeficient s rovnoměrnou tloušťkou dna a bočních ploch. [115].

Stav naplnění lyofilizátoru je také důležitou proměnnou procesu během vývoje procesu lyofilizace a zvětšování měřítka. Pokud je lyofilizátor plný, může dojít ke ztrátě regulace tlaku a snížení teploty v lyofilizátoru. Pokud je lyofilizátor naplněn málo, může dojít k narušení toku odsávané vodní páry. Pokud jsou vialky rozmístěné po obvodu, dochází k přenosu tepla ze stěn lyofilizátoru, tím je zvýšena teplota produktu a doba lyofilizace je zkrácena [115].

Kryoprotektiva

Jednou z největších překážek, se kterými se během lyofilizace setkáváme, je tvorba velkých ledových krystalů. Bez použití kryoprotektiv jsou ledové krystaly velké a ostré, a mechanicky narušují nanočástice a navázaný protein. Kryoprotektiva pomáhají předcházet těmto škodlivým dopadům na produkt několika způsoby, jako je např. omezení tvorby ledových jader (která slouží jako stavební kameny ledových krystalů), tvorba malých ledových krystalů a zpomalení rychlosti, kterou se ledové krystaly tvoří [110].

Dalším problémem lyofilizace nanočástic je tvorba agregátů. Pokud jsou nanočástice lyofilizovány bez jakéhokoli kryoprotektivního činidla, tvorba agregátů může značně bránit jejich redisperzi, a tím ovlivnit jejich velikost [116]. Dále mohou kryoprotektiva odstranit přebytečnou vlhkost nebo zvýšit celkový objem vzorku [110].

Důležitým parametrem pro úspěšnou lyofilizaci je koncentrace kryoprotektiva. Rampino et al. [5] uvedli, že koncentrace kryoprotektiva pro lyofilizaci suspenzí částic by měla dosahovat alespoň 5 % w/v. Při nižších koncentracích je redisperze částic problematická. Naopak použití kryoprotektiv o vysokých koncentracích může nést jisté problémy. Abdelwahed

et al. [111] uvedli, že sacharidová kryoprotektiva o koncentraci 25 % w/v a vyšší nejsou schopny stabilizovat částice.

Kryoprotektiva mohou být kategorizovány jako sacharidy (např. glukóza, sacharóza, fruktóza, maltóza, manóza a trehalóza) nebo alkoholy (např. mannitol, glycerol), polymery (např. dextran, hydroxyethylškrob a pepton), sulfoxidy a amidy (např. dimethylsulfoxid, acetamid a formamid) nebo aminy (např. prolin, glutamin) [110].

V současné době existuje velké množství polysacharidů a jejich oligosacharidy, které byly úspěšně hodnoceny a používány jako nová přírodní kryoprotektiva ve vodných roztocích. Hydroxylové skupiny těchto polysacharidů se mohou vázat vodíkovými můstky s molekulami vody, což snižuje tvorbu ledových krystalů, přispívá to k omezení denaturace proteinů a zpomaluje agregaci proteinových molekul. [117]. Konkrétně cukry jsou preferovanými kryoprotektivy hlavně proto, že jsou chemicky neškodné a během zmrazovacího kroku je lze snadno zeskelnit [112].

Trehalóza (TRE), neboli α -D-glukopyranosyl- α -D-glukopyranosid [118] je neredukující disacharid glukózy, běžně se vyskytující v organismech, které jsou v přírodě schopné odolat extrémnímu suchu a chladu (např. vodní medvěd a kvasinky). To je přičítáno jeho výjimečné schopnosti podporovat preferenční hydrataci biomakromolekul a zachovávat funkční konformace během dehydratace buněk. Trehalóza tvoří stabilní sklovité matrice, které pozastavují jakékoli degradační a metabolické aktivity v dehydratovaném stavu. V důsledku toho byla trehalóza zkoumána jako netoxický kryoprotektant a lyoprotektant k ochraně různých biologických látek včetně lipidů, proteinů, jaderných materiálů, virů, bakterií, krevních destiček a červených krvinek [199]. Hlavní výhodou použití trehalózy ve srovnání s jinými cukry, jako je sacharóza a laktóza, je její schopnost vázat vodu, což následně zabraňuje tvorbě intracelulárních a extracelulárních krystalů ledu [120]. Lyofilizáty s trehalózou se snadno zvlhčují a rehydratují. Trehalóza je také stabilní, bezbarvá, bez zápachu [118].

Mannitol (MAN) je nejrozšířenějším cukerným alkoholem, který se běžně vyskytuje ve více než 50 druzích rostlin, řas, hub a lišejníků. Je jedním z primárních fotosyntetických produktů a zvyšuje toleranci organismů vůči soli a osmotickému stresu [121]. Mannitol je stabilní krystalická nehygroskopická pevná látka. Je rozpustný ve vodě, chemicky inertní a jako neredukující cukerný alkohol nepodléhá Maillardově reakci s aminy [122].

Při zamrazení mannitolu s vodnými roztoky dojde k jeho krystalizaci, která s sebou nese jak výhody, tak i nevýhody. Mezi výhody krystalizace mannitolu patří jeho vysoká eutektická teplota, jenž umožňuje primární sušení při vyšších teplotách, čímž je podstatně zkrácena doba

lyofilizace a proces je méně nákladný. Krystalizace také vede ke zvýšení objemu lyofilizátu a zlepšuje jeho rekonstituční schopnosti. Obecně platí, že přítomnost krystalických forem vede k tvorbě produktu s nízkým obsahem vody, což vede ke zvýšení kvality lyofilizátu [122]. Problém krystalizace mannitolu spočívá v působení mechanického napětí na lyofilizovanou látku. Tím dochází k její destabilizaci a poškození produktu [123]. Pokud jsou lyofilizační vialky zcela naplněny, může dojít k prasknutí vialky v důsledku krystalizace mannitolu během primárního sušení [115].

Ve studii Rampino et al. [5], zkoumali účinek přidání kryoprotektiv trehalózy, mannitolu a PEG 10 000 v koncentracích 0,5; 1; 5; 10 a 20 % w/v k CS/TPP submikročasticím. Částice byly plně redispergovány v případě použití kryoprotektiv o koncentraci 5 % w/v, a vyšší. U vzorků s přídavkem mannitolu a PEG 10 000 bylo zaznamenáno zvýšením velikosti, a to zejména při nižších koncentracích kryoprotektiva. Velikost částic pravděpodobně vzrostla v důsledku tvorby agregátů. Nejmenšího rozdílu ve velikosti submikročastic před, a po lyofilizaci bylo dosaženo za použití kryoprotektiva trehalózy, pravděpodobně kvůli její nízké hygroskopičnosti, nízké chemické reaktivitě a schopnosti tvorby vodíkových vazeb s částicemi [5].

Ve studii Katas et al. [124] zkoumali účinek přidání kryoprotektiv trehalózy, mannitolu, inulinu a histidinu o koncentracích 0,1; 0,5 a 1 % w/v k CS/dextranulfátovým submikročasticím. U vzorků s přídavkem inulinu a histidinu bylo zaznamenáno zvýšením velikosti a pokles zeta potenciálu ve všech třech použitých koncentracích. Při koncentracích 0,1 a 1 % w/v byla nejúčinnější kryoprotektiva trehalóza a mannitol – velikost částic vzrostla mírně. Při koncentraci 5 % w/v bylo nejúčinnější kryoprotektivum trehalóza, kde byly odchylky v DLS částic i zeta potenciálu minimální.

Dialýza

Dialýza je separační technika založena na transportu rozpuštěných látek, které mají být odstraněny přes semipermeabilní membránu vlivem rozdílu koncentrací mezi roztoky [125]. Transport je prováděn pomocí volné difuze přes membránu, kdy malé soluty opouštějí roztok o vyšší koncentraci, což je vzorek se submikročasticemi a putují přes membránu do roztoku s nižší koncentrací, neboli do přijímacího roztoku, což je obvykle voda. Procesu dialýzy se účastní také osmotické síly, kdy molekuly přijímacího roztoku procházejí membránou v opačném směru a ředí tak kompartment s vysokou koncentrací, tedy vzorek [126].

Hlavní parametry ovlivňující selekci jsou povaha a velikost pórů dialyzační membrány, složení a objem přijímacího roztoku a teplota a podmínky míchání [126]. Semipermeabilní membrány jsou nejčastěji deriváty celulózy, vždy je však nutné zkontrolovat její chemickou kompatibilitu se vzorkem. Membrána nesmí interagovat s částicemi, ani jinými komponentami vzorku, které by zpomalily rychlost permeace [127].

Přijímacím roztokem je nejčastěji voda, která je levná, biokompatibilní a solubilizuje velké množství léčiv a povrchově aktivních látek. Velmi používaný je také fosfátový pufr, který zase lépe napodobuje biologické podmínky. Opět je nutná kontrola kompatibility. Přijímací roztok by měl mít objem 100 až 500krát větší než objem dialyzovaného vzorku, aby byla podpořena difúze nečistot a byla účinně snížena jejich koncentrace. Typický dialyzační cyklus zahrnuje výměnu přijímacího roztoku, jakmile je dosaženo rovnováhy koncentrací, tj. asi 2 až 6 hodin po zahájení dialýzy. Častější výměnou přijímacího roztoku, zvýšením teploty a mícháním lze zvýšit rychlost dialýzy [126].

Mezi výhody dialýzy patří nízká spotřeba energie a nízké náklady na instalaci a provoz. Je to snadno proveditelný proces, který nevyžaduje žádné specifické vybavení [128]. Nicméně jedním z hlavních problémů dialýzy je fenomén předčasněho uvolňování léčiva. Molekuly léčiva mohou být v průběhu dialýzy vystaveny na povrchu částic, z něj mohou být uvolňovány do roztoku v dialyzačním střívků a následně mohou difundovat přes membránu do přijímacího roztoku [129]. Takto dochází ke ztrátám léčiva z částic. K překonání tohoto problému je třeba upravit délku a počet dialyzačních cyklů. Dialýza je také časově náročný proces s vysokým rizikem mikrobiální kontaminace a nedostatečným odstraněním větších nečistot [126].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla lyofilizace připravených submikročásteček z chitosanu a tripolyfosfátu sodného a z chitosanu a polykaprolaktonu s proteiny. Byla zkoumána účinnost vazby proteinů ovalbuminu a epitelálního růstového faktoru na částice, a to konkrétně adsorpce a zachycení. Poté byla sledována kinetika uvolňování proteinů z částic. Dalším cílem bylo studovat podmínky lyofilizace submikročásteček pro jejich skladování, konkrétně vliv kryoprotektiv trehalózy a mannitolu a jejich koncentrací a objem vzorků při lyofilizaci.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Pomůcky a přístroje

- analytické váhy Kern ABT 220-5DM (Balingen, Německo)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Heiligenstadt, Německo)
- analyzátor HORIBA Scientific SZ-100 nanopartica (Lyon, Francie)
 - křemenné kyvety – Semimikrokyveta SM/Q5, optická délka 5 mm (Mnichov, Německo)
 - jednorázové dvoustěnné spektrofotometrické kyvety Brand (Praha, ČR)
- centrifuga Hettich® ROTINA 420R, rotor 6-PLACE 4794 (Tuttlingen, Německo)
- centrifuga MiniSpin Eppendorf, rotor F-45-12-11 (Hamburk, Německo)
- centrifuga 5702 Eppendorf, rotor A-4-38 (Hamburk, Německo)
- centrifugační zkumavky Kartell S. p. A., 15 ml, 50 ml (Noviglio, Itálie)
- filtr na injekční stříkačku Minisart RC15 Sartorius, regenerovaná celulóza, 45 µm (Göttingen, Německo)
- filtr na injekční stříkačku Minisart SRP25 Sartorius, PTFE pro organické roztoky, 45 µm (Göttingen, Německo)
- injekční jehla 100 Sterican, průměr 0,8 mm (B. Braun, Melsungen, Německo)
- injekční stříkačka, 10 ml (Melsungen, Německo)
- jednokanálové pipety Eppendorf, špičky epT.I.P.S. (Hamburk, Německo)
- laboratorní sklo – kádinky, láhve se šroubovacím uzávěrem, odměrné válce, lékovky s víčkem
- lyofilizátor L4-110 PRO GREGOR Instruments s.r.o. (Sázava, ČR)
- lyofilizační vialky, 5 ml, 15 mm, gumové zátky 14 mm, víčka 15 mm
- magnetické míchadlo IKA TWISTER VERKON vícemístné (Praha, ČR)
- magnetické míchadlo s ohřevem Stuart UC152 (Staffordshire, UK)
- mikrozkušavky Eppendorf, 0,5; 1,5; 2 a 5 ml (Hamburk, Německo)
- pH metr Orion 420 (Massachusetts, USA)
- přístroj na purifikaci vody HALIOS NEPTEC, 0,2 µm (Elbdal, Německo)
- pultový hlubokomrazicí box MDF-C8V, -80 °C, 84 litrů (Praha, ČR)
- rotátor Multi Bio RS-24 Biosan (Riga, Lotyšsko)
- sonikátor UP100H Hielscher Ultrasonics (Teltow, Německo)

- spektrofotometr Labsystems Multiscan RC (Vantaa, Finsko)
- termostat INCU-Line VWR (Radnor, USA)
- topné hnízdo BTD Grant-bio (Cambridge, Velká Británie)
- topné hnízdo Genius Dry Bath Incubator MD-02N (Tchao-jüan, Tchaj-wan)
- třepačka MR-1 Mini-Rocker Shaker Biosan (Riga, Lotyšsko)
- ultrazvuk Sonorex Digitec (Berlín, Německo)
- vortex Wizard Vortex Mixer VELP (Usmate Velate, Itálie)

3.2. Reagencie a chemikálie

- Aceton p.a., Lach-Ner, s. r. o., $M_r = 58,08$ g/mol (Neratovice, ČR)
- D-Mannitol, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_r = 182,17$ g/mol (St. Louis, USA)
- D-(+)-trehalóza dihydrát, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_r = 378,33$ g/mol (St. Louis, USA)
- dialyzační střívko, vlhké, MWCO 300 kDa, SpectraPor®, Biotech CE Tubing (Waltham, USA), sponky
- deionizovaná voda
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Lach-Ner, s. r. o., $M_r = 156,01$ g/mol (Neratovice, ČR)
- Epiteiální růstový faktor (EGF) ProSpec lidský, rekombinantní, zdroj E. coli, 6,2 kDa (Rechovot, Izrael)
- Glycerin bezvodý p.a., Penta s.r.o., $M_r = 92,10$ g/mol (Praha, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a., Lach-Ner, s. r. o., $M_r = 358,14$ g/mol (Neratovice, ČR)
- Chitosan Sigma-Aldrich s.r.o., nízká M_r , 75 – 85% deacetylace (St. Louis, USA)
- Chitosan – ChitoClear, Primex, $M_r \sim 110 - 360$ kDa, > 95% deacetylace (Siglufjordur, Island)
- Kyselina octová 99% p.a., Lach-Ner, s. r. o., $M_r = 60,05$ g/mol (Neratovice, ČR)
- Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, Thermofisher, kat. č. 23235 (Waltham, USA)
- Ovalbumin A7641 Sigma-Aldrich s.r.o., (St. Louis, USA)
- PierceTM BCA Protein Assay Kit, Thermofisher, kat. č. 23227 (Waltham, USA)
- Poly- ϵ -kaprolakton, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_w \sim 14\ 000$ (St. Louis, USA)
- Tripolyfosfát sodný Sigma-Aldrich s.r.o., – $M_r = 367,86$ g/mol (St. Louis, USA)
- Tween® 80 Sigma-Aldrich s.r.o., (St. Louis, USA)

3.3. Příprava roztoků

Roztok chitosanu 25 mg/ml v 0,05% kyselině octové

Do láhve se šroubovacím uzávěrem bylo napipetováno 100 ml deionizované vody, ke které bylo přidáno 50,5 μ l 99% kyseliny octové. Takto byla připravena 0,05% kyselina octová. Dále bylo naváženo 250 mg chitosanu Sigma-Aldrich s. r. o. a za neustálého míchání bylo toto množství přidáno do roztoku 0,05% kyseliny octové. Hned po přípravě bylo změřeno pH, které nesmělo přesáhnout hodnotu 4,8, pokud tomu tak nebylo, pH bylo upraveno. Roztok byl míchán na magnetickém míchadle Stuart UC152 na stupni 3 při laboratorní teplotě 24 hodin. Hodnota pH byla znovu měřena po 5 hodinách a dle potřeby bylo pH upraveno tak, aby jeho hodnota nepřesahovala 4,8. Po 24 hodinách bylo potřeby pH změřeno a podle potřeby upraveno.

Roztok tripolyfosfátu sodného 0,25 mg/ml

Do lékovky s víčkem bylo naváženo 5 mg tripolyfosfátu sodného a k němu bylo napipetováno 20 ml deionizované vody.

0,1% roztok chitosanu v 1% kyselině octové

Do láhve se šroubovacím uzávěrem bylo odměřeno 94 ml deionizované vody, ke které byl napipetován 1 ml kyseliny octové 99% a 5 ml Tweenu 80. Bylo naváženo 100 mg CS Primex a přidáno do láhve. Roztok byl míchán na magnetickém míchadle VERKON 2 hodiny na stupni 3.

0,2% roztok polykaprolaktonu v acetonu

Do lékovky s víčkem bylo napipetováno 15 ml acetonu a bylo k němu přidáno 30 mg PCL. Tento roztok byl zahřát v topném hnízdě 30 minut při teplotě 50 °C.

Fosfátový pufr 0,1M, pH 7,3

Bylo naváženo 1,79 g hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu a rozpuštěno v 5 ml destilované vody při míchání a zahřívání. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 4,225 ml do 50 ml centrifugační zkumavky. Bylo naváženo 0,78 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu a rozpuštěno v 5 ml destilované vody při míchání a zahřívání. Z toho bylo

napipetováno 775 μ l do 50 ml centrifugační zkumavky k předchozímu roztoku, zkumavka byla doplněna deionizovanou vodou na objem 50 ml a podle potřeby bylo upraveno pH.

55% roztok trehalózy

Bylo naváženo 5,5 g trehalózy a rozpuštěno v 10 ml deionizované vody v lékovce s víčkem při míchání a zahřívání.

25% roztok mannitolu

Bylo naváženo 2,5 g mannitolu a rozpuštěno v 10 ml deionizované vody v lékovce s víčkem při míchání a zahřátí.

Roztoky ovalbuminu

Do mikrozkuvek Eppendorf byly naváženy 4 mg ovalbuminu, doplněny 2 ml fosfátového pufru a směs byla vortexována. Takto byl připraven roztok ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml jako zásobní roztok pro kalibraci BCA testů souprav PierceTM BCA Protein Assay Kit a MicroBCATM Protein Assay Reagent Kit.

Pro adsorpci proteinu byl připraven roztok ovalbuminu ve fosfátovém pufru o koncentraci 1 mg/ml.

Pro zachycení proteinu připraven roztok ovalbuminu v deionizované vodě 150 μ g/ml.

Roztok epitelálního růstového faktoru 1 mg/ml

EGF byl dodán ve formě lyofilizátu o hmotnosti 1 mg v lyofilizační vialce. Pro rozpuštění lyofilizátu do vialky byl napipetován 1 ml deionizované vody, výsledná koncentrace EGF byla 1mg/ml. Do mikrozkuvek Eppendorf bylo deionizovanou vodou naředěno na koncentraci 150 μ g/ml a objem 3 ml 450 μ l roztoku EGF pro přípravu nosiče v tripletu. Zbytek roztoku EGF byl přenesen do mikrozkuvek Eppendorf a zamrazen na teplotu -20 °C pro další použití.

3.4. Příprava částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného

Suspenze částic z CS a TPP byly připraveny metodou ionotropního gelovatění dle zdrojů [5] a [130]. Chitosan působí jako kationt, a iontovými interakcemi s tripolyfosfátem, který působí jako aniont, jsou vytvořeny sférické částice.

Použité roztoky

- deionizovaná voda
- roztok chitosanu v 0,05% kyselině octové o koncentraci 2,5 mg/ml
- roztok tripolyfosfátu sodného v deionizované vodě o koncentraci 0,25 mg/ml

Do kádinky s 18 ml deionizované vody byly napipetovány 2 ml roztoku chitosanu v 0,05% kyselině octové o koncentraci 2,5 mg/ml. Tento roztok CS a roztok TPP byly přefiltrovány.

Postup pro lyofilizaci

Do lékovky s víčkem bylo napipetováno 5 ml CS a za stálého míchání na magnetickém míchadle VERKON na stupni 4 byl po kapkách přidán 1 ml TPP. Tato suspenze částic byla míchána při laboratorní teplotě 30 minut. Takto bylo připraveno 6 ml roztoku částic odpovídající hmotnosti 1,5 mg. Práce probíhala v tripletu.

Postup pro adsorpci proteinu

Do lékovky s víčkem bylo napipetováno 7,5 ml CS a za stálého míchání na magnetickém míchadle VERKON na stupni 4 byl po kapkách přidán 1,5 ml TPP. Tato suspenze částic byla míchána při laboratorní teplotě 30 minut. Takto bylo připraveno 9 ml suspenze částic odpovídající hmotnosti 2,25 mg. 1 ml částic byl odebrán, neboť na adsorpci proteinu je třeba 8 ml částic odpovídající hmotnosti 2 mg. Práce probíhala v tripletu.

3.5. Příprava částic z chitosanu/polykaprolaktonu

Suspenze částic z CS a PCL byly připraveny upravenou metodou ionotropního gelovatění dle zdrojů [131], [132], [133]. CS působí jako kationt a iontovými interakcemi s PCL, který působí jako aniont, jsou vytvořeny sférické částice.

Použité roztoky a pomůcky

- deionizovaná voda
- glycerin
- Tween 80
- 0,1 % roztok chitosanu v 1 % kyselině octové
- 0,2 % roztok PCL v acetonu
- vlhká dialyzační střívka, sponky

Postup

Práce probíhala v digestoři a v tripletu. Vodný roztok CS byl přefiltrován přes filtr regenerované celulózy. Roztok PCL v acetonu byl přefiltrován přes filtr z PTFE. Do lékovky s víčkem bylo napipetováno $2 \times 3,375$ ml (celkem 6,75 ml) roztoku CS. Lékovka byla přenesena pod UZ jehlu 5 mm nastavenou na cyklus 1 a amplitudu 80 %. Za chodu bylo po kapkách přidáváno $3 \times 0,75$ ml roztoku PCL (celkem 2,25 ml). Směs byla 1 minutu homogenizována UZ jehlou a poté přenesena na magnetické míchadlo VERKON a míchána 45 minut na stupni 4 při laboratorní teplotě. Takto bylo připraveno 9 ml suspenze částic odpovídajících hmotnosti 11,25 mg. Z této suspenze bylo odebráno 0,2 ml (250 μ g částic) pro měření DLS, PDI indexu a zeta potenciálu dle kapitoly 3.12.

Směs částic byla přenesena do 50 ml centrifugační zkumavky a na dno bylo napipetováno 200 μ l glycerinu. Vzorky byly centrifugovány v centrifuze Hettich na program 1 – radius 120, 1700 RCF při 4 °C, po dobu 75 minut. Pipetou byl odebrán supernatant tak, aby nebyla porušena peleta s částicemi a ve zkumavce zůstalo cca 2,5 ml částic. Takto byla ze suspenze částic odstraněna většina acetonu a částice byly zakoncentrovány.

Poté byla provedena dialýza z důvodu odstranění glycerolu a zbytkové organické fáze. Suspenze částic byly přeneseny do vlhkého dialyzačního střívka. Dialýza probíhala v deionizované vodě, v minimálně stonásobku objemu, po dobu 48 hodin, s dvěma výměnami přijímacího roztoku, na magnetickém míchadle na nejnižších otáčkách a při laboratorní teplotě. Po dialýze byl ze suspenze (10,5 mg částic) odebrán 1 mg částic pro analýzu DLS, PDI zeta potenciálu a homogenizován UZ jehlou 3 minuty.

3.6. Dialýza částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného

Dialýza je separační technika založena na transportu rozpuštěných látek, které mají být odstraněny, přes semipermeabilní membránu vlivem rozdílu koncentrací mezi roztoky [125]. Transport látek přes membránu probíhá po koncentračním gradientu mechanismem volné difúze. Postup byl upraven podle [130].

Použité roztoky a pomůcky

- deionizovaná voda
- suspenze částic CS/TPP
- vlhká dialyzační střívka, sponky

Postup

Práce probíhala v tripletu. Vlhké dialyzační střívko bylo nastříháno po cca 10 cm, a na konec každého ze tří střívek byla připevněna sponka. Střívka byla naplněna zbylými 8 ml suspenze částic a byla uzavřena sponkou i na druhém konci. Střívka byla umístěna do 1l kádinek naplněných 800 ml deionizované vody (stonásobek objemu vzorku). Dialýza probíhala při laboratorní teplotě 24 hodin za mírného stálého míchání na magnetickém míchadle na nejnižším stupni míchání se dvěma výměnami destilované vody. Po ukončení dialýzy byl vzorek převeden pipetou do lékovek s víčkem a 1 ml částic byl odebrán na měření DLS, PDI a zeta potenciálu částic.

3.7. Lyofilizace částic

Lyofilizace je metoda, která dlouhodobě vylepšuje stabilitu léčivých přípravků přeměnou roztoku molekul na pevnou látku procesem sublimace. Proces sublimace zahrnuje přeměnu zmrzlého ledu přímo na páry, aniž by procházel kapalnou fází. [108]. Postup byl upraven podle zdrojů [5], [124], [132], [133] a [130].

Použité roztoky

- deionizovaná voda
- suspenze částic
- 55% roztok trehalózy
- 25% roztok mannitolu

3.7.1. Lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného

Do lyofilizačních vialek byly napipetovány suspenze částic a kryoprotektiv dle tabulky 1. Vialky byly uzavřeny víčkem a vloženy do mrazáku s teplotou -80 °C na 24 hod. Poté byly vialky bez víčka vloženy do lyofilizátoru a proběhla lyofilizace dle programu zapsaného v tabulce 2 po dobu 24 hod. Po ukončení lyofilizace byly vialky uzavřeny gumovou zátkou a víčkem a skladovány při teplotě 4 °C.

Postup pro rozpuštění lyofilizátů

Lyofilizáty byly rozpuštěny v 5 ml nebo ve 2 ml deionizované vody (ve stejném množství jako před lyofilizací). Vzorky byly ponechány 30 minut na třepačce s kývavým pohybem. Dále byly vzorky vortexovány a homogenizovány pomocí ultrazvuku po dobu 30 minut.

Tabulka 1: Pipetáž reagentů do lyofilizačních vialek pro částice z CS/TPP

| Kryoprotektivum | Koncentrace kryoprotektiva [% w/v] | Celkový objem ve vialce [ml] | Objem částic [ml] | Objem kryoprotektiva [μl] |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------|
| Trehalóza | 5 | 5 | 4,545 | 455 |
| Trehalóza | 5 | 2 | 1,818 | 182 |
| Trehalóza | 2,5 | 5 | 4,773 | 227 |
| Trehalóza | 2,5 | 2 | 1,909 | 91 |
| Mannitol | 5 | 5 | 4 | 1000 |
| Mannitol | 5 | 2 | 1,6 | 400 |
| Mannitol | 1 | 5 | 4,8 | 200 |
| Mannitol | 1 | 2 | 1,92 | 80 |

Tabulka 2: Lyofilizační program

| Čas [min] | Tlak [hPa] | Teplota police [°C] |
|-----------|------------|---------------------|
| 30 | 2,5 | -25 |
| 120 | 3 | -15 |
| 120 | 2 | -10 |
| 120 | 1,5 | -5 |
| 120 | 1 | 0 |
| 120 | 0,5 | 5 |
| 780 | ~ 0 | 20 |

3.7.2. Lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného se zachyceným proteinem

Do lyofilizační vialky bylo napipetováno 1,909 ml suspenze částic (tj. 7 mg částic) a 91 µl zásobního roztoku trehalózy. Výsledná koncentrace trehalózy ve vialce je 2,5 % w/v a výsledný objem odpovídá 2 ml. Vialky byly uzavřeny víčkem a vloženy do mrazáku s teplotou -80 °C na 24 hod. Poté byly vialky bez víčka vloženy do lyofilizátoru a proběhla lyofilizace dle programu zapsaného v tabulce č. 2 po dobu 24 hod. Po ukončení lyofilizace byly vialky uzavřeny gumovou zátkou a víčkem a skladovány při teplotě 4 °C.

Postup pro rozpuštění lyofilizátů

Pro měření byly lyofilizáty rozpuštěny ve 2 ml deionizované vody. Vzorky byly ponechány 30 minut na třepačce s kývavým pohybem. Dále byly vzorky vortexovány a homogenizovány pomocí ultrazvuku po dobu 30 minut.

3.7.3. Lyofilizace částic chitosanu/polykaprolaktonu

Do každé lyofilizační vialky byl napipetován 1mg částic, suspenze byla doředěna deionizovanou vodou a bylo přidáno kryoprotektivum na objemy 5 ml nebo 2 ml dle (Tab. 1) Současně byl lyofilizován vzorek částic bez kryoprotektiva. Vialky byly uzavřeny víčkem a vloženy do mrazícího boxu s teplotou -80 °C na 24 hod. Poté byly vialky bez víčka vloženy do lyofilizátoru a proběhla lyofilizace dle programu v tabulce 2 po dobu 24 hod. Po ukončení lyofilizace byly vialky uzavřeny gumovou zátkou a víčkem a skladovány při teplotě 4 °C.

Postup pro rozpuštění lyofilizátů

Lyofilizáty byly rozpuštěny v 5 ml nebo ve 2 ml deionizované vody (ve stejném množství jako před lyofilizací). Vzorky byly ponechány 30 minut na třepače s kývavým pohybem. Dále byly vzorky vortexovány a homogenizovány v ultrazvukové lázni 30 minut.

Tabulka 3: Pipetáž reagentů do lyofilizačních vialek pro částice z CS/PCL

| Kryoprotektivum | Koncentrace kryoprotektiva [% w/v] | Celkový objem ve vialce [ml] | Objem částic [μ l] | Objem deionizované vody [ml] | Objem kryoprotektiva [μ l] |
|----------------------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Trehalóza | 5 | 5 | 215 | 4,33 | 455 |
| Trehalóza | 5 | 2 | 215 | 1,603 | 182 |
| Trehalóza | 2,5 | 5 | 215 | 4,558 | 227 |
| Trehalóza | 2,5 | 2 | 215 | 1,694 | 91 |
| Mannitol | 5 | 5 | 215 | 3,785 | 1000 |
| Mannitol | 5 | 2 | 215 | 1,385 | 400 |
| Mannitol | 1 | 5 | 215 | 4,585 | 200 |
| Mannitol | 1 | 2 | 215 | 1,705 | 80 |
| Částice bez kryoprotektiva | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 |
| Částice bez kryoprotektiva | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |

3.8. Adsorpce ovalbuminu na částice

Adsorpce je proces, kdy molekula nebo iont přilne k povrchu částice [77]. Ovalbumin (OVA) je adsorbován na povrch částic pomocí slabých vazebných interakcí mezi molekulami, jako jsou Van der Waalsovy síly, vodíkové můstky nebo iontové síly [77]. Postup byl převzat ze zdroje [130].

Použité roztoky

- suspenze částic
- roztok ovalbuminu v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3 o koncentraci 1mg/ml
- 0,1M fosfátový pufr o koncentraci o pH 7,3

Postup

Byly připraveny čtyři vzorky s částicemi. Na tři vzorky byl adsorbován protein, čtvrtý vzorek byl použit jako slepý vzorek. 2 mg submikročástic, připravených dle kapitoly 3.4. a 3.5. byly přeneseny do 15 ml centrifugačních zkumavek a centrifugovány v centrifuze 5702 Eppendorf 5 minut při 1700 RCF. Poté byl odebrán supernatant, který byl uchován pro měření. Po odstranění supernatantu byly částice 4x promyty 1 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,3 a centrifugovány v centrifuze 5702 Eppendorf 5 minut při 1700 RCF. Poté byla suspenze částic přenesena do mikrozkušavek Eppendorf. Roztok OVA o koncentraci 1 mg/ml byl zředěn 0,1M fosfátovým pufrům na koncentraci 0,5 mg/ml. Z tohoto roztoku byl k částicím napipetován 1 ml. Do slepého vzorku byl místo ovalbuminu napipetován 1 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,3. Reakční směs byla za stálého otáčení na rotátoru inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly částice centrifugovány v centrifuze MiniSpin 5 minut při 1700 RCF a byl odebrán supernatant, ze kterého byla stanovena koncentrace proteinu pomocí soupravy Pierce™ BCA Protein Assay Kit dle kapitoly 3.11.1.

Vyhodnocení

Adsorpce ovalbuminu na částice byla vyhodnocena nepřímou metodou stanovení proteinu ze supernatantu pomocí BCA testu. Byly vyhodnocovány 2 parametry, a to účinnost adsorpce (rovnice 1) [5], která vyjadřuje procento hmotnosti proteinu navázaného na polymerní nosič ve vztahu k počátečnímu množství vloženého proteinu. Druhý zkoumaný parametr byla vazebná kapacita nosiče (rovnice 2), která udává hmotnost proteinu zachyceného na částicích vztáženou k hmotnosti částic v suchém stavu [130].

Rovnice 1: Účinnost vazby

$$\text{Účinnost vazby [\%]} = \frac{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{nenavázaný protein } [\mu\text{g/ml}]}{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}]} \cdot 100$$

Rovnice 2: Vazebná kapacita nosiče

$$\text{Vazebná kapacita nosiče } [\mu\text{g/mg}] = \frac{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{nenavázaný protein } [\mu\text{g/ml}]}{\text{hmotnost částic v suchém stavu [mg]}}$$

3.9. Zachycení proteinu do struktury částic z chitosanu/tripolyfosfátu sodného

Zachycení je metoda, ve které je protein zachycen do struktury nosiče. Protein je obklopen monomerními jednotkami nosiče, které v jeho přítomnosti polymerizují a tím ho uzavírají do mřížky. Tento postup byl upraven dle zdroje [83].

Použité roztoky

- deionizovaná voda
- roztok EGF v deionizované vodě o koncentraci 150 µg/ml
- roztok chitosanu v 0,05% kyselině octové o koncentraci 2,5 mg/ml
- roztok ovalbuminu v deionizované vodě o koncentraci 150 µg/ml
- roztok tripolyfosfátu v deionizované vodě o koncentraci 0,25 mg/ml

Postup

Do kádinky s 17 ml deionizované vody byly napipetovány 2 ml roztoku CS v 0,05% kyselině octové o koncentraci 2,5 mg/ml. Takto byl roztok naředěn na koncentraci 0,25 mg/ml. Tento roztok CS a roztok TPP byly přefiltrovány.

Práce probíhala v tripletu. Do lékovky s víčkem bylo napipetováno 5,666 ml CS a 1 ml OVA nebo EFG. Za stálého míchání na magnetickém míchadle VERKON na stupni 4 bylo po kapkách přidáno 1,333 ml tripolyfosfátu sodného. Tato suspenze částic byla míchána při laboratorní teplotě 30 minut. Takto bylo připraveno 8 ml suspenze částic odpovídající hmotnosti 2,15 mg včetně proteinu. Poté byl odebrán 1 ml suspenze částic na měření DLS, PDI a zeta potenciálu. Zbytek částic byl centrifugován 5 minut v centrifuze 5702 Eppendorf při 1700 RCF. Poté byl odebrán supernatant ke stanovení koncentrace proteinu, tak aby na dně zkumavky zůstaly 2 ml částic k lyofilizaci.

3.10. Kinetika uvolňování proteinu z částic

Metoda byla upravena dle zdrojů [134] a [130].

Použité roztoky

- 0,1M fosfátový pufr o pH 7,3

Postup

Práce probíhala v tripletech a slepým vzorkem částic. Na 2 mg submikročástic, připravených dle kapitoly 3.4. a 3.5., byl dle kapitoly 3.8. adsorbován ovalbumin nebo dle kapitoly 3.9. zachycen protein. Částice s navázaným proteinem byly centrifugovány v centrifuze MiniSpin 5 minut při 1700 RCF, poté byl odebrán supernatant pro pozdější stanovení koncentrace proteinu. 2 mg částic byly resuspendovány ve zkumavce Eppendorf v 5 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,3 temperovaného na 37°C. Tato suspenze byla skladována v termostatu za stálého otáčení v rotátoru při teplotě 37 °C po celou dobu uvolňování. V pravidelných časových intervalech byla provedena centrifugace 5702 Eppendorf 5 minut při 1700 RCF a byly odebrány alikvoty po 300 µl v případě adsorbovaného proteinu a 1 ml v případě zachyceného proteinu. Tento objem byl nahrazen temperovaným fosfátovým puftrem. Časy, ve kterých byly alikvoty odebírány byly: 15, 30, 60, 90, 120 minut, 24 hodin, 48 hodin a 1 týden. Z odebraných alikvotů byla stanovena koncentrace pomocí soupravy MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit dle kapitoly 3.11.3. pro adsorbovaný protein a 3.11.2. pro zachycený protein.

Vyhodnocení

Kinetika uvolňování ovalbuminu byla vyhodnocena kumulativní metodou, jejímž principem je postupné přičítání uvolněného proteinu. Dále bylo dle rovnice 3 vypočítáno množství uvolněného ovalbuminu [130], [134].

Rovnice 3: Výpočet množství uvolněného ovalbuminu vyjádřeného v procentech

$$\text{Uvolněný protein [\%]} = \frac{\text{uvolněný protein } [\mu\text{g}]}{\text{adsorbovaný protein } [\mu\text{g}]} \cdot 100$$

3.11. Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninového testu

Bicinchoninový (BCA) test je kolorimetrická metoda, při které je měřena koncentrace proteinu spektrofotometricky. Prvním krokem je chelatace mědi s proteinem v alkalickém prostředí, ve kterém jsou ionty Cu^{2+} redukovány na Cu^+ za vzniku zelenomodrého komplexu. V druhém kroku reaguje sodná sůl kyseliny bicinchoninové s Cu^+ iontem za vzniku fialového komplexu, jehož intenzita je měřena při vlnové délce 570 nm. Byly použity dvě různé komerční soupravy a tři různé metody přípravy vzorku dle potřebného rozsahu koncentrace.

3.11.1. Pierce™ BCA Protein Assay Kit

Použité roztoky

- fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH 7,3
- roztok ovalbuminu v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3 o koncentraci 2 mg/ml
- roztoky soupravy Pierce™ BCA Protein Assay Kit
 - roztok A: uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinan sodný v 0,2 M NaOH a 4% 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA)
 - roztok B: 4% pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě

Postup

Nejprve byl připraven zásobní roztok ovalbuminu v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3 o koncentraci 2 mg/ml. Z tohoto roztoku byly dle tabulky 3 připraveny standardy pro kalibraci, jako ředící roztok byl použit 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,3. Do kádinky byly napipetovány roztoky A a B v poměru 50:1. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 25 μ l standardu, vzorku či slepého vzorku a bylo přidáno 200 μ l pracovního roztoku. Směs byla inkubována 30 minut v termostatu při teplotě 37°C. Po inkubaci byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm během 10 minut od vyjmutí z termostatu.

Vyhodnocení

Byla vytvořena kalibrační závislost z absorbancí standardů vůči jejich koncentraci. Koncentrace vzorků byly vypočítány z jejich naměřené absorbance dle rovnice regrese kalibrační křivky. Tento test má rozsah koncentrací 20–2000 μ g/ml, proto je vhodný pro měření koncentrace proteinu po adsorpci na částice.

Tabulka 4: Pipetáž pro přípravu standardů pro kalibraci Pierce™ BCA testu

| Roztok | Koncentrace standardu [µg/ml] | Objem zásobního roztoku ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml [µl] | Objem ředícího roztoku 0,1M fosfátového pufru [µl] |
|---------------|--------------------------------------|--|---|
| A | 700 | 52,5 µl | 87,5 µl |
| B | 500 | 80 µl z roztoku A | 40 µl |
| C | 250 | 60 µl z roztoku B | 60 µl |
| D | 125 | 60 µl z roztoku C | 60 µl |
| E | 50 | 40 µl z roztoku D | 60 µl |
| F | 25 | 40 µl z roztoku E | 40 µl |
| G | 5 | 20 µl z roztoku F | 80 µl |
| H | 0 | 0 µl | 60 µl |

3.11.2. Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit – metoda v mikrozkušavkách Eppendorf

Použité roztoky

- fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH 7,3
- roztok ovalbuminu v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3 o koncentraci 2 mg/ml
- roztoky soupravy MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit
 - roztok A: uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinan sodný v 0,2 M NaOH
 - roztok B: 4% 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA) v destilované vodě
 - roztok C: 4% pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě

Postup

Nejprve byl připraven zásobní roztok ovalbuminu v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3 o koncentraci 2 mg/ml. Z tohoto roztoku byly dle tabulky 6 připraveny standardy pro kalibraci, jako ředící roztok byl použit 0,1M fosfátový pufr o pH 7,3. Do kádinky byly napipetovány roztoky A, B a C v poměru 25:24:1. Do mikrozkušavek Eppendorf byl napipetován 1 ml standardu, vzorku či slepého vzorku a byl přidán 1 ml pracovního roztoku. Směs byla inkubována 1 hodinu v topném hnízdě při teplotě 60°C. Po inkubaci bylo napipetováno 300 µl standardu, vzorku či slepého vzorku do mikrotitrační destičky a proměřeno na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm.

Tabulka 5: Pipetáž pro přípravu standardů pro kalibraci Micro BCATM testu pro metodu v mikrozkušavkách Eppendorf

| Koncentrace standardu [µg/ml] | Objem ovalbuminu [ml] | Objem ředícího roztoku (deionizovaná voda) [ml] |
|-------------------------------|------------------------------|---|
| 200 | 0,5 ml zásobního roztoku | 4,5 |
| 40 | 2 ml z předchozího roztoku | 8 |
| 20 | 4 ml z předchozího roztoku | 4 |
| 10 | 4 ml z předchozího roztoku | 4 |
| 5 | 4 ml z předchozího roztoku | 4 |
| 2,5 | 4 ml z předchozího roztoku | 4 |
| 1 | 3,2 ml z předchozího roztoku | 4,8 |
| 0,5 | 4 ml z předchozího roztoku | 4 |
| 0 | 0 | 8 |

Vyhodnocení

Byla vytvořena kalibrační závislost z absorbancí standardů vůči jejich koncentraci. Koncentrace vzorků byly vypočítány z jejich naměřené absorbance dle rovnice regrese kalibrační křivky. Tato metoda má rozsah koncentrací 0,5–200 µg/ml, proto je vhodná pro měření koncentrace zachyceného proteinu a sledování kinetiky uvolňování proteinu z částic, do kterých byl zachycen.

3.11.3. Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit – metoda v mikrotitrační destičce

Použité roztoky

- 0,1M fosfátový pufr o pH 7,3
- roztok ovalbuminu v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3 o koncentraci 2 mg/ml
- roztoky soupravy MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit
 - roztok A: uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinan sodný v 0,2 M NaOH
 - roztok B: 4% 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA) v destilované vodě
 - roztok C: 4% pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě

Postup

Nejprve byl připraven zásobní roztok ovalbuminu v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3 o koncentraci 2 mg/ml. Z tohoto roztoku byly dle tabulky 5 připraveny standardy pro kalibraci. Jako ředící roztok byl použit 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,3. Do kádinky byly napipetovány roztoky A, B a C v poměru 25:24:1. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ l standardu, vzorku či slepého vzorku a bylo přidáno 150 μ l pracovního roztoku. Směs byla inkubována 2 hodiny v termostatu při teplotě 37°C. Po inkubaci byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm během 10 minut od vyjmutí z termostatu.

Vyhodnocení

Byla vytvořena kalibrační závislost z absorbancí standardů vůči jejich koncentraci. Koncentrace vzorků byly vypočítány z jejich naměřené absorbance dle rovnice regrese kalibrační křivky. Tato metoda má rozsah koncentrací 2,5–200 μ g/ml, proto je vhodná pro sledování kinetiky uvolňování proteinu z částic, na které byl nejprve adsorbován.

Tabulka 6: Pipetáž pro přípravu standardů pro kalibraci Micro BCA™ testu pro metodu v mikrotitrační destičce

| Koncentrace standardu [μ g/ml] | Objem zásobního roztoku ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml [μ l] | Objem ředícího roztoku 0,1M fosfátového pufru o pH 7,3 [μ l] |
|--|---|---|
| 200 | 100 | 900 |
| 150 | 75 | 925 |
| 100 | 50 | 950 |
| 40 | 20 | 980 |
| 20 | 10 | 990 |
| 10 | 5 | 995 |
| 5 | 2,5 | 998 |
| 2,5 | 1,25 | 999 |
| 0 | 0 | 1000 |

3.12. Fyzikálně-chemická charakterizace částic

Metodou měření dynamického rozptylu světla byly stanoveny tři vlastnosti částic – DLS, PDI a zeta potenciál částic.

3.12.1. Stanovení hydrodynamické velikosti částic a polydisperzního indexu

Použitý přístroj a příslušenství

- analyzátor SZ-100 nanopartica HORIBA Scientific
- jednorázové dvoustěnné spektrofotometrické kyvety

Postup

250 µg částic bylo dle potřeby ředěno deionizovanou vodou na objem 1,5 ml. Na přístroji HORIBA Scientific ve dvoustěnných kyvetách byly změřeny DLS a PDI částic pod úhlem 173° s hodnotou indexu lomu pro chitosan 1,540 při teplotě 25 °C. Každé měření bylo provedeno ve 12 opakováních. Těchto 12 měření bylo průměrováno, pro DLS byla použita hodnota Z-Average a její směrodatná odchylka, PDI byla použita hodnota PDI a její směrodatná odchylka.

3.12.2. Stanovení zeta potenciálu

Použitý přístroj a příslušenství

- analyzátor SZ-100 nanopartica HORIBA Scientific
- křemenné kyvety – Semimikrokyveta SM/Q5, optická délka 5 mm

Postup

Křemenná kyveta, která se skládá ze dvou elektrod a komory pro vzorek, byla předem propláchnuta pomocí plastové stříkačky deionizovanou vodou pro odstranění bublin. 250 µg částic bylo dle potřeby ředěno deionizovanou vodou na objem 1,5 ml. Suspenze částic byla pomocí plastové stříkačky aplikována do kyvety. Na přístroji HORIBA Scientific byl změřen zeta potenciál při úhlu rozptylu 90° při teplotě 25 °C. Každé měření bylo provedeno ve 12 opakováních. Těchto 12 měření bylo průměrováno a byla použita hodnota Zeta Potential (Mean).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentů bylo připravit nosičový systém pro cílené doručování látek, např. proteinů, a optimalizovat jeho podmínky skladování pomocí lyofilizace. Nosičové systémy nesmí vyvolávat zánětlivý účinek, ani produkovat toxické rozkladné produkty. Naopak mezi vlastnosti kvalitních nosičů patří biokompatibilita, schopnost účinné vazby aktivní látky, dodání látky do místa působení a její pomalé uvolňování z nosiče. Tyto vlastnosti by měli být zachovány po přípravě i při definovaných podmínkách skladování [16].

Pro experimenty s vazbou proteinů ovalbuminu a EGF byly zvoleny dva typy nosičů, a to submikročástice z chitosanu a tripolyfosfátu sodného (TPP) a submikročástice z chitosanu (CS) a polykaprolaktonu (PCL). Suspenze částic z CS/TPP byly připraveny metodou ionotropního gelování. Tato metoda využívá elektrostatické interakce, ke kterým dochází mezi ionty s opačně nabitými specifickými síťovacími činidly v definovaném rozsahu koncentrace nebo pH [58]. Chitosan působí jako kationt a iontovými interakcemi s tripolyfosfátem nebo polykaprolaktonem (anionty) a jsou vytvořeny sférické částice. Tyto systémy je možná charakterizovat pomocí měření DLS velikosti, distribuce velikosti PDI a zeta potenciálu submikročástic.

V některých případech jejich klinického využití je nutno hledat podmínky pro skladování a stabilizaci částic. Proto byla provedena lyofilizace připravených částic s kryoprotektivou trehalózou a mannitolem o různých koncentracích, z důvodu ochrany vzorků před tvorbou ledových krystalů, které mechanicky narušují částice nebo léčivo. V rámci optimalizace procesu lyofilizace byl také zkoumán vhodný objem vzorku. Změna fyzikálně chemických vlastností částic byla sledována před a po lyofilizaci.

Na připravené částice z CS/TPP s CS/PCL byly navázány proteiny ovalbumin a EGF a byly zvoleny dva mechanismy vazby – adsorpce na částice a zachycení do struktury částic. Účinnost vazby byla vyjádřena pomocí vazebné kapacity nosiče a účinností vazby. Pro další charakterizaci nosičů byla zkoumána kinetika uvolňování proteinů z částic ve fosfátovém pufru o pH 7,3, vyjádřena kumulativní metodou.

4.1. Příprava a charakterizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu s adsorbovaným proteinem

Dle postupu v kapitole 3.6. byly připraveny submikročástice z chitosanu (CS) a tripolyfosfátu (TPP) v poměru 5:1. Pro přípravu byl použit chitosan od společnosti Sigma-Aldrich o nízké molekulové hmotnosti a stupněm deacetylace 75–85 %. Částice byly charakterizovány měřením jejich DLS, PDI a zeta potenciálu metodou dynamického rozptylu světla dle kapitoly 3.12. (Tab. 7)

Tabulka 7: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu pro částice z CS/TPP (počet opakování: 3)

| | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Částice CS/TPP | 223,9 ± 18,2 | 0,509 ± 0,149 | 45,4 ± 1,6 |

DLS částic odpovídala hodnotě 223,9 ± 18,2 nm, připravené částice tedy lze označit za submikročástice. PDI měl hodnotu 0,509 ± 0,149. Obecně jsou částice se zeta potenciálem v rozmezí hodnot +30 mV a -30 mV považovány za stabilní [103]. Hodnota zeta potenciálu byla 45,4 ± 1,6 mV, submikročástice tedy byly hned po přípravě stabilní. U připravených částic byly dále studovány podmínky lyofilizace, protože dle studie autorů v [106] není jejich stabilita v suspenzi v čase optimální. Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 22).

Optimalizace podmínek lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu

Lyofilizace je metoda, která dlouhodobě zlepšuje stabilitu léčivých přípravků přeměnou roztoku nestabilních molekul na pevnou látku procesem sublimace. Proces sublimace zahrnuje přeměnu zmrzlého ledu přímo na páry, aniž by procházel kapalnou fází. K tomu dochází při teplotě a tlaku pod trojným bodem vody [108]. Kvalitní lyofilizát by měl mít nízký obsah zbytkové vlhkosti, neměly by být narušeny fyzikální a chemické vlastnosti původního produktu a měl by být dlouhodobě stabilní. Částice po lyofilizaci musí být snadno resuspendovány a musí být zachována aktivita léčiva [112].

Objem vzorku je důležitý parametr procesu lyofilizace. Při nižším objemu má vzorek vyšší plochu, která je vystavena zamrazení a sušení. V důsledku toho by měla být účinnost

lyofilizačního procesu výrazně zlepšena [110]. Na obrázku 5 je uvedena lyofilizační vialka používaná pro experimenty v této práci.

Jednou z největších překážek, která se během lyofilizace objevuje, je tvorba velkých ledových krystalů, které mechanicky narušují nanočástice a navázaný protein. [110]. Proto je nutno použít kryoprotektiva, která zabraňují tvorbě těchto krystalů. Je však nutné použít kompatibilní kryoprotektivum s daným nosičem ve vhodné koncentraci. Kryoprotektiva o příliš nízké koncentraci dostatečně nezabraňují tvorbě ledových krystalů, naopak kryoprotektiva o příliš vysoké koncentraci nejsou schopny stabilizovat částice.



Obrázek 5: Používaná lyofilizační vialka

Kryoprotektiva trehalóza a mannitol

Submikročástice z CS/TPP byly připravené a lyofilizované dle kapitol 3.4. a 3.7.1. Účelem tohoto experimentu bylo hledat vhodné podmínky lyofilizace, a to optimalizovat objem vzorku suspenze částic, druh a koncentrace kryoprotektiva. Byly použity lyofilizační vialky o objemu 5 ml, zvolené objemy vzorků byly 5 ml a 2 ml. Dále byla zkoumána kryoprotektiva trehalóza (TRE) o koncentracích 5 % w/v a 2,5 % w/v a mannitolu (MAN) o koncentraci 5 % w/v a 1 % w/v.

Vzorky byly rozpuštěny ve 2 ml nebo v 5 ml deionizované vody (ve stejném množství jako před lyofilizací) a homogenizovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Takto byly připraveny k analýze fyzikálněchemických vlastností – DLS, PDI a zeta potenciálu dle kapitoly 3.12. DLS velikosti částic, PDI a zeta potenciál nebyly detekovány (data neuvedena). To mohlo být ovlivněno agregací částic nebo volného chitosanu, který nebyl navázan do částic. Pro ověření tohoto tvrzení byly vzorky s koncentrací trehalózy 2,5 % w/v o objemech

5 ml a 2 ml (jediné detekovatelné analyzátořem) přefiltrovány plastovou stříkačkou přes filtr z regenerované celulózy s velikostí pórů 45 μm a znovu byly analyzovány DLS velikost, PDI a zeta potenciál (Tab. 8). Výsledky jednotlivých vzorku tripletů jsou uvedeny v příloze A (Tab. 23).

Tabulka 8: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP lyofilizaci a filtraci (počet opakování: 3)

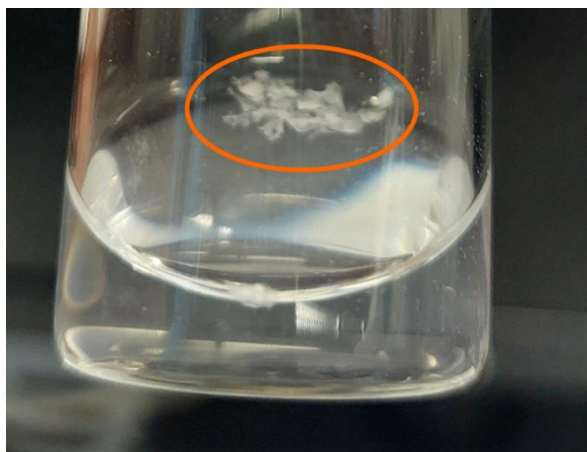
| Kryoprotektivum, koncentrace, objem | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|--|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| TRE 2,5%, 5ml | 177,3 \pm 14,4 | 0,389 \pm 0,003 | 40,2 \pm 0,7 |
| TRE 2,5%, 2ml | 164,9 \pm 10,6 | 0,373 \pm 0,023 | 41,7 \pm 3,3 |

Filtrací a následným měřením fyzikálně-chemických parametrů bylo prokázáno, že v suspenzi rozpuštěného lyofilizátu byly přítomny částice o požadovaných fyzikálně-chemických vlastnostech. Zagregované částice a volný chitosan byly tedy filtrací odstraněny. Tímto způsobem filtraci lyofilizátu provést lze, ale s naším vybavením laboratoře není možné určit ztráty částic zachycených filtrem. Není tedy známa koncentrace částic, což je možné vyřešit například se zářením NTA.

Ve srovnání s parametry částic hned po přípravě (Tab. 6), jejichž vlastnosti byly DLS velikost 223,9 \pm 18,2 nm, PDI 223,9 \pm 18,2 a zeta potenciál 45,4 \pm 1,6 mV byly částice po lyofilizaci s trehalózou a po filtraci menší, měly užší distribuci velikostí, a byly stabilní.

Vialky s lyofilizáty částic s mannitolem se po přidání deionizované vody nepodařilo rozpustit, v suspenzi byla přítomna bílá sraženina (Obr. 6). Sraženinu se nepodařilo odstranit vortexováním ani homogenizací v ultrazvuku. Mannitol tedy není vhodné kryoprotektivum pro lyofilizaci těchto chitosanových částic.

Vialky se slepým vzorkem, tedy bez kryoprotektiva, o objemu 5 ml popraskaly z důvodu tvorby velkých ledových krystalů. Vialky se slepým vzorkem o objemu 2 ml byly po lyofilizaci bez vzorku, což prokazuje, že částice CS/TPP nelze lyofilizovat bez kryoprotektiva.



Obrázek 6: Sraženina v rozpuštěném lyofilizátu částic z CS/TPP s mannitem (5%, 2 ml)

Vliv dialýzy částic a objemu vzorku na vlastnosti lyofilizátu

V předchozím experimentu byly prokázány velké agregáty v roztocích částic po lyofilizaci. Tyto agregáty mohly být tvořeny submikročásticemi, ale také volným chitosanem v nadbytku. Proto byly submikročástice připraveny dle postupu v kapitole 3.4. a za účelem odstranění nadbytečného chitosanu byla provedena dialýza dle postupu v kapitole 3.6. Jako přijímací roztok byla použita destilovaná voda nebo deionizovaná voda. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách. 9, 10 a 11.

Tabulka 9: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě a po dialýze do deionizované vody (počet opakování: 3)

| | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Částice CS/PCL po přípravě | 211,9 ± 3,1 | 0,369 ± 0,021 | 53,5 ± 4 |
| Částice CS/PCL po dialýze | 3650 ± 3340 | 0,973 ± 0,027 | 27,6 ± 25,6 |

Částice hned po přípravě lze označit jako monodisperzní stabilní submikrosystémy. Výsledky měření fyzikálně-chemických vlastností po dialýze do destilované vody byly nekonzistentní, DLS částic se pohybovala od 120 nm po 7000 nm, hodnoty PDI se pohybovaly od záporných hodnot po hodnotu 60 mV a systém byl vysoce polydisperzní. Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 24). Je možné, že dialýza

nepřinesla požadované výsledky z důvodu interakce iontů v destilované vodě. Vzhledem k nehomogenitě částic lyofilizace nebyla provedena.

Na základě předchozích experimentů byly připraveny submikročástice dle kapitoly 3.4. Ve snaze snížit množství nenavázaného chitosanu byl objem částic byl zmenšen na 6 ml, který odpovídal hmotnosti částic 1,5 mg. Byla provedena dialýza dle kapitoly 3.6. Jako přijímací roztok byla tentokrát použita deionizovaná voda. Dle postupu v kapitole 3.7.1. byla provedena lyofilizace. Bylo použito kryoprotektivum trehalóza o koncentracích 5 % w/v a 2,5 % w/v a lyofilizovaný objem byl 2 ml z důvodu snazšího rozpouštění.

Kryoprotektivum mannitol použito nebylo z důvodu opakovaně špatné tvorby lyofilizátů a jejich problematickému rozpouštění. Vzorky bez kryoprotektiva byly také vyřazeny z experimentu, protože jejich lyofilizace byla opakovaně neúspěšná.

Tabulka 10: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze do deionizované vody a lyofilizaci s kryoprotektivem trehalóza o koncentraci 5% w/v v objemu 2 ml (počet opakování: 3)

| | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|---|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Částice CS/TPP po přípravě | 180 ± 5,2 | 0,388 ± 0,046 | 52,5 ± 3,7 |
| Částice CS/TPP po dialýze | 126,8 ± 6,5 | 0,534± 0,087 | 36,6 ± 2,3 |
| Částice CS/TPP po lyofilizaci TRE 5% w/v, 2 ml | 566,9 ±310,6 | 1,922 ± 1,023 | 30,3 ± 4,7 |

Připravené částice o objemu 6 ml měly po přípravě menší DLS, než částice o objemu 9 ml. Jejich DLS odpovídala hodnotě 180 ± 5,2 nm, lze je tedy nazvat submikročásticemi. Suspenze měla PDI 0,388 ± 0,046, což je menší, než 0,7, proto systém lze považovat za monodisperzní. Zeta potenciál odpovídal hodnotě 52,5 ± 3,7 mV a systém byl stabilní.

Po dialýze došlo ke zmenšení částic na hodnotu 126,8 ± 6,5 nm, PDI byl zvýšen na hodnotu 0,534± 0,087, ale nosičový systém stále lze označit za monodisperzní, a zeta potenciál byl také snížen na hodnotu 30,3 ± 4,7 mV, systém částic byl i po dialýze stabilní.

DLS částic po lyofilizaci kryoprotektivem trehalóza o koncentraci 5 % w/v byla zvýšena, pravděpodobně z důvodu agregátů částic. Dle její hodnoty 566,9 ±310,6 nm

se pravděpodobně jednalo o agregáty 3–5 částic. Z tohoto důvodu byl zvýšen i PDI na hodnotu $1,922 \pm 1,023$. Zeta potenciál byl snížen na hodnotu $30,3 \pm 4,7$ mV, částice přesto zůstaly stabilní. Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 25).

Dialýza tedy výrazně vylepšila proces lyofilizace odstraněním přebytečného chitosanu, nicméně částice po lyofilizaci přesto agregovaly a systém byl polydisperzní. Z těchto důvodů tyto částice nevyhovují v klinické praxi, i přestože jsou stabilní.

Tabulka 11: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze do deionizované vody a lyofilizaci s kryoprotektivum trehalóza o koncentraci 2,5% w/v v objemu 2 ml (počet opakování: 3)

| | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|--|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Částice CS/TPP po přípravě | $180,9 \pm 4,6$ | $0,416 \pm 0,033$ | $53,6 \pm 4,8$ |
| Částice CS/TPP po dialýze | $129,6 \pm 4,7$ | $0,557 \pm 0,011$ | $33,7 \pm 0,9$ |
| Částice CS/TPP po lyofilizaci TRE 2,5 % w/v, 2 ml | $267,9 \pm 63,58$ | $1,084 \pm 0,39$ | $31,4 \pm 3,6$ |

Lyofilizáty byly rozpuštěny ve 2 ml deionizované vody a homogenizovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Stejně jako u předešlých vzorků připravené částice o objemu 6 ml měly po přípravě menší DLS, než částice o objemu 9 ml. DLS odpovídala velikosti $180,9 \pm 4,6$ nm a suspenze byla monodisperzní a stabilní. I v tomto případě došlo po dialýze ke zmenšení částic, zvýšení PDI a snížení stability, nicméně systém byl stále monodisperzní a stabilní. DLS submikročástic byla po lyofilizaci zvýšena na hodnotu $267,9 \pm 63,58$ nm, pravděpodobně v důsledku agregátů částic. Toto tvrzení by bylo vhodné ověřit např. pomocí SEM analýzy, jak bylo provedeno např. v diplomové práci [130]. Směrodatná odchylka k DLS byla zvýšená, protože jeden ze tří vzorků v tripletu měl výrazně vyšší hodnotu. PDI byl $1,084 \pm 0,39$, tedy vyšší, než 0,7, systém byl vysoce polydisperzní a nevhodný pro klinickou aplikaci, i přestože zeta potenciál o hodnotě $31,4 \pm 3,6$ mV činil systém stabilním. Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 26).

Lyofilizace s kryoprotektivem trehalózou o koncentraci 2,5 % w/v byla účinnější, než s koncentrací trehalózy 5 % w/v, protože DLS submikročástic byla nižší, PDI nižší a zeta potenciál vyšší. Pro klinickou aplikaci by bylo dobré snížit PDI, aby byl systém monodisperzní. Na připravované částice s optimalizovanými podmínkami lyofilizace budou v dalším kroku přípravy nosičových systémů navazovány proteiny.

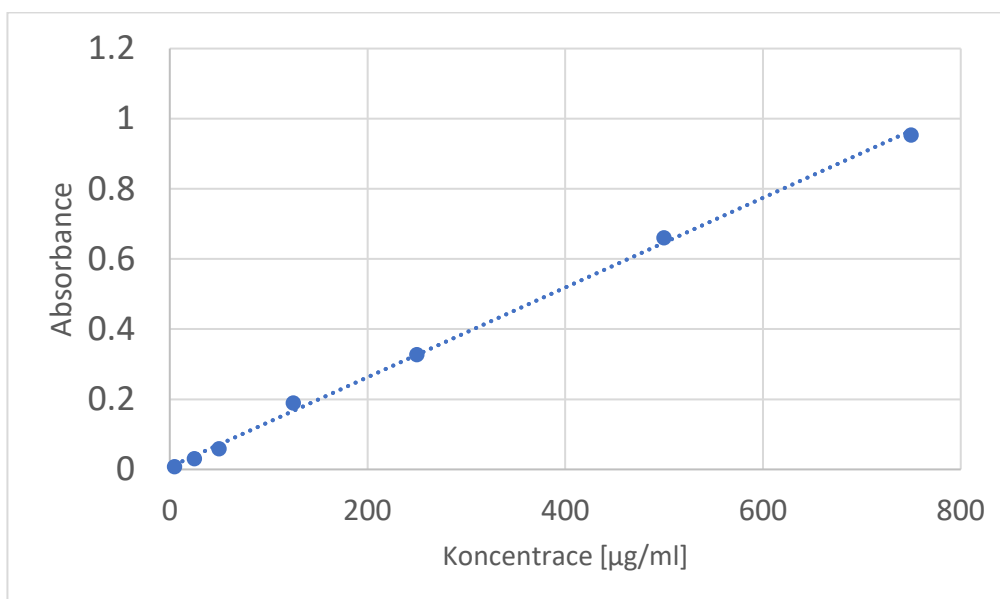
Hodnocení účinnosti adsorpce proteinů na částice z chitosanu/tripolyfosfátu

Adsorpce je proces, kdy molekula nebo iont přilne k povrchu částice. Protein má mít vhodný izoelektrický bod, aby se byl schopen přiblížit k částicím a navázat se na ně pomocí slabých vazebných interakcí mezi molekulami, jako jsou Van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, iontové síly a další [77]. Parametry, které ovlivňují adsorpci nejvíce jsou teplota, pH, iontová síla a složení pufru [78].

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit účinnost adsorpce proteinu a vazebnou kapacitu nosiče. Nejprve byl na suspenze částic sorbován protein ovalbumin, jehož izoelektrický bod (pI) se pohybuje v rozmezí 4,5–4,9. a jeho molekulová hmotnost je 42,881 kDa [135]. Vazba probíhá mezi kladně nabitými aminoskupinami chitosanu se záporně nabitými karboxylovými skupinami ovalbuminu.

Byly připraveny submikročástice dle kapitoly 3.4. a na 2 mg částic byl adsorbován ovalbumin o koncentraci 0,5 mg/ml podle kapitoly 3.8. Koncentrace adsorbovaného proteinu byla vypočítána nepřímou metodou ze supernatantu pomocí BCA testu dle kapitoly 3.11.1. Dále byla koncentrace přepočítána dle kalibrační křivky v grafu 1 s rovnicí regrese $y = 0,0013x + 0,007$ a hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9986$. Na základě stanovené koncentrace byla vypočítána účinnost vazby (Rov. 1) a vazebná kapacita nosiče (Rov. 2).

Graf 1: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinu soupravou Pierce™ BCA Protein Assay Kit



Tabulka 12: Účinnost adsorpce a vazebná kapacita nosiče vztažená na 2 mg částic z CS/TPP (počet opakování: 3)

| | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Účinnost adsorpce | 94,52 % |
| Vazebná kapacita částic CS/TPP | 274,28 µg / 2 mg částic |

V diplomové práci [130] odpovídala účinnost adsorpce na stejné chitosanové částice hodnotě 26,96 % a vazebná kapacita hodnotě 64,7 µg / 2 mg (DLS velikost $122,57 \pm 18,4$ nm, zeta potenciál $32,8 \pm 5,8$ mV). Submikročástice měly po přípravě (bez proteinu) menší DLS velikost nm, PDI v obou pracích velmi podobný, oba systémy lze považovat za monodisperzní a stabilní. Rozdíl byl také v použité soupravě pro stanovení proteinu v supernatantu – Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit a ředění.

Ve studii [5] připravili částice z CS/TPP se sorbovaným ovalbuminem o dvou koncentracích. Účinnost adsorpce na 1 mg částic s adsorbovaným ovalbuminem o koncentraci 0,4 mg/ml byla 57 % a o koncentraci 0,6 mg/ml byla 76 %. Tyto hodnoty jsou bližší pro zvolenou koncentraci ovalbuminu 0,5 mg/ml. Částice připravené ve studii [5] se také blížily hodnotami DLS velikosti – 200 ± 24 nm, PDI 0,227 a zeta potenciálu 25 ± 3 mV.

V předchozích kapitolách se částečně podařilo nalézt podmínky lyofilizace pro částice z CS/TPP po dialýze a lyofilizaci s 2,5% trehalózou v objemu 2 ml, přesto nebyly zachovány DLS velikosti a PDI vlastnosti původních částic. Vzorky po rozpuštění byly homogenizovány v ultrazvukové lázni 30 minut, což nelze provést u částic s adsorbovaným proteinem,

protože by byl protein denaturován a předčasně uvolněn z částic. Z tohoto důvodu nebyla lyofilizace provedena u chitosanových částic s adsorbovaným proteinem. V dalších experimentech byl zkoumán jiný mechanismus vazby proteinu na tyto částice, a to konkrétně zachycení proteinu do jejich struktury.

4.2. Příprava a charakterizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu se zachyceným proteinem

Zachycení je metoda, ve které je protein přítomný v celé struktuře nosiče. Protein je obklopen monomerními jednotkami nosiče, které v jeho přítomnosti polymerizují a tím ho uzavírají do mřížky [83, str. 37]. Tato metoda tedy vyžaduje syntézu polymerního nosiče a zároveň podmínky vhodné pro zachycovaný protein [82].

Nejprve byl dle kapitoly č. 3.9. připraveny částice se zachyceným ovalbuminem. Izoelektrický bod (pI) ovalbuminu se pohybuje v rozmezí 4,5 – 4,9 a je tak přitahován s kladně nabitými skupinami chitosanu. Jeho molekulová hmotnost je 42,881 kDa [135]. Poté byly připraveny částice z CS/TPP se zachyceným lidským rekombinantním EGF, jehož pI odpovídá hodnotě 5,53 [136] a je také přitahován k chitosanu. Jeho molekulová hmotnost je 6,2 kDa, což bylo potvrzeno výrobcem pomocí SDS-PAGE [137]. Byla provedena analýza fyzikálně chemických vlastností – DLS, PDI a zeta potenciálu (Tab. 13). Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 27).

Tabulka 13: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu pro částice z CS/TPP po zachycení OVA a EGF (počet opakování: 3)

| | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|---|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Částice CS/TPP se zachyceným OVA | 226,7 ± 14,9 | 0,422 ± 0,014 | 53,7 ± 0,7 |
| Částice CS/TPP se zachyceným EGF | 188,9 ± 7,8 | 0,418 ± 0,019 | 44,9 ± 1,1 |

Molekulová hmotnost OVA je téměř sedmkrát větší než u EGF, což je pravděpodobně hlavní důvod rozdílné velikosti částic. Dalším důvodem mohou být odlišné hodnoty izoelektrických bodů proteinů a tím i jejich různá přitažlivost k chitosanu.

V diplomové práci [83] byl EGF zachycen do struktury odlišných CS/TPP částic. V této práci byly však částice se zachyceným EGF připraveny v poměru obou složek 2:1, koncentrace tripolyfosfátu byla nižší a chitosan byl rozpuštěn v acetátovém pufru. Tyto rozdíly mohou odůvodňovat o něco vyšší hodnoty DLS velikosti částic s EGF 204 ± 12 nm.

Ve studii [137] byly metodou ionotropního gelovatění připraveny částice z CS/TPP v poměru 10:1 se zachyceným EGF o koncentraci 1 mg/mlů. V této studii byl EGF přidán do roztoku chitosanu a míchán 1 hodinu, poté byl přidán TPP a suspenze byla míchána dalších 30 minut. Rozdílné podmínky mohou odůvodňovat menší hodnoty DLS velikosti 150 ± 10 nm.

Lyofilizace částic z chitosanu/tripolyfosfátu se zachyceným proteinem

V předchozí kapitole experimentech byly připraveny stabilní monodisperzní submikročástice se zachycenými proteiny, proto byly lyofilizované. Submikročástice z CS/TPP se zachycenými proteiny ovalbuminem a EGF byly připraveny dle kapitoly 3.9. a byly lyofilizovány dle kapitoly 3.7.2. Z předchozích optimalizací pro lyofilizaci byla jako kryoprotektivum zvolena trehalóza o koncentraci 2,5 % v/w v objemu 2 ml. Po lyofilizaci byla provedena analýza fyzikálně-chemických vlastností – DLS, PDI a zeta potenciálu (Tab. 14). Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 28).

Tabulka 14: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/TPP s navázaným proteinem po lyofilizaci (počet opakování: 3)

| | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|---|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Částice CS/TPP se zachyceným OVA | $3252,4 \pm 884,3$ | $3 \pm 0,571$ | $35,7 \pm 1,7$ |
| Částice CS/TPP se zachyceným EGF | $887,3 \pm 200,4$ | $1,976 \pm 0,728$ | $43,4 \pm 1,9$ |

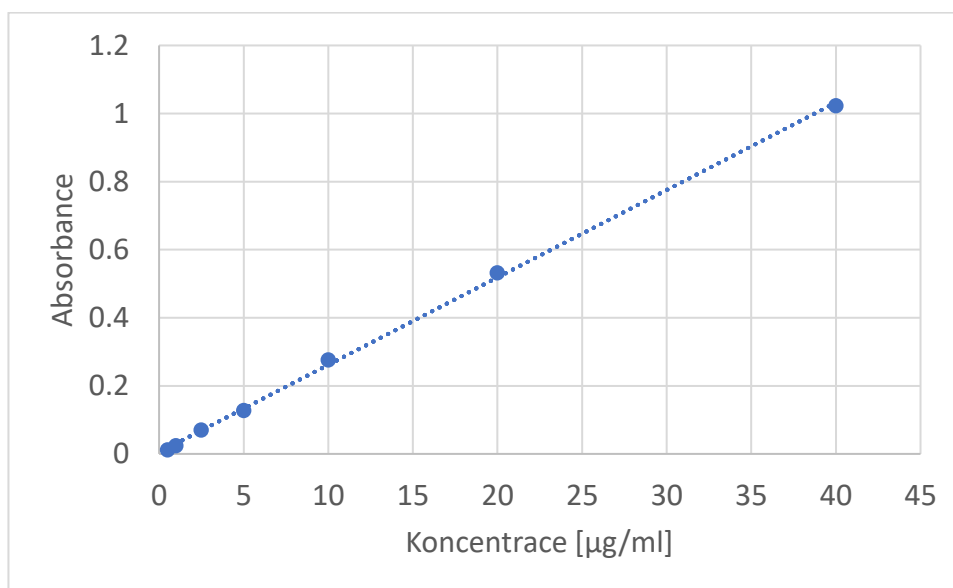
DLS částic se pohybovala ve stovkách až tisících nanometrů a směrodatné odchylky byly velmi vysoké, přestože byly suspenze předem homogenizovány v ultrazvukové lázni (30 minut). Částice během procesu lyofilizace agregovaly. V případě částic se zachyceným EGF se jedná o shluky několika jednotek částic. Tento jev by bylo možné potvrdit SEM analýzou. PDI byl u obou vzorků také velmi vysoký, vyšší než 0,7, vzorky má tedy velmi širokou distribuci velikosti částic. Zeta potenciál byl u obou vzorků vyšší než 30 mV, částice

jsou tedy navzdory agregaci stabilní. Podíl na kvalitě částic může mít také volný CS a TPP, které nemohli být odstraněny dialýzou před lyofilizací, protože by došlo k uvolnění zachyceného proteinu do přijímacího roztoku a tím i k jeho ztrátě.

Hodnocení účinnosti zachycení proteinu do struktury částic z chitosanu/tripolyfosfátu

Dle kapitoly 3.9. byly připraveny suspenze částic CS/TPP v poměru 5:1 se zachyceným ovalbuminem nebo EGF o koncentraci 150 µg/ml [83] do struktury částic. Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí BCA testů dle kapitoly 3.11.2. a vypočítána z kalibrační závislosti v grafu 2 s rovnicí regrese $y = 0,0257x + 0,0048$ a hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9993$. Dle rovnic 1 a 2 byly vypočítány účinnost zachycení a vazebná kapacita nosiče (Tab. 15).

Graf 2: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinu soupravou Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit – metoda ve zkumavkách Eppendorf



Tabulka 15: Účinnost zachycení a vazebná kapacita nosiče vztažená na 2 mg částic CS/TPP (počet opakování: 3)

| | Účinnost zachycení [%] | Vazebná kapacita částic [µg / 2mg] |
|----------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| Částice CS/TPP se zachyceným OVA | 86,47 | 64,85 |
| Částice CS/TPP se zachyceným EGF | 86,19 | 64,64 |

Hodnoty účinnosti zachycení a vazebné kapacity částic u obou proteinů mají téměř stejnou hodnotu, metoda zachycení je tedy vhodná pro oba proteiny. Ve srovnání s metodou adsorpce jde o nižší účinnost zachycení proteinů o přibližně 8 %.

V diplomové práci [83] byl zachycován EGF (150 µg) do struktury chitosanových částic (4 mg) s účinností zachycení 39,3 % a vazebnou kapacitou částic 25,2 µg / 4 mg. Jednalo se však o odlišně připravené částice CS/TPP (CS ku TPP v acetátovém pufru v poměru 2:1), Rozdíly v podmínkách přípravy částic a také jejich dvojnásobné množství mohou odůvodňovat její nižší naměřené hodnoty pro účinnost zachycení.

Ve studii [137] byly připraveny metodou ionotropního gelovatění částice z CS/TPP v poměru 10:1 se zachyceným EGF o koncentraci 1 mg/ml a účinnosti zachycení 70 %, která se blíží získané hodnotě 86,19 %. V této studii byl EGF přidán do roztoku chitosanu a míchán 1 hodinu, poté byl přidán TPP a suspenze částic s proteinem byla míchána dalších 30 minut.

Kinetika uvolňování proteinů z částic z chitosanu/tripolyfosfátu

Pro další charakterizaci připravených částic s různě vázanými proteiny bylo sledováno množství a rychlost uvolněných proteinů z těchto nosičových systémů. Nejprve byly připraveny částice z CS/TPP s navázanými proteiny ovalbuminem a EGF. Proteiny byly buď sorbovány na povrch částic nebo zachyceny do struktury částic. Obě metody vykazovaly vysokou účinnost vazby. Kinetika naopak nebyla zkoumána u lyofilizovaných částic s proteiny, protože nebyly nalezeny vhodné podmínky lyofilizace, které zachovávají parametry částic.

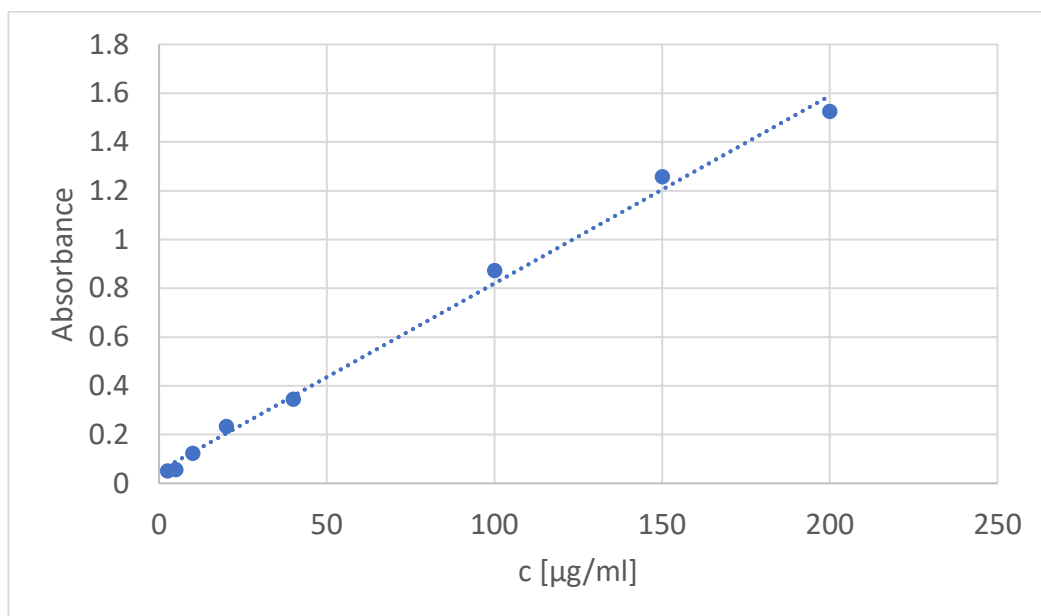
Kinetika uvolňování proteinu závisí na vlastnostech nosiče, jako je např. velikost částic, jejich tvar, porozita a další, na vlastnostech proteinu, jako je struktura a pI a na vlastnostech prostředí, hlavně na teplotě, pH a iontové síle. Protein byl uvolňován z částic do 5 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,3 a teplotě 37 °C, což přibližně odpovídá pH a teplotě těla [130].

Částice z chitosanu/tripolyfosfátu s adsorbovaným ovalbuminem

Suspenze submikročástic z CS/TPP byly připraveny dle kapitoly 3.4 a 3.8. a dle kapitoly 3.10. byla sledována kinetika uvolňování proteinu. Ze suspenze částic byly odebírány alikvoty v časech 15, 30, 60, 90, 120 minut, 24 hodin, 48 hodin a 1 týden. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí soupravy MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit dle kapitoly 3.11.3. Pro vyhodnocení koncentrace proteinů (Tab. 16) byla připravena kalibrační závislost (Graf 3) s rovnicí regrese $y = 0,0077x + 0,0504$ a hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9949$. Kinetika uvolňování ovalbuminu byla vyhodnocena kumulativní metodou, jejímž principem je postupně

přičítání uvolněného proteinu. V grafu 4 je znázorněna kinetika uvolňování ovalbuminu z částic z CS/TPP vyjádřena kumulací koncentrace. Množství uvolněného ovalbuminu v procentech bylo vypočítáno dle rovnice 3 [130], [134].

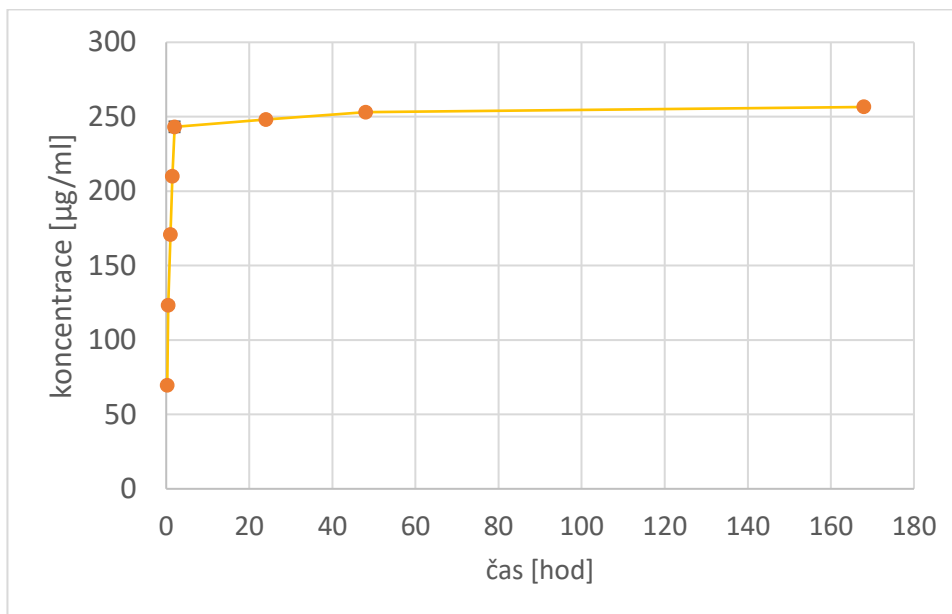
Graf 3: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace proteinu soupravou Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit – metoda v mikrotitrační destičce



Tabulka 16: Naměřená koncentrace alikvotů uvolněného ovalbuminu z částic z CS/TPP po přechodí adsorpci v koncentracích a v procentech uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)

| Čas | Naměřená koncentrace alikvotů [$\mu\text{g/ml}$] | Naměřená koncentrace alikvotů vyjádřena v procentech [%] |
|-----------|--|--|
| 15 minut | 69,56 | 11,93 |
| 30 minut | 53,84 | 9,23 |
| 60 minut | 47,57 | 8,16 |
| 90 minut | 39,02 | 6,69 |
| 120 minut | 33,24 | 5,7 |
| 24 hodin | 4,86 | 0,83 |
| 48 hodin | 4,9 | 0,84 |
| 1 týden | 3,54 | 0,61 |

Graf 4: Kinetika uvolňování adsorbovaného ovalbuminu z částic z CS/TPP vyjádřena pomocí kumulace hodnot koncentrací uvolněného ovalbuminu



Nejvíce proteinu bylo uvolněno během prvních dvou hodin, a to konkrétně 243,23 µg/ml, neboli 41,71 %, poté bylo uvolňování výrazně zpomaleno. Během 1 týdne bylo uvolněno 256,53 µg/ml, neboli 43,99 % proteinu, poté byla analýza ukončena. 49,23 µg/ml, neboli 9,84 % ovalbuminu bylo detekováno v supernatantu, odebraného hned po přípravě částic, toto množství proteinu tedy nebylo navázáno na částice. Na částicích tedy zůstalo navázáno 194,77 µg/ml, neboli 38,95 %. To znamená, že téměř polovina proteinu, který byl na částice adsorbován, byl z částic také uvolněn.

V diplomové práci [130] bylo stejnou metodou uvolněno po 24 hodinách o něco méně proteinu – 33,82 %. Tento rozdíl mohl být způsoben použitým chitosanem (Primex) se stupněm deacetylace > 95 %.

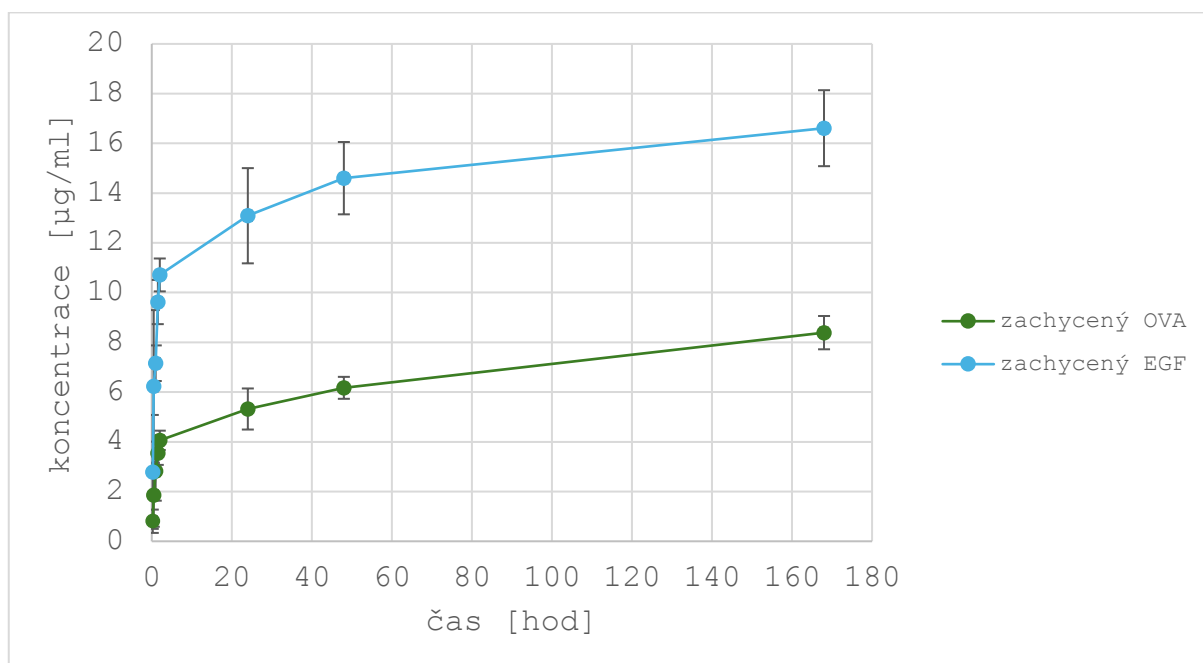
Částice z chitosanu/tripolyfosfátu se zachycenými proteiny

Byly připraveny částice z CS/TPP dle kapitoly 3.9. se zachyceným ovalbuminem anebo EGF o koncentraci 150 µg/ml. Kinetika uvolňování proteinu byla měřena dle kapitoly 3.10. Z částic byly odebírány alikvoty o objemu 1 ml, v časech 15, 30, 60, 90, 120 minut, 24 hodin, 48 hodin a 1 týden. Z odebraných alikvotů byla stanovena koncentrace pomocí soupravy MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit dle kapitoly 3.11.2. Koncentrace byla vyhodnocena dle kalibrační závislosti grafu 2. Množství uvolněného ovalbuminu v procentech bylo vypočítáno dle rovnice 3 [130], [134] (Tab. 17). V grafu 5 je znázorněna kinetika uvolňování ovalbuminu a EGF z částic z CS/TPP vyjádřena kumulací koncentrace.

Tabulka 17: Naměřená koncentrace alikvotů uvolněného ovalbuminu s EGF z částic z CS/TPP se zachyceným proteinem vyjádřena v koncentracích a v procentech uvolněných proteinů (počet opakování: 3)

| Čas | Naměřená koncentrace alikvotů OVA [µg/ml] | Naměřená koncentrace alikvotů OVA vyjádřena v procentech [%] | Naměřená koncentrace alikvotů EGF [µg/ml] | Naměřená koncentrace alikvotů EGF vyjádřena v procentech [%] |
|-----------|---|--|---|--|
| 15 minut | 0,8 | 0,57 | 2,79 | 1,94 |
| 30 minut | 1,05 | 0,75 | 3,44 | 2,39 |
| 60 minut | 0,96 | 0,68 | 0,93 | 0,65 |
| 90 minut | 0,73 | 0,52 | 2,46 | 1,71 |
| 120 minut | 0,51 | 0,37 | 1,09 | 0,76 |
| 24 hodin | 1,26 | 0,9 | 2,38 | 1,65 |
| 48 hodin | 0,85 | 0,61 | 1,51 | 1,05 |
| 1 týden | 2,22 | 1,58 | 2,01 | 1,4 |

Graf 5: Kinetika uvolňování zachyceného ovalbuminu a EGF z částic z CS/TPP vyjádřena pomocí kumulace hodnot koncentrací uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)



V prvních 2 hodinách bylo uvolněno 4,06 µg/ml ovalbuminu neboli 2,89 %, což je přibližně polovina naměřené koncentrace všech alikvot. Celkem bylo z částic uvolněno 8,39 µg/ml ovalbuminu neboli 5,97 %. Na částicích zůstalo navázáno 122,51 µg/ml ovalbuminu neboli 81,3 %. To znamená, že z částic bylo uvolněno velmi malé množství proteinu, většina ovalbuminu zůstala zachycena ve struktuře částic. Pro uvolnění veškerého navázaného proteinu by musela být rozrušena struktura částic.

Celkem bylo z částic uvolněno 16,62 µg/ml EGF neboli 11,54 %. Na částicích zůstalo navázáno 108,61 µg/ml EGF neboli 66,87 %. To znamená, že z částic bylo uvolněno malé množství proteinu, většina EGF zůstala zachycena ve struktuře částic. Pro uvolnění veškerého navázaného proteinu by musela být rozrušena struktura částic.

V diplomové práci [83] byl uvolňován EGF (150 µg/ml) zachyceného do struktury částic z CS/TPP odlišnou metodou uvolňování po dobu 4 dny. Protein byl uvolňován v 1 ml a byl vyměněn veškerý objem supernatantu. Rozdíl byl v použití méně citlivé metody detekce soupravou Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit (v mikrotitrační destičce). V práci [83] se koncentrace alikvot odebíraných během prvních 2 hodin pohybovala okolo hodnoty 1 µg/ml a později koncentrace proteinu nebyla detekována.

4.3. Příprava a charakterizace částic z chitosanu/polykaprolaktonu s adsorbovaným proteinem

Nanočástice připravené z CS/PCL jsou zkoumány pro jejich velký potenciál nosičového systému léčiv při léčbě na rakoviny. Úspěšná byla dřívější enkapsulace léčiv, jako např. cisplatina, doxorubicin a gentamicin sulfát [72]. V současné době se vývoj nosičových systémů z PCL rozšiřuje na další aplikace, jako je systémová preexpoziciční profylaxe HIV, antikoncepce a protizánětlivá léčba [71].

Byly připraveny submikročástice z CS/PCL poměru 3:1 dle kapitoly 3.5. Pro přípravu byl použit chitosan od společnosti Primex o relativní molekulové hmotnosti ~ 110 – 360 kDa a stupněm deacytlace > 95%. Částice byly charakterizovány měřením jejich DLS velikosti, PDI a zeta potenciálu metodou dynamického rozptylu světla dle kapitoly 3.12. Tyto parametry byly měřeny hned po přípravě částic včetně organické složky a po dialýze do deionizované vody (Tab. 18). Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 29).

Tabulka 18: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu pro částice z CS/PCL po přípravě a po dialýze (počet opakování: 3)

| | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Částice CS/PCL po přípravě | 202,7 ± 22,8 | 0,705 ± 0,1 | 23,2 ± 2,6 |
| Částice CS/PCL po dialýze | 203,4 ± 4,9 | 0,973 ± 0,027 | 35,4 ± 1,5 |

Po přípravě částic DLS částic odpovídala hodnotě $202,7 \pm 22,8$ nm, připravené částice lze tedy nazvat submikročásticemi. Vyšší směrodatná odchylka byla způsobena odchylkou vzorků (Příloha A, Tab. 29). Tento jev mohl nastat odchylkami při přípravě částic (rozdílná rychlost přikapávání roztoku PCL). Podle hodnoty PDI 0,705, byl nosičový systém polydisperzní. Částice se zeta potenciálem o hodnotě $23,2 \pm 2,6$ mV tedy byly spíše nestabilní.

Po dialýze DLS velikost odpovídala hodnotě $203,4 \pm 4,9$ nm. Směrodatná odchylka je podstatně menší než hned po přípravě, částice jednotlivých vzorků mají tedy velmi podobnou velikost. PDI se zvýšil na hodnotu $0,973 \pm 0,027$ a připravený systém měl tedy velmi širokou distribuci velikosti částic. Zeta potenciál byl vyšší než u čerstvě připravených částic a jeho hodnota $35,4 \pm 1,5$ mV byla vyšší, než 30 mV, částice tedy lze považovat za stabilní.

Optimalizace podmínek lyofilizace částic z chitosanu/polykaprolaktonu

Submikročástice z CS/PCL byly připravené dle kapitoly 3.5. a lyofilizovány dle kapitoly 3.7.3. Účelem tohoto experimentu bylo hledat vhodné podmínky lyofilizace, a to optimalizovat objem vzorku suspenze částic, druh a koncentraci kryoprotektiva. Byly použity lyofilizační vialky o objemu 5 ml, zvolené objemy vzorků byly 5 ml a 2 ml. Dále byla zkoumána kryoprotektiva trehalóza (TRE) o koncentracích 5 % w/v a 2,5 % w/v a mannitolu (MAN) o koncentraci 5 % w/v a 1 % w/v.

Vzorky byly rozpuštěny ve 2 ml nebo v 5 ml deionizované vody (ve stejném množství jako před lyofilizací) a homogenizovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Takto byly připraveny k analýze fyzikálněchemických vlastností – DLS velikosti, PDI a zeta potenciálu dle kapitoly 3.12. (Tab. 19). Výsledky jednotlivých vzorků tripletu jsou uvedeny v příloze A (Tab. 30, 31, 32, 33).

Tabulka 19: Fyzikálně-chemické vlastnosti částic z CS/PCL po lyofilizaci s různými kryoprotektivy o různých koncentracích a objemech (počet opakování: 3)

| Kryoprotektivum, koncentrace, objem | | Hydrodynamická velikost [nm] | Polydisperzní index | Zeta potenciál [mV] |
|-------------------------------------|------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| TRE 5% | 5 ml | 4647,5 ± 2316,5 | 6,907 ± 1,85 | 27,9 ± 1 |
| TRE 5% | 2 ml | 5423,8 ± 3492,2 | 8,1365 ± 2,438 | 35,6 ± 1,6 |
| TRE 2,5% | 5 ml | 7403,5 ± 1011,3 | 8,626 ± 2,008 | 33,7 ± 2,3 |
| TRE 2,5% | 2 ml | 4524,7 ± 2529,6 | 4,708 ± 3,158 | 37,8 ± 1,5 |
| MAN 5% | 5 ml | 6661,9 ± 468,2 | 7,207 ± 1,178 | 42,7 ± 4,1 |
| MAN 5% | 2 ml | 6358,4 ± 1489,9 | 7,795 ± 1,877 | 47,7 ± 6,5 |
| MAN 1% | 5 ml | 4994 ± 1141,3 | 5,594 ± 0,389 | 61,2 ± 20,2 |
| MAN 1% | 2 ml | 5995,2 ± 3095,6 | 7,099 ± 3,081 | 39,1 ± 10,7 |

DLS velikost všech vzorků částic se pohybovala v tisících nanometrů a částice během procesu lyofilizace agregovaly. PDI byl také velmi vysoký, vyšší než 0,7, vzorek má tedy velmi širokou distribuci velikosti částic. Zeta potenciál byl u většiny vzorků vyšší než 30 mV, částice jsou tedy navzdory bobtnání a agregaci stabilní.

Vzorky bez kryoprotektiva nebylo možné lyofilizovat. Lyofilizační vialka s 5 ml suspenze částic praskla během procesu zamrazování z důvodu tvorby velkých ostrých krystalů ledu. Vialku s 2 ml se povedlo úspěšně zamrazit, ale po ukončení lyofilizace vialka zůstala prázdná, lyofilizát se tedy nevytvořil.

Co se týče parametru objemu, částice s kryoprotektivem trehalózou o objemu 2 ml bylo snazší rozpustit, než v objemu 5 ml, nicméně za vortexování po uplynutí 30 minut rozpouštění na třepačce, byl veškerý lyofilizát rozpuštěn. Rehydratace lyofilizátů s mannitolem byla problematická. Tyto lyofilizáty měly bílé zabarvení na rozdíl od lyofilizátů s trehalózou. Lyofilizát nebylo možné plně rozpustit, v suspenzi zůstávaly bílé sraženiny, které se nepodařilo rozrušit ani pomocí ultrazvuku.

Vzhledem k vysokým hodnotám a směrodatným odchylkám hydrodynamické velikosti a PDI nebyla provedena analýza navázaným proteinem. Podmínky lyofilizace se nepodařilo optimalizovat.

Hodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu na částice z chitosanu/polykaprolaktonu

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit účinnost adsorpce proteinu a vazebnou kapacitu nosiče. Na suspenzi částic byl sorbován protein ovalbumin, jehož izoelektrický bod (pI) se pohybuje v rozmezí 4,5–4,9. a jeho molekulová hmotnost je 42,881 kDa [135]. Vazba probíhá mezi kladně nabitými aminoskupinami chitosanu se záporně nabitými karboxylovými skupinami ovalbuminu.

Není možné provést zachycení ovalbumin do struktury částic. Složka PCL byla rozpuštěna v 99% acetonu, to znamená, že při přípravě částic se ovalbumin dostane do kontaktu s tímto organickým činidlem a je denaturován.

Dle kapitoly 3.5. byly připraveny submikročástice z CS/PCL a podle kapitoly 3.8. byly na 2 mg částic adsorbován ovalbumin o koncentraci 0,5 mg/ml. Koncentrace adsorbovaného proteinu byla stanovena nepřímou metodou ze supernatantu pomocí BCA testu dle kapitoly 3.11.1. Dále byla koncentrace přepočítána dle kalibrační křivky v grafu 1. Na základě stanovené koncentrace byla vypočítána účinnost adsorpce a vazebná kapacita nosiče (Tab. 20).

Tabulka 20: Účinnost adsorpce a vazebná kapacita nosiče vztažená na 2 mg částic z CS/PCL (počet opakování: 3)

| | |
|---------------------------------------|----------------|
| Účinnost adsorpce | 29,64 % |
| Vazebná kapacita částic CS/PCL | 74,1 µg / 2 mg |

V diplomové práci [131] byly připraveny částice z CS/PCL ve stejném poměru 3:1. Účinnost adsorpce 30,99 % vztažena na 4 mg částic (dvojnásobek) je srovnatelná. Výsledky obou prací vykazují hodnoty účinnosti přibližně 1/3 vloženého proteinu, které pro klinické použití nosičového systému nejsou zajímavé.

Ve studii [133] Jesus et al. byly podobnou metodou připraveny částice z CS/PCL. Na částice byl adsorbován roztok ovalbuminu o koncentraci 500 µg/ml. Účinnost adsorpce byla 84 %, což je téměř trojnásobně vyšší hodnota.

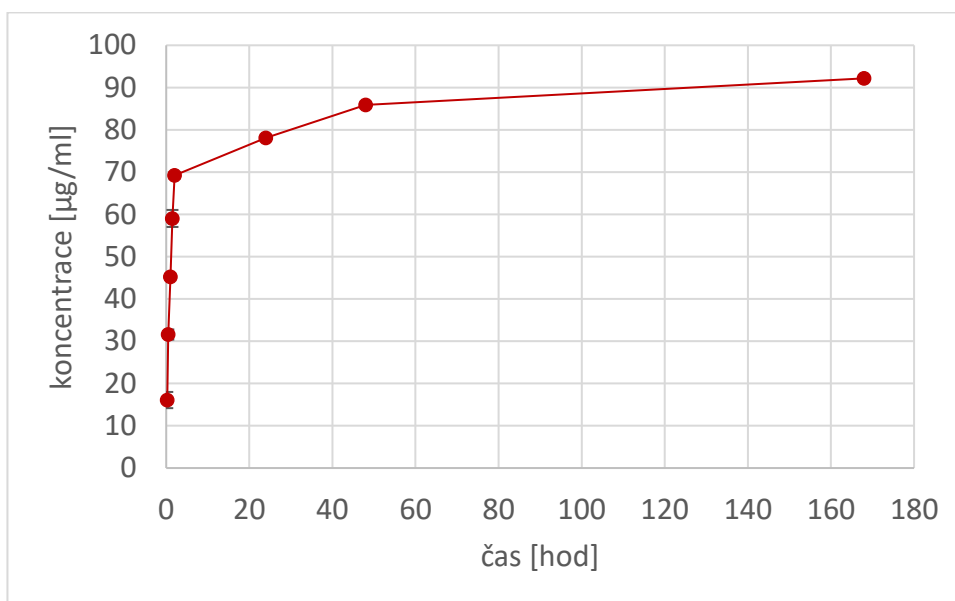
Kinetika uvolňování ovalbuminu z částic z chitosanu/polykaprolaktonu

Submikročástice z CS/PCL s adsorbovaným ovalbuminem byly připraveny dle kapitoly 3.5. a 3.8. a byla sledována kinetika uvolňování proteinu dle kapitoly 3.10. Z částic byly odebírány alikvoty v časech 15, 30, 60, 90, 120 minut, 24 hodin, 48 hodin a 1 týden. Z odebraných alikvotů byla stanovena koncentrace pomocí soupravy MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit dle kapitoly 3.11.3. Koncentrace byla vyhodnocena dle kalibrační křivky grafu 3 (Tab. 21). Kinetika uvolňování ovalbuminu byla vyhodnocena kumulativní metodou. V grafu 6 je znázorněna kinetika uvolňování ovalbuminu z částic z CS/PCL vyjádřena kumulací koncentrace. Množství uvolněného ovalbuminu v procentech bylo vypočítáno dle rovnice 3 [130], [134].

Tabulka 21: Naměřená koncentrace alikvotů uvolněného ovalbuminu z částic z CS/PCL po přechozí adsorpci vyjádřena v koncentracích a v procentech uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)

| Čas | Naměřená koncentrace alikvotů [$\mu\text{g/ml}$] | Naměřené koncentrace alikvotů vyjádřena v procentech [%] |
|-----------|--|--|
| 15 minut | 16,08 | 3,7 |
| 30 minut | 15,5 | 3,57 |
| 60 minut | 13,68 | 3,15 |
| 90 minut | 13,78 | 3,17 |
| 120 minut | 10,21 | 2,35 |
| 24 hodin | 8,84 | 2,04 |
| 48 hodin | 7,77 | 1,79 |
| 1 týden | 6,31 | 1,45 |

Graf 6 Kinetika uvolňování adsorbovaného ovalbuminu z částic z CS/PCL vyjádřena pomocí kumulace hodnot koncentrací uvolněného ovalbuminu (počet opakování: 3)



Nejvíce ovalbuminu bylo uvolněno během prvních dvou hodin a to konkrétně 69,25 µg/ml neboli 15,94 %, poté bylo uvolňování výrazně zpomaleno. Během 1 týdne bylo uvolněno 92,18 µg/ml neboli 21,22 % proteinu, poté byla analýza ukončena. Tato hodnota odpovídá výše uvedené hodnotě účinnosti adsorpce proteinu. Na částicích tedy zůstalo navázáno 30,38 µg/ml neboli 3,29 %. To znamená, že většina proteinu, který byl na částice adsorbován, byla z částic také uvolněna.

4.4. Porovnání účinnosti vazby a uvolňování proteinů z částic

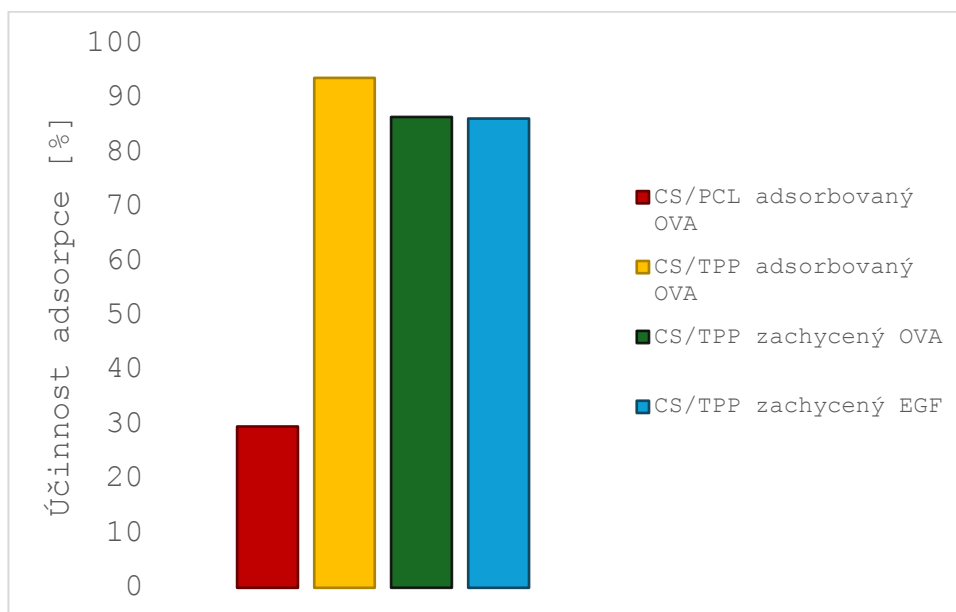
Nejprve byla účinnost vazby částic z CS/TPP, na které byl adsorbován ovalbumin o koncentraci 500 µg/ml. Stejná koncentrace ovalbuminu byla adsorbována na částice z CS/PCL. Poté byla sledována účinnosti zachycení ovalbuminu a EGF o koncentraci 150 µg/ml do struktury částic z CS/TPP. Tato metoda tedy vyžaduje syntézu polymerního nosiče v přítomnosti zachycovaného proteinu.

U těchto čtyř různých systémů byla zkoumána kinetika uvolňování proteinu z částic. Protein byl ve všech případech uvolňován do 5 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,3.

Porovnání účinnosti vazby proteinů na částice z chitosanu/tripolyfosfátu a z chitosanu/polykaprolaktonu

Účinnost vazby částic z CS/TPP a CS/PCL s různě vázanými proteiny ovalbuminem a EGF jsou porovnávány v grafu 7.

Graf 7: Porovnání vazby proteinů ovalbuminu a EGF na částice z CS/PCL a CS/TPP a (počet opakování: 3)



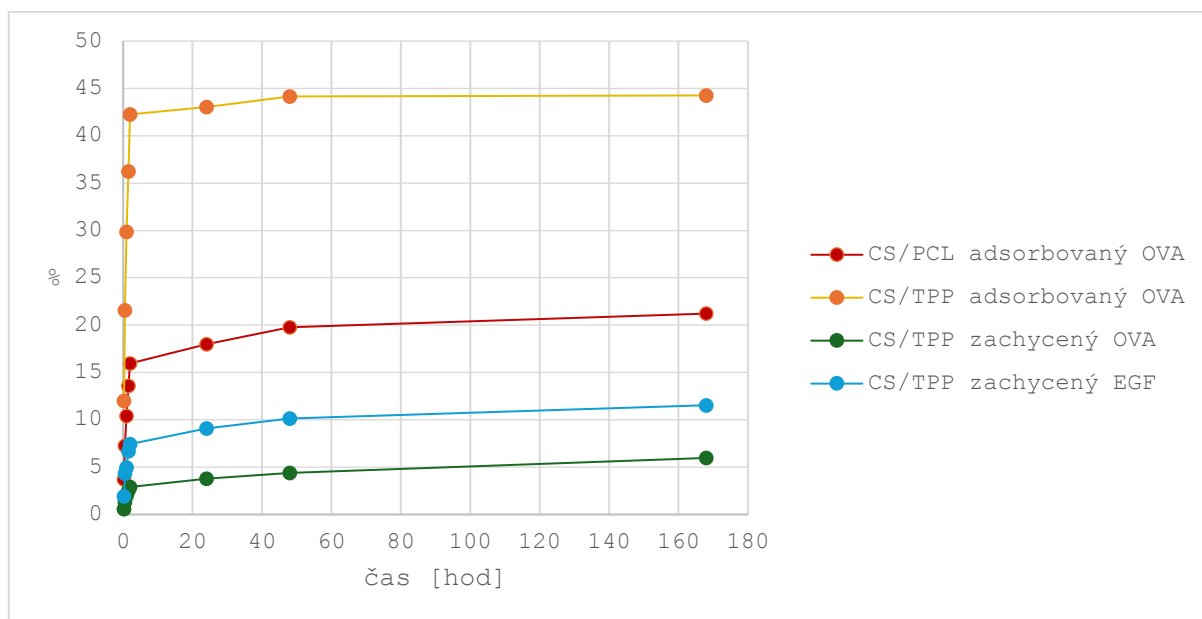
Výrazně větší účinnost adsorpce mají submikročástice z CS/TPP oproti částicím z CS/PCL. To může být způsobeno odlišným síťovacím činidlem, výsledným nábojem částic nebo použitím chitosanu od různých výrobců. Porovnávané částice mají jiný proces výroby a pro přípravu částic z CS/PCL je nutno používat organická činidla, která je pro klinické použití nutno odstranit. Účinnost zachycení ovalbuminu a EGF byly téměř identické.

Nejúčinnější vazba byla adsorpce ovalbuminu na částice z CS/TPP, nejméně účinná byla adsorpce ovalbuminu na částice z CS/TPP.

Porovnání kinetiky uvolňování proteinu adsorbovaného na částice a zachyceného ve struktuře částic

V grafu 8 je znázorněna kinetika uvolňování proteinů z částic a z vyjádřena kumulací procent.

Graf 8: Porovnání kinetiky uvolňování proteinu adsorbovaného na částice a zachyceného ve struktuře částic vyjádřené pomocí kumulace procent uvolněného proteinu (počet opakování: 3)



Z částic z CS/TPP s adsorbovaným ovalbuminem bylo uvolněno 256,53 $\mu\text{g/ml}$ neboli 43,99 % ovalbuminu, což je nejvíce proteinu ze všech zkoumaných systémů. Hlavním důvodem je pravděpodobně vyšší účinnost adsorpce a vazebná kapacita těchto částic. Z částic z PCL bylo uvolněno 92,18 $\mu\text{g/ml}$ neboli 21,2 % adsorbovaného proteinu. Porovnávané částice z CS/PCL mají také jiný proces výroby a pro přípravu těchto částic je nutno používat organická činidla, která je pro klinické použití nutné odstranit.

Koncentrace uvolněného EGF po zachycení do částic z CS/TPP byly přibližně dvakrát větší než koncentrace uvolněného ovalbuminu. Pravděpodobně tomu tak bylo z důvodu různé velikosti proteinů – EGF je menší protein, proto se uvolňuje z částic snadněji. Pro uvolnění veškerého navázaného proteinu by musela být rozrušena struktura částic.

ZÁVĚR

V této diplomové práci byly připraveny dva druhy submikročásteček CS/TPP a CS/PCL a na ně byly navázány proteiny ovalbumin a EGF metodou adsorpce a zachycení. Účinnost vazby a kinetika uvolňování proteinu z částic byly stanoveny pomocí bicinchoninového testu. Pro částice s proteiny byly navrženy a optimalizovány podmínky lyofilizace, díky které si částice mohou zachovat stejné vlastnosti, jako po přípravě. Fyzikálně-chemické vlastnosti částic byly charakterizovány pomocí hydrodynamické velikosti částic DLS a jejího rozptylu PDI a povrchového napětí měřením zeta potenciálu.

Submikročástečky s nejlepšími vlastnostmi byly částice z CS/TPP s adsorbovaným ovalbuminem. U tohoto nosičového systému bez proteinu byly naměřeny nejvhodnější fyzikálně-chemické vlastnosti, suspenze částic byly monodisperzní a stabilní (DLS velikost $223,9 \pm 18,2$ nm, PDI $0,509 \pm 0,149$ a zeta potenciál 45,3 mV). Byly optimalizovány podmínky lyofilizace. Nejúčinnějším kryoprotektivem byla trehalóza o koncentraci 2,5% w/v. Vhodný objem vzorku pro lyofilizaci byl 2 ml, vzorky v tomto byly snadněji rozpuštěny. Vazebná kapacita nosiče byla 274,28 μg / 2 mg částic a účinnost vazby byla 94,52 %, což jsou velmi vysoké hodnoty. Také bylo z částic následně uvolněno nejvyšší množství proteinu ze všech zkoumaných systémů, konkrétně 256,53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ neboli 43,99 %. Pro další experimenty by bylo vhodné dále optimalizovat podmínky lyofilizace a provést lyofilizaci s adsorbovaným proteinem.

Metoda zachycení proteinu má také potenciál pro využití jako systémy cíleného doručování léčiv. Částice se zachyceným ovalbuminem i EGF byly monodisperzní a stabilní. Vazebná kapacita nosiče měla u obou částic hodnotu přibližně 65 μg / 2 ml částic a účinnost vazby byla u obou částic přibližně 86 %, což jsou přijatelné hodnoty. Ovšem uvolňování proteinu ze struktury částic bylo nízké a protein byl uvolňován pouze mechanismem difúze. To se dá využít všude tam, kde je žádoucí, aby byl protein uvolňován velmi pomalu. Pro další experimenty by bylo vhodné optimalizovat postup eroze částic pro postupné uvolnění proteinu a optimalizovat podmínky lyofilizace.

Suspenze částic z CS/PCL byly polydisperzní a během procesu lyofilizace vznikaly velké agregáty. Vazebná kapacita nosiče a účinnost adsorpce dosahovaly nízkých hodnot, také bylo z částic následně uvolněno velmi malé množství proteinu. Pro další experimenty by bylo vhodné optimalizovat postup jejich přípravy a podmínky lyofilizace.

ZDROJE LITERATURY

1. ANSELMO, Aaron C. a MITRAGOTRI, Samir. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. Online. *Journal of Controlled Release*. 2014, roč. 190. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.053>.
2. SUNG, Yong Kiel a KIM, Sung Wan. Recent advances in polymeric drug delivery systems. Online. *Biomaterials Research*. 2020, roč. 24. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00190-7>.
3. AMINU, Nafiu; BELLO, Idris; UMAR, Nura Muhammad; TANKO, Nuhu; AMINU, Abdulmalik et al. The influence of nanoparticulate drug delivery systems in drug therapy. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020, roč. 60. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101961>.
4. NIAZI, Sarfaraz K. Non-Invasive Drug Delivery across the Blood–Brain Barrier: A Prospective Analysis. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112599>.
5. RAMPINO, Antonio; BORGOGNA, Massimiliano; BLASI, Paolo; BELLICH, Barbara a CESÀRO, Attilio. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, roč. 455. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>.
6. JIN, Zheng; GAO, Shuang; CUI, Xianlan; SUN, Dejun a ZHAO, Kai. Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019, roč. 572. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118731>.
7. SAGHAZADEH, Saghi; RINOLDI, Chiara; SCHOT, Maik; KASHAF, Sara Saheb; SHARIFI, Fatemeh et al. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, roč. 127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>.
8. KANG, Sun-Woong, Jong-Jin CHOI, Ha-Na KIM, et al. EGF-Loaded Hyaluronic Acid Based Microparticles as Effective Carriers in a Wound Model. Online. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2017, roč. 34. Dostupné z: [doi:10.1002/ppsc.201600320](https://doi.org/10.1002/ppsc.201600320).

9. JIANG, Hui; WU, Hong; XU, Ying-long; WANG, Jing-zhou a ZENG, Yong. Preparation of galactosylated chitosan/tripolyphosphate nanoparticles and application as a gene carrier for targeting SMMC7721 cells. Online. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, roč. 111. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.01.012>.
10. HALEY, Rebecca M.; GOTTARDI, Riccardo; LANGER, Robert a MITCHELL, Michael J. Cyclodextrins in drug delivery: applications in gene and combination therapy. Online. *Drug Delivery and Translational Research*. 2020, roč. 10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00724-5>.
11. PAN, Xiuhua; VERONIAINA, Hanitrarimalala; SU, Nan; SHA, Kang; JIANG, Fenglin et al. Applications and developments of gene therapy drug delivery systems for genetic diseases. Online. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, roč. 16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.05.003>.
12. AMINU, Nafiu; ILYASU, Salim; AL-KASSIM HASSAN, Mohammed; KURFI, Fatima Shuaibu; JATAU, Abubakar Ibrahim et al. Applications of nanofibers drug delivery system in cancer therapy. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023, roč. 90. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105128>.
13. FANG, Xiaolin; CAO, Jiaojiao a SHEN, Aizong. Advances in anti-breast cancer drugs and the application of nano-drug delivery systems in breast cancer therapy. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020, roč. 57. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101662>.
14. NICULESCU, Adelina-Gabriela a GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Polymer-Based Nanosystems—A Versatile Delivery Approach. Online. *Materials*. 2021, roč. 14. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma14226812>.
15. HARUN-OR-RASHID, Md.; AKTAR, Most. Nazmin; HOSSAIN, Md. Sabbir; SARKAR, Nadia; ISLAM, Md. Rezaul et al. Recent Advances in Micro- and Nano-Drug Delivery Systems Based on Natural and Synthetic Biomaterials. Online. *Polymers*. 2023, roč. 15, Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15234563>.
16. PRAJAPATI, Shiv Kumar; JAIN, Ankit; JAIN, Aakanchha a JAIN, Sourabh. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. Online. *European Polymer Journal*. 2019, roč. 120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.018>.

17. ZHAO, Zongmin; UKIDVE, Anvay; KRISHNAN, Vinu a MITRAGOTRI, Samir. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019, roč. 143. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.002>.
18. DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAIEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Online. *Pharmaceutics*. 2018, roč. 10. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
19. LAGARRIGUE, Prescillia; MONCALVO, Filippo a CELLESI, Francesco. Non-spherical Polymeric Nanocarriers for Therapeutics: The Effect of Shape on Biological Systems and Drug Delivery Properties. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010032>.
20. SHARMA, Gaurav; VALENTA, David T.; ALTMAN, Yoav; HARVEY, Sheryl; XIE, Hui et al. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. Online. *Journal of Controlled Release*. 2010, roč. 147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.116>.
21. ZHANG, Mingzhen; CHEN, Xiaoxiao; LI, Chao a SHEN, Xian. Charge-reversal nanocarriers: An emerging paradigm for smart cancer nanomedicine. Online. *Journal of Controlled Release*. 2020, roč. 319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.024>.
22. SUN, Qingmei; ZHU, Yunqing a DU, Jianzhong. Recent progress on charge-reversal polymeric nanocarriers for cancer treatments. Online. *Biomedical Materials*. 2021, roč. 16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/abffb5>.
23. ZHANG, Min; GUO, Xinli; WANG, Mingfu a LIU, Kehai. Tumor microenvironment-induced structure changing drug/gene delivery system for overcoming delivery-associated challenges. Online. *Journal of Controlled Release*. 2020, roč. 323. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.026>.
24. DUAN, Xiaopin a LI, Yaping. Physicochemical Characteristics of Nanoparticles Affect Circulation, Biodistribution, Cellular Internalization, and Trafficking. Online. *Small*. 2013, roč. 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/sml.201201390>.
25. SIVANESAN, Iyyakkannu; TASNEEM, Shadma; HASAN, Nazim; SHIN, Juhyun; MUTHU, Manikandan et al. Surveying the Oral Drug Delivery Avenues of Novel Chitosan Derivatives. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14112131>.

26. HUANG, Gangliang a HUANG, Hualiang. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. Online. Drug Delivery. 2018, roč. 25. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1450910>.
27. HUANG, Gangliang a HUANG, Hualiang. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. Online. Journal of Controlled Release. 2018, roč. 278. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.015>.
28. HARIYADI, Dewi Melani a ISLAM, Nazrul. Current Status of Alginate in Drug Delivery. Online. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. 2020, roč. 2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2020/8886095>.
29. PUTRI, Arlina Prima; PICCHIONI, Francesco; HARJANTO, Sri a CHALID, Mochamad. Alginate Modification and Lectin-Conjugation Approach to Synthesize the Mucoadhesive Matrix. Online. Applied Sciences. 2021, roč. 11. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app112411818>.
30. BOONPRAKONG, Pornpailin; PHASUKSOM, Katesara; MORARAD, Rawita; SAKUNPONGPITIPORN, Phimchanok; PARINYANITIKUL, Napa et al. Polyindole: poly(4-styrenesulfonic acid) loaded agarose hydrogel for methotrexate sodium transdermal delivery via iontophoresis. Online. European Polymer Journal. 2024, roč. 202. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112607>.
31. KOLANTHAI, Elayaraja; GANESAN, Kathirvel; EPPLE, Matthias a KALKURA, S. Narayana. Synthesis of nanosized hydroxyapatite/agarose powders for bone filler and drug delivery application. Online. Materials Today Communications. 2016, roč. 8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2016.03.008>.
32. HU, Qiaobin; LU, Yingjian a LUO, Yangchao. Recent advances in dextran-based drug delivery systems: From fabrication strategies to applications. Online. Carbohydrate Polymers. 2021, roč. 264. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117999>.
33. BANERJEE, Aparna a BANDOPADHYAY, Rajib. Use of dextran nanoparticle: A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications. Online. International Journal of Biological Macromolecules. 2016, roč. 87. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.059>.
34. HASAN, Nurhasni; RAHMAN, Latifah; KIM, So-Hyeon; CAO, Jiafu; ARJUNA, Andi et al. Recent advances of nanocellulose in drug delivery systems. Online. Journal of Pharmaceutical Investigation. 2020, roč. 50. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40005-020-00499-4>.

35. VOICU, Georgeta; GEANALIU-NICOLAE, Ruxandra-Elena; PÎRVAN, Adrian-Alexandru; ANDRONESCU, Ecaterina a IORDACHE, Florin. Synthesis, characterization and bioevaluation of drug-collagen hybrid materials for biomedical applications. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, roč. 510. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.054>.
36. WANG, Hailin; LU, Wei; KE, Lijing; WANG, Yi; ZHOU, Jianwu et al. Effect of hydroxychloroquine sulfate on the gelation behavior, water mobility and structure of gelatin. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2022, roč. 633. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127849>.
37. SAINI, P.; ARORA, M. a KUMAR, M.N.V. Ravi. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, roč. 107. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.014>.
38. VLACHOPOULOS, Antonios; KARLIOTI, Georgia; BALLA, Evangelia; DANILIDIS, Vasileios; KALAMAS, Theocharis et al. Poly(Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery Applications: An Overview of Recent Advances. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020359>.
39. D'SOUZA, Anisha A. a SHEGOKAR, Ranjita. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. Online. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016, roč. 13. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>.
40. ENGLERT, Christoph; BRENDDEL, Johannes C.; MAJDANSKI, Tobias C.; YILDIRIM, Turgay; SCHUBERT, Stephanie et al. Pharmapolymers in the 21st century: Synthetic polymers in drug delivery applications. Online. *Progress in Polymer Science*. 2018, roč. 87. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.005>.
41. BEN SEGHIR, Bachir a BENHAMZA, M. H. Preparation, optimization and characterization of chitosan polymer from shrimp shells. Online. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017, roč. 11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9490-9>.
42. CHEN, Gang; MI, Jie; WU, Xiaohou; LUO, ChunLi; LI, JiaBing et al. Structural features and bioactivities of the chitosan. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011, roč. 49. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.06.009>.

43. EL KNIDRI, Hakima; BELAABED, Raja; ADDAOU, Abdellah; LAAJEB, Ali a LAHSINI, Ahmed. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, roč. 120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>.
44. SAMI EL-BANNA, Fatma; MAHFOUZ, Magdy Elsayed; LEPORATTI, Stefano; EL-KEMARY, Maged a A. N. HANAFY, Nemany. Chitosan as a Natural Copolymer with Unique Properties for the Development of Hydrogels. Online. *Applied Sciences*. 2019, roč. 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app9112193>. [cit. 2024-02-19].
45. RODRIGUES, Susana; DIONÍSIO, Marita; LÓPEZ, Carmen Remuñán a GRENHA, Ana. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. Online. *Journal of Functional Biomaterials*. 2012, roč. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jfb3030615>.
46. JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TOKURA, S. a TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007, roč. 40. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.06.021>.
47. SZYMAŃSKA, Emilia a WINNICKA, Katarzyna. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. Online. *Marine Drugs*. 2015, roč. 13. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md13041819>.
48. SHOUEIR, Kamel R.; EL-DESOUKY, Nagwa; RASHAD, Moataz M.; AHMED, M.K.; JANOWSKA, Izabela et al. Chitosan based-nanoparticles and nanocapsules: Overview, physicochemical features, applications of a nanofibrous scaffold, and bioprinting. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, roč. 167. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.072>.
49. KUMAR, Vinay; SHARMA, Neha; JANGHU, Poonam; PASRIJA, Ritu; UMESH, Mridul et al. Synthesis and characterization of chitosan nanofibers for wound healing and drug delivery application. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104858>.
50. CHEN, Lemin; DENG, Xueliang; TIAN, Liangyi; XIE, Jihuan; XIANG, Yilei et al. Preparation and properties of chitosan/dialdehyde sodium alginate/dopamine magnetic drug-delivery hydrogels. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2024, roč. 680. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.132739>.

51. VASHIST, Arti; GUPTA, Y.K. a AHMAD, Sharif. Interpenetrating biopolymer network based hydrogels for an effective drug delivery system. Online. Carbohydrate Polymers. 2012, roč. 87. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.030>.
52. HUANG, Gangliang; LIU, Yang a CHEN, Ling. Chitosan and its derivatives as vehicles for drug delivery. Online. Drug Delivery. 2017, roč. 24. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1399305>.
53. WANG, Xu; JIA, Wenhao; YANG, Congren; HE, Rui; JIAO, Fen et al. Innovative application of sodium tripolyphosphate for the flotation separation of scheelite from calcite. Online. Minerals Engineering. 2021, roč. 170. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.106981>.
54. GURSES, M. Sadi; ERKEY, Can; KIZILEL, Seda a UZUN, Alper. Characterization of sodium tripolyphosphate and sodium citrate dehydrate residues on surfaces. Online. Talanta. 2018, roč. 176. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.092>.
55. PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; GASPAR, C.; SILVESTRE, S.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. et al. Sodium Tripolyphosphate: An excipient with intrinsic in vitro anti-Candida activity. Online. International Journal of Pharmaceutics. 2011, roč. 421. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.030>.
56. BODMEIER, Roland; CHEN, Huagang a PAERATAKUL, Ornlaksana. Novel Approach to the Oral Delivery of Micro- or Nanoparticles. Online. Pharmaceutical Research. 1989 roč. 06. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1015987516796>.
57. HANDAYANI, Noer Abyor; KRISANTI, Elsa Anisa; KARTOHARDJONO, Sutrasno a MULIA, Kamarza. Cyclic Voltammetry and Oxidation Rate Studies of Ferrous Gluconate Complex Solutions for Preparation of Chitosan-Tripolyphosphate Microparticles. Online. Journal of Chemistry. 2020, roč. 2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2020/3417204>.
58. SACCO, Pasquale; PAOLETTI, Sergio; COK, Michela; ASARO, Fioretta; ABRAMI, Michela et al. Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. Online. International Journal of Biological Macromolecules. 2016, roč. 92. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.056>.

59. BOCCHETTA, Patrizia. Ionotropic Gelation of Chitosan for Next-Generation Composite Proton Conducting Flat Structures. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25071632>.
60. SHENVI, Seema; ISMAIL, A.F. a ISLOOR, Arun M. Preparation and characterization study of PPEES/chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate. Online. *Desalination*. 2014, roč. 344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.02.026>.
61. HASANOVIC, Amra; ZEHL, Martin; REZNICEK, Gottfried a VALENTA, Claudia. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability. Online. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009, roč. 61. Dostupné z: <https://doi.org/10.1211/jpp.61.12.0004>.
62. BORGES, Olga; TAVARES, Joana; DE SOUSA, Adriano; BORCHARD, Gerrit; JUNGINGER, Hans E. et al. Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, roč. 32. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.08.005>.
63. AGARDAN, Mutlu. Studies on the formulation optimization and controlled ionic gelation of chitosan nanoparticles using TPP-HP- β -CD inclusion complex. Online. *ISTANBUL JOURNAL OF PHARMACY*. 2020, roč. 50. Dostupné z: <https://doi.org/10.26650/IstanbulJPharm.2019.0015>.
64. CANNAVÀ, Carmela; DE GAETANO, Federica; STANCANELLI, Rosanna; VENUTI, Valentina; PALADINI, Giuseppe et al. Chitosan-Hyaluronan Nanoparticles for Vinblastine Sulfate Delivery: Characterization and Internalization Studies on K-562 Cells. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050942>.
65. *Infekční choroby, proti kterým se v ČR očkuje*. Online. In: BERAN, Jiří. *Očkovací kalendář*. Dostupné z: <https://www.ockovaci-kalendar.cz/infekcni-choroby-proti-kterym-se-v-cr-ockuje>.
66. SHAKYA, Akhilesh Kumar; CHOWDHURY, Mohammed Y.E.; TAO, Wenqian a GILL, Harvinder Singh. Mucosal vaccine delivery: Current state and a pediatric perspective. Online. *Journal of Controlled Release*. 2016, roč. 240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.014>.
67. SAWAENGSAK, Chompoonuch; MORI, Yasuko; YAMANISHI, Koichi; MITREVEJ, Ampol a SINCHAIPANID, Nuttanan. Chitosan Nanoparticle Encapsulated

- Hemagglutinin-Split Influenza Virus Mucosal Vaccine. Online. AAPS PharmSciTech. 2014, roč. 15. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0058-7>.
68. DAVIS, S.S. Nasal vaccines. Online. Advanced Drug Delivery Reviews. 2001, roč. 51. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00162-4).
69. KIYONO, Hiroshi a FUKUYAMA, Satoshi. NALT- versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity. Online. Nature Reviews Immunology. 2004, roč. 4. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nri1439>.
70. DESHPANDE, Monica V.; GIRASE, Arjunsing a KING, Martin W. Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) Resorbable Multifilament Yarn under Physiological Conditions. Online. Polymers. 2023, roč. 15. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15183819>.
71. SCHLESINGER, Erica; CIACCIO, Natalie a DESAI, Tejal A. Polycaprolactone thin-film drug delivery systems: Empirical and predictive models for device design. Online. Materials Science and Engineering: C. 2015, roč. 57. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.027>.
72. WONG, Bin Sheng; TEOH, Swee-Hin a KANG, Lifeng. Polycaprolactone scaffold as targeted drug delivery system and cell attachment scaffold for postsurgical care of limb salvage. Online. Drug Delivery and Translational Research. 2012, roč. 2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0096-9>.
73. ZHOU, Nuo; ZAN, Xiaoli; WANG, Zheng; WU, Hua; YIN, Dengke et al. Galactosylated chitosan-polycaprolactone nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of curcumin. Online. Carbohydrate Polymers. 2013, roč. 94. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.014>.
74. AHMADY, Azin Rashidy; SOLOUK, Atefeh; SABER-SAMANDARI, Saeed; AKBARI, Somaye; GHANBARI, Hadi et al. Capsaicin-loaded alginate nanoparticles embedded polycaprolactone-chitosan nanofibers as a controlled drug delivery nanoplatform for anticancer activity. Online. Journal of Colloid and Interface Science. 2023, roč. 638. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.01.139>.

75. LÓPEZ-GONZÁLEZ, Iván; HERNÁNDEZ-HEREDIA, Ana Belén; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, María Isabel; AUÑÓN-CALLES, David; BOUDIFA, Mohamed et al. Evaluation of the In Vitro Antimicrobial Efficacy against *Staphylococcus aureus* and epidermidis of a Novel 3D-Printed Degradable Drug Delivery System Based on Polycaprolactone/Chitosan/Vancomycin—Preclinical Study. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061763>.
76. SIDDIQUI, Nadeem; KISHORI, Braja; RAO, Saranya; ANJUM, Mohammad; HEMANTH, Venkata et al. Electropun Polycaprolactone Fibres in Bone Tissue Engineering: A Review. Online. *Molecular Biotechnology*. 2021, roč. 63. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00311-0>.
77. ARTIOLI, Y. Adsorption. Online. *Encyclopedia of Ecology*. 2008. ISBN 9780080454054. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00252-4>.
78. RABE, Michael; VERDES, Dorinel a SEEGER, Stefan. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011, roč. 162. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007>.
79. SIT, Izaac; XU, Zhenzhu a GRASSIAN, Vicki H. Plasma protein adsorption on TiO₂ nanoparticles: Impact of surface adsorption on temperature-dependent structural changes. Online. *Polyhedron*. 2019, roč. 171. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.06.036>.
80. BREMER, Maria G.E.G.; DUVAL, Jérôme; NORDE, Willem a LYKLEMA, Johannes. Electrostatic interactions between immunoglobulin (IgG) molecules and a charged sorbent. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2004, roč. 250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.05.026>.
81. GÓRECKA, Elżbieta a JASTRZEBSKA, Magdalena. Immobilization techniques and biopolymer carriers. Online. *Biotechnology and Food Science*. 2011, roč. 17. Dostupné z: <https://doi.org/10.34658/bfs.2011.75.1.65-86>.
82. RIBEIRO, Eduardo Silveira; DE FARIAS, Bruna Silva; SANT'ANNA CADAVAL JUNIOR, Tito Roberto; DE ALMEIDA PINTO, Luiz Antonio a DIAZ, Patrícia Silva. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, roč. 183. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214>.

83. BEHANČÍNOVÁ, Petra. Vývoj chitosanových nanomateriálů s ligandem pro regenerativní medicínu. Diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2019.
84. HASSAN, M., TAMER, T. M., OMER, A. M. Methods of Enzyme Immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*. 2016, roč. 7.
85. SILVA, Pablo Teixeira da; FRIES, Leadir Lucy Martins; MENEZES, Cristiano Ragagnin de; HOLKEM, Augusto Tasch; SCHWAN, Carla Luisa et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. Online. *Ciência Rural*. 2014, roč. 44. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>.
86. SINGH, M.N., HEMANT, K.S.Y., RAM, M., SHIVAKUMAR, H.G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2010, roč. 5.
87. KAMALY, Nazila; YAMEEN, Basit; WU, Jun a FAROKHZAD, Omid C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. Online. *Chemical Reviews*. 2016, roč. 116. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.
88. JEONG, Wooyoung; KIM, Jinyoung; BAZER, Fuller W. a SONG, Gwonhwa. Epidermal growth factor stimulates proliferation and migration of porcine trophectoderm cells through protooncogenic protein kinase 1 and extracellular-signal-regulated kinases 1/2 mitogen-activated protein kinase signal transduction cascades during early pregnancy. Online. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013, roč. 381. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.024>.
89. TANG, Xiaopeng; LIU, Hu; YANG, Shufen; LI, Zuohua; ZHONG, Jinfeng et al. Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function. Online. *Mediators of Inflammation*. 2016, roč. 2016. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2016/1927348>.
90. ZENG, Fenghua a HARRIS, Raymond C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. Online. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014, roč. 28. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.011>.
91. LI, Yue; LENG, QingQing; PANG, XianLun; SHI, Huan; LIU, YanLin et al. Therapeutic effects of EGF-modified curcumin/chitosan nano-spray on wound healing. Online. *Regenerative Biomaterials*. 2021, roč. 8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/rb/rbab009>.

92. SHEN, Congcong; SUN, Linlin; ZHU, Ningwen a QI, Fazhi. Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing. Online. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017, roč. 39. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2911>.
93. TANAKA, Akane; NAGATE, Toshiaki a MATSUDA, Hiroshi. Acceleration of Wound Healing by Gelatin Film Dressings with Epidermal Growth Factor. Online. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2005, roč. 67. Dostupné z: <https://doi.org/10.1292/jvms.67.909>.
94. KAROW, Anne R.; GÖTZL, Jana a GARIDEL, Patrick. Resolving power of dynamic light scattering for protein and polystyrene nanoparticles. Online. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2015, roč. 20. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.910808>.
95. ZANETTI-RAMOS, Betina Giehl; FRITZEN-GARCIA, Mauricia Beddin; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz; OLIVEIRA, Cristian Schweitzer De; PASA, André Avelino et al. Characterization of Polymeric Particles with Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering, and Atomic Force Microscopy. Online. *Particulate Science and Technology*. 2010, roč. 28. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/02726351.2010.504133>.
96. THANDAPANI, Gomathi; P., Supriya Prasad; P.N., Sudha a SUKUMARAN, Anil. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, roč. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.057>.
97. DE LA CALLE, Inmaculada; SOTO-GÓMEZ, Diego; PÉREZ-RODRÍGUEZ, Paula a LÓPEZ-PERIAGO, J. Eugenio. Particle Size Characterization of Sepia Ink Eumelanin Biopolymers by SEM, DLS, and AF4-MALLS: a Comparative Study. Online. *Food Analytical Methods*. 2019, roč. 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01448-0>.
98. FILIPE, Vasco; HAWE, Andrea a JISKOOT, Wim. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. Online. *Pharmaceutical Research*. 2010, roč. 27. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.

99. INKSON, B.J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. Online. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. 2016, s. 17-43. ISBN 9780081000403. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>.
100. BOUZAKHER-GHOMRASNI, Najoua; TACHÉ, Olivier; LEROY, Jocelyne; FELTIN, Nicolas; TESTARD, Fabienne et al. Dimensional measurement of TiO₂ (Nano) particles by SAXS and SEM in powder form. Online. *Talanta*. 2021, roč. 234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122619>.
101. SAWTARIE, Nader; CAI, Yuhang a LAPITSKY, Yakov. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, roč. 157. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.055>.
102. ZHANG, Siqi; ZHOU, Zhen; QI, Jia; GUO, Kangkang; NIU, Chenchen et al. The enhancement effect of surface charges on forward and backward scattering of submicron polydisperse particles. Online. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2020, roč. 253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2020.107132>.
103. BENAMER OUDIH, Samah; TAHTAT, Djamel; NACER KHODJA, Assia; MAHLOUS, Mohamed; HAMMACHE, Yasmina et al. Chitosan nanoparticles with controlled size and zeta potential. Online. *Polymer Engineering and Science*. 2023, roč. 63. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pen.26261>.
104. KAASALAINEN, Martti; MÄKILÄ, Ermei; RIIKONEN, Joakim; KOVALAINEN, Miia; JÄRVINEN, Kristiina et al. Effect of isotonic solutions and peptide adsorption on zeta potential of porous silicon nanoparticle drug delivery formulations. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, roč. 431. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.059>.
105. MORRIS, Gordon A.; CASTILE, Jonathan; SMITH, Alan; ADAMS, Gary G. a HARDING, Stephen E. The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 84. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.044>.

106. SLOVÁKOVÁ, Marcela; JÁNOVSKÁ, Sylva; ŠLEHA, Radek; RADOCHOVÁ, Věra; HATALA, Alexandra et al. Nasal Immunization Using Chitosan Nanoparticles with Glycoprotein B of Murine Cytomegalovirus. Online. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024, roč. 34. Dostupné z: <https://doi.org/10.4014/jmb.2308.08008>.
107. TSAI, Min-Lang; CHEN, Rong-Huei; BAI, Shi-Wei a CHEN, Wei-Yu. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 84. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.040>.
108. BUTREDDY, Arun; DUDHIPALA, Narendar; JANGA, Karthik Yadav a GADDAM, Rajendra Prasad. Lyophilization of Small-Molecule Injectables: an Industry Perspective on Formulation Development, Process Optimization, Scale-Up Challenges, and Drug Product Quality Attributes. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2020, roč. 21. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01787-w>.
109. LIU, Yang; ZHANG, Zhengyu a HU, Liandong. High efficient freeze-drying technology in food industry. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022, roč. 62. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1865261>.
110. ARORA, Sanchit; DASH, Sanat Kumar; DHAWAN, Dimple; SAHOO, Prabhat Kumar; JINDAL, Anil et al. Freeze-drying revolution: unleashing the potential of lyophilization in advancing drug delivery systems. Online. *Drug Delivery and Translational Research*. 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01477-7>.
111. ABDELWAHED, W; DEGOBERT, G; STAINMESSE, S a FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, roč. 58. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>.
112. FONTE, Pedro; REIS, Salette a SARMENTO, Bruno. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. Online. *Journal of Controlled Release*. 2016, roč. 225. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.034>.
113. DIOP, M.; AUBERVAL, N.; VICIGLIO, A.; LANGLOIS, A.; BIETIGER, W. et al. Design, characterisation, and bioefficiency of insulin–chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, roč. 491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.065>.

114. COSTA, Eduardo M.; SILVA, Sara a PINTADO, Manuela. Chitosan Nanoparticles Production: Optimization of Physical Parameters, Biochemical Characterization, and Stability upon Storage. Online. Applied Sciences. 2023, roč. 13. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app13031900>.
115. PATEL, Sajal Manubhai a PIKAL, Michael J. Emerging Freeze-Drying Process Development and Scale-up Issues. Online. AAPS PharmSciTech. 2011, roč. 1. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9599-9>.
116. ALMALIK, Abdulaziz; ALRADWAN, Ibrahim; KALAM, Mohd Abul a ALSHAMSAN, Aws. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. Online. Saudi Pharmaceutical Journal. 2017, roč. 25. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.008>.
117. LIU, Zhenlei; YANG, Wenge; WEI, Huamao; DENG, Shanggui; YU, Xunxin et al. The mechanisms and applications of cryoprotectants in aquatic products: An overview. Online. Food Chemistry. 2023, roč. 408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135202>.
118. STEFANELLO, Raquel Facco; MACHADO, Amanda Aimée Rosito; PASQUALIN CAVALHEIRO, Carlos; BARTHOLOMEI SANTOS, Marlise Ladvoat; NABESHIMA, Elizabeth Harumi et al. Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. Online. LWT. 2018, roč. 89. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.011>.
119. RAO, Wei; HUANG, Haishui; WANG, Hai; ZHAO, Shuting; DUMBLETON, Jenna et al. Nanoparticle-Mediated Intracellular Delivery Enables Cryopreservation of Human Adipose-Derived Stem Cells Using Trehalose as the Sole Cryoprotectant. Online. 2015, roč. 7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00655>.
120. PARIHAR, Arpana; KUMAR, Avinash; PANDA, Udweh; KHAN, Rukhsar; PARIHAR, Dipesh Singh et al. Cryopreservation: A Comprehensive Overview, Challenges, and Future Perspectives. Online. Advanced Biology. 2023, roč. 7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adbi.202200285>.
121. KIKUTA, Shingo a MIN, Kyung-Jin. Response of Tribolium castaneum to dietary mannitol, with remarks on its possible nutritive effects. Online. PLOS ONE. 2018, roč. 13. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207497>.

122. THAKRAL, Seema; SONJE, Jayesh; MUNJAL, Bhushan; BHATNAGAR, Bakul a SURYANARAYANAN, Raj. Mannitol as an Excipient for Lyophilized Injectable Formulations. Online. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023, roč. 112. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.08.029>.
123. KUMAR, Krishna N.; MALLIK, Sanku a SARKAR, Kausik. Role of freeze-drying in the presence of mannitol on the echogenicity of echogenic liposomes. Online. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2017, roč. 142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1121/1.5017607>.
124. KATAS, H; HUSSAIN, Z a RAHMAN, SA. Storage Stabilisation of Albumin-Loaded Chitosan Nanoparticles by Lyoprotectants. Online. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013, roč. 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.1>.
125. AL-KATTAN, Ahmed; DUFOUR, Pascal a DROUET, Christophe. Purification of biomimetic apatite-based hybrid colloids intended for biomedical applications: A dialysis study. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, roč. 82. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.09.022>.
126. TEHRANI, Soudeh F.; BHARADWAJ, Priyanshu; LEBLOND CHAIN, Jeanne a ROULLIN, V. Gaëlle. Purification processes of polymeric nanoparticles: How to improve their clinical translation? Online. *Journal of Controlled Release*. 2023, roč. 360. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.06.038>.
127. LASSENBERGER, Andrea; BIXNER, Oliver; GRUENEWALD, Tilman; LICHTENEGGER, Helga; ZIRBS, Ronald et al. Evaluation of High-Yield Purification Methods on Monodisperse PEG-Grafted Iron Oxide Nanoparticles. Online. *Langmuir*. 2016, roč. 32. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00919>.
128. LUO, Jingyi; WU, Cuiming; XU, Tongwen a WU, Yonghui. Diffusion dialysis-concept, principle and applications. Online. *Journal of Membrane Science*. 2011, roč. 366. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.10.028>.
129. LEO, Eliana; CAMERONI, Riccardo a FORNI, Flavio. Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin–gelatin nanoparticle conjugates. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, roč. 180. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00401-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00401-3).
130. HEŘMÁNKOVÁ, Zuzana. Částice z chitosanu v kombinaci s SiO₂ mikrovlákny v cíleném doručování látek. Diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2023.
131. BOLKOVÁ, Alexandra. Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici. Diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2021.

132. JESUS, S.; BORCHARD, G. a BORGES, O. Freeze Dried Chitosan/ Poly- ϵ -Caprolactone and Poly- ϵ -Caprolactone Nanoparticles: Evaluation of their Potential as DNA and Antigen Delivery Systems. Online. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*. 2013, roč. 4. Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000164>.
133. JESUS, Sandra; FRAGAL, Elizangela H.; RUBIRA, Adley F.; MUNIZ, Edvani C.; VALENTE, Artur J. M. et al. The Inclusion of Chitosan in Poly- ϵ -caprolactone Nanoparticles: Impact on the Delivery System Characteristics and on the Adsorbed Ovalbumin Secondary Structure. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2018, roč. 19. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0822-1>.
134. KAHYA, Nilay a ERIM, F. Bedia. Surfactant modified alginate composite gels for controlled release of protein drug. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2019, roč. 224. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115165>.
135. P01012 · OVAL_CHICK. Online. In: UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P01012/entry>. [cit. 2024-04-22].
136. Pro-epidermal growth factor. Online. In: PhosphoSitePlus®. 2003. Dostupné z: <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=1027300&showAllSites=true>. [cit. 2024-04-24].
137. EGF Human. Online. ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. 2016. Dostupné z: https://www.prospecbio.com/egf_human. [cit. 2024-04-24].
138. HASHEMI, Saadeh; MIHANDOOST, Elnaz a KHALEGHI, Sepideh. Preparation of chitosan-embedded recombinant human epidermal growth factor nanoparticles as accelerating compounds for skin remodelling in chronic lesions. Online. 2023, roč. 18. Dostupné z: <https://doi.org/10.1049/mna2.12171>.

PŘÍLOHY

Příloha A: Výsledky měření DLS, PDI a zeta potenciálu vzorků částic v tripletu

Tabulka 22: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|---------------|---------------|------|-------|-------|---------------------|-----|
| 1 | 242,1 | 11,9 | 0,437 | 0,054 | 44,8 | 3 |
| 2 | 230,5 | 10,7 | 0,717 | 0,106 | 47,6 | 2,9 |
| 3 | 199 | 3,6 | 0,373 | 0,041 | 43,8 | 7,3 |
| průměr | 223,9 | 18,2 | 0,509 | 0,149 | 45,4 | 1,6 |

Tabulka 23: Vliv objemu na vlastnosti CS/TPP částic po lyofilizaci s trehalózou (2,5 % w/v) po filtraci

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|-------------------------------------|---------------|------|-------|-------|---------------------|-----|
| CS/TPP, TRE, 2,5 % w/v, 5 ml | | | | | | |
| 1 | 192,8 | 4,2 | 0,387 | 0,033 | 41,2 | 4,7 |
| 2 | 181,1 | 3,9 | 0,392 | 0,017 | 40,1 | 1,5 |
| 3 | 158,1 | 4,8 | 0,389 | 0,043 | 39,4 | 4,2 |
| průměr | 177,3 | 14,4 | 0,389 | 0,002 | 40,2 | 0,7 |
| CS/TPP, TRE, 2,5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 165,8 | 4,2 | 0,357 | 0,049 | 46,4 | 4,1 |
| 2 | 177,4 | 6,4 | 0,407 | 0,084 | 39,6 | 2,4 |
| 3 | 151,6 | 2,7 | 0,356 | 0,031 | 39 | 2,5 |
| průměr | 164,9 | 10,6 | 0,373 | 0,024 | 41,7 | 3,4 |

Tabulka 24: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě a po dialýze v destilované vodě

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|---|---------------|--------|-------|-------|---------------------|------|
| CS/TPP po přípravě | | | | | | |
| 1 | 211,6 | 6,7 | 0,363 | 0,042 | 48,3 | 2,7 |
| 2 | 215,9 | 10,8 | 0,397 | 0,035 | 54,1 | 1,6 |
| 3 | 208,3 | 3,2 | 0,346 | 0,035 | 58 | 1,1 |
| průměr | 211,9 | 3,1 | 0,369 | 0,021 | 53,5 | 4 |
| CS/TPP po dialýze v destilované vodě | | | | | | |
| 1 | nedetekováno | | | | | |
| 2 | 120 | 684,5 | 0,956 | 1,134 | -1,2 | 1,3 |
| 3 | 7000 | 1281,3 | 1,562 | 1,784 | 61 | 4,5 |
| průměr | 3560 | 3440 | 1,259 | 0,303 | 27,6 | 25,6 |

Tabulka 25: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze v deionizované vodě a po lyofilizaci s trehalózou (5 % w/v, 2 ml)

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|---|---------------|-------|-------|-------|---------------------|-----|
| CS/TPP po přípravě | | | | | | |
| 1 | 186,7 | 6 | 0,449 | 0,048 | 47,3 | 1,6 |
| 2 | 174 | 3,3 | 0,339 | 0,048 | 54,7 | 1,8 |
| 3 | 179,2 | 6 | 0,377 | 0,04 | 55,7 | 1,1 |
| průměr | 180 | 5,2 | 0,388 | 0,046 | 52,6 | 3,7 |
| CS/TPP po dialýze v destilované vodě | | | | | | |
| 1 | 132,8 | 4,8 | 0,631 | 0,079 | 39 | 3 |
| 2 | 129,9 | 3,7 | 0,552 | 0,107 | 33,3 | 3,3 |
| 3 | 117,7 | 4,3 | 0,421 | 0,043 | 36,7 | 2,4 |
| průměr | 126,8 | 6,5 | 0,535 | 0,087 | 36,3 | 2,3 |
| CS/TPP, TRE 5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 976,6 | 189,9 | 3,142 | 1,257 | 31,3 | 2,1 |
| 2 | 224,9 | 16,9 | 0,638 | 0,081 | 35,6 | 0,8 |
| 3 | 499,3 | 117,5 | 1,987 | 1,07 | 24,1 | 2,7 |
| průměr | 566,9 | 310,6 | 1,922 | 1,023 | 30,3 | 4,7 |

Tabulka 26: Vlastnosti částic z CS/TPP po přípravě, dialýze v deionizované vodě a po lyofilizaci s trehalózou (2,5 % w/v, 2 ml)

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|---|---------------|-------|-------|-------|---------------------|-----|
| CS/TPP po přípravě | | | | | | |
| 1 | 176,3 | 4,5 | 0,403 | 0,051 | 47 | 1,2 |
| 2 | 179,3 | 3,3 | 0,383 | 0,036 | 56 | 2,5 |
| 3 | 187,1 | 3,6 | 0,461 | 0,053 | 57,9 | 1,1 |
| průměr | 180,9 | 4,6 | 0,416 | 0,033 | 53,6 | 4,8 |
| CS/TPP po dialýze v destilované vodě | | | | | | |
| 1 | 128,8 | 6,2 | 0,586 | 0,066 | 34,9 | 3 |
| 2 | 124,2 | 7,2 | 0,601 | 0,072 | 32,9 | 5,9 |
| 3 | 135,7 | 5,9 | 0,485 | 0,046 | 33,2 | 4,6 |
| průměr | 129,6 | 4,7 | 0,557 | 0,011 | 33,7 | 0,9 |
| CS/TPP, TRE 2,5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 214,2 | 64,3 | 0,79 | 0,124 | 35,6 | 1,7 |
| 2 | 232,3 | 92,8 | 0,828 | 1,177 | 31,8 | 1,4 |
| 3 | 357,2 | 206,5 | 1,634 | 1,808 | 26,8 | 7,3 |
| průměr | 267,9 | 63,6 | 1,084 | 0,389 | 31,4 | 3,6 |

Tabulka 27: Vlastnosti částic z CS/TPP se zachyceným ovalbuminem a zachyceným EGF po přípravě

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|---------------------------------|---------------|------|-------|-------|---------------------|-----|
| CS/TPP se zachyceným OVA | | | | | | |
| 1 | 205,6 | 10,8 | 0,402 | 0,060 | 53,8 | 1 |
| 2 | 236,7 | 8,9 | 0,435 | 0,048 | 54,6 | 2,5 |
| 3 | 237,7 | 5,3 | 0,428 | 0,040 | 52,8 | 1,5 |
| průměr | 226,7 | 14,9 | 0,422 | 0,014 | 53,7 | 0,7 |
| CS/TPP se zachyceným EGF | | | | | | |
| 1 | 199,9 | 9,2 | 0,445 | 0,059 | 45,0 | 1,4 |
| 2 | 183,4 | 3,2 | 0,403 | 0,023 | 43,5 | 2,7 |
| 3 | 183,4 | 8,5 | 0,407 | 0,055 | 46,1 | 1,5 |
| průměr | 188,9 | 7,8 | 0,418 | 0,019 | 44,9 | 1,1 |

Tabulka 28: Vlastnosti částic z CS/TPP se zachyceným ovalbuminem a zachyceným EGF po lyofilizaci s trehalózou (2,5% w/v, 2 ml)

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|--|---------------|--------|-------|-------|---------------------|-----|
| CS/TPP se zachyceným OVA, TRE 2,5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 4489,9 | 564,0 | 3,479 | 2,819 | 34,5 | 3,8 |
| 2 | 2477,3 | 913,5 | 2,228 | 1,948 | 34,5 | 2,8 |
| 3 | 2790,1 | 1104,5 | 3,395 | 1,607 | 38,2 | 1,9 |
| průměr | 3252,4 | 884,3 | 3 | 0,571 | 35,7 | 1,7 |
| CS/TPP se zachyceným EGF, TRE 2,5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 680,5 | 162,8 | 1,890 | 1,574 | 44,3 | 2,2 |
| 2 | 822,8 | 118,8 | 2,907 | 1,299 | 40,7 | 2,7 |
| 3 | 1158,6 | 494,6 | 1,130 | 0,301 | 45,1 | 3,4 |
| průměr | 887,3 | 200,4 | 1,976 | 0,728 | 43,4 | 1,9 |

Tabulka 29: Vlastnosti částic z CS/PLC po přípravě a po dialýze

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|---------------------------|---------------|-------|-------|-------|---------------------|------|
| CS/PCL po přípravě | | | | | | |
| 1 | 212,6 | 2 | 0,603 | 0,014 | 19,8 | 3,8 |
| 2 | 226,8 | 3,7 | 0,671 | 0,077 | 26,2 | 1,9 |
| 3 | 168,6 | 0,7 | 0,84 | 0,018 | 23,6 | 4,7 |
| průměr | 202,7 | 24,78 | 0,705 | 0,1 | 23,2 | 2,63 |
| CS/PCL po dialýze | | | | | | |
| 1 | 210,3 | 12,4 | 0,953 | 0,098 | 35,2 | 1,8 |
| 2 | 199,9 | 2,7 | 0,956 | 0,03 | 33,6 | 1,8 |
| 3 | 200 | 2,6 | 1,011 | 0,054 | 37,3 | 0,9 |
| průměr | 203,4 | 4,88 | 0,97 | 0,027 | 35,4 | 1,52 |

Tabulka 30: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s trehalózou (5 % w/v)

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|----------------------------------|---------------|--------|--------|-------|---------------------|-----|
| CS/PCL, TRE 5 % w/v, 5 ml | | | | | | |
| 1 | 3516,0 | 815,4 | 5,587 | 1,846 | 33,9 | 2,6 |
| 2 | 2550,7 | 1170,0 | 5,611 | 1,787 | 35,1 | 0,4 |
| 3 | 7875,7 | 487,2 | 9,523 | 1,254 | 14,8 | 2,2 |
| průměr | 4647,5 | 2316,5 | 6,907 | 1,850 | 27,9 | 1,0 |
| CS/PCL, TRE 5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 9141,4 | 579,3 | 10,574 | 1,714 | 35,4 | 0,8 |
| 2 | 6380,8 | 906,6 | 5,699 | 1,53 | 37,7 | 1,1 |
| 3 | 749,3 | 155,1 | 8,02 | 1,657 | 33,8 | 0,5 |
| průměr | 5423,8 | 3492,2 | 8,137 | 2,438 | 35,6 | 1,6 |

Tabulka 31: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s trehalózou (2,5 % w/v)

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|------------------------------------|---------------|--------|--------|-------|---------------------|------|
| CS/PCL, TRE 2,5 % w/v, 5 ml | | | | | | |
| 1 | 7950,3 | 654,9 | 10,642 | 1,991 | 36,8 | 2,8 |
| 2 | 5985,6 | 601,8 | 5,886 | 1,494 | 31,3 | 2,1 |
| 3 | 8274,6 | 496,7 | 9,35 | 1,397 | 33,1 | 3,9 |
| průměr | 7403,5 | 1011,3 | 8,626 | 2,008 | 33,7 | 2,38 |
| CS/PCL, TRE 2,5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 1283,9 | 323,7 | 0,982 | 0,333 | 39,8 | 2,2 |
| 2 | 4833,4 | 317 | 4,44 | 0,534 | 36,2 | 2,1 |
| 3 | 7456,9 | 490,9 | 8,703 | 0,626 | 37,5 | 1,3 |
| průměr | 4524,7 | 2529,6 | 4,708 | 3,158 | 37,8 | 1,5 |

Tabulka 32: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s mannitem (5 % w/v)

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|----------------------------------|---------------|--------|-------|-------|---------------------|-----|
| CS/PCL, MAN 5 % w/v, 5 ml | | | | | | |
| 1 | 7017,4 | 530,1 | 6,127 | 2,048 | 48,4 | 4,3 |
| 2 | 6000,3 | 983,7 | 6,648 | 3,298 | 40,5 | 1,4 |
| 3 | 6967,9 | 327,8 | 8,846 | 1,718 | 39,1 | 2,3 |
| průměr | 6661,9 | 468,2 | 7,207 | 1,178 | 42,7 | 4,1 |
| CS/PCL, MAN 5 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 8236,8 | 700,2 | 8,409 | 1,554 | 39,8 | 2,6 |
| 2 | 4592,5 | 829,3 | 5,252 | 1,293 | 47,8 | 2,9 |
| 3 | 6246,4 | 1702,4 | 9,725 | 3,112 | 55,6 | 8,6 |
| průměr | 6358,6 | 1489,9 | 7,795 | 1,877 | 47,7 | 6,5 |

Tabulka 33: Vliv objemu na vlastnosti CS/PLC částic po lyofilizaci s mannitem (1 % w/v)

| Vzorek č. | Velikost [nm] | SD | PDI | SD | Zeta potenciál [mV] | SD |
|----------------------------------|---------------|--------|--------|--------|---------------------|------|
| CS/PCL, MAN 1 % w/v, 5 ml | | | | | | |
| 1 | 5301,1 | 1127,3 | 5,195 | 1,827 | 43,6 | 2,5 |
| 2 | 6212,6 | 811,4 | 6,122 | 1,486 | 89,4 | 1,6 |
| 3 | 3468,2 | 1175,2 | 5,466 | 2,359 | 50,5 | 3,4 |
| průměr | 4994 | 1141,3 | 5,594 | 0,389 | 61,2 | 20,2 |
| CS/PCL, MAN 1 % w/v, 2 ml | | | | | | |
| 1 | 8084 | 843 | 5,341 | 1,273 | 54,1 | 2,9 |
| 2 | 1618,8 | 241,9 | 4,526 | 0,893 | 30 | 5,1 |
| 3 | 8282,8 | 522,8 | 11,431 | 12,496 | 33,2 | 6,6 |
| průměr | 5995,2 | 3095,6 | 7,099 | 3,081 | 39,1 | 10,7 |