

# **Příprava nanogelů na bázi modifikovaných polysacharidů pro přenos léčiv**

Vítek Hrbáček

---

Bakalářská práce  
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**

**Fakulta technologická**

**Ústav inženýrství polymerů**

**Akademický rok: 2020/2021**

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

**(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)**

**Jméno a příjmení: Vítěk Hrbáček**  
**Osobní číslo: T18855**  
**Studijní program: B2808 Chemie a technologie materiálů**  
**Studijní obor: Polymerní materiály a technologie**  
**Forma studia: Prezenční**  
**Téma práce: Příprava nanogelů na bázi modifikovaných polysacharidů pro přenos léčiv**

### **Zásady pro vypracování**

Léčiva na bázi platiny jsou jedním z hlavních nástrojů pro léčbu zhoubných nádorů, vykazují však velmi závažné vedlejší účinky. Jedním ze způsobů jak tyto negativní potlačit je konjugace léčiva na různé nanoformulace. Přenos léčiv pomocí nanočástic vede k jejich pasivní akumulaci v tumoru v důsledku tzv. enhanced permeability and retention efektu. Cílem práce bude optimalizace přípravy nanogelů tvořených polysacharidy či jejich deriváty a sloučeninami na bázi platiny, které budou sloužit zároveň jako síťovací činidlo. Bude sledován vliv vlastností polysacharidu, tj. jeho molekulové hmotnosti, počtu funkčních skupin atd. na velikost a vlastnosti připravených nanogelů. Bude také sledován vliv dalších reakčních podmínek (teplota, koncentrace léčiv) a vzniklé nanogely analyzovány řadou fyzikálně chemických metod, SEM, měření hydrodynamického poloměru a zeta potenciálu a také sledování obsahu a rychlosti uvolňování léčiva.

**Seznam doporučené literatury:**

Ohta, S.; Hiramoto, S.; Amano, Y.; Sato, M.; Suzuki, Y.; Shinohara, M.; Emoto, S.; Yamaguchi, H.; Ishigami, H.; Sakai, Y.; Kitayama, J.; Ito, T. Production of Cisplatin-Incorporating Hyaluronan Nanogels via Chelating Ligand-Metal Coordination. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (3), 504-508. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00674>.

Xu, X.; Jha, A. K.; Harrington, D. A.; Farach-Carson, M. C.; Jia, X. Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: From a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter* **2012**, *8* (12), 3280-3294. <https://doi.org/10.1039/C2SM06463D>.

Ohta, S.; Hiramoto, S.; Amano, Y.; Emoto, S.; Yamaguchi, H.; Ishigami, H.; Kitayama, J.; Ito, T. Intraperitoneal Delivery of Cisplatin via a Hyaluronan-Based Nanogel/in Situ Cross-Linkable Hydrogel Hybrid System for Peritoneal Dissemination of Gastric Cancer. *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14* (9), 3105-3113. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00349>.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jan Vicha, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Jana Navrátilová, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Nanogely vytvořené z polysacharidů jsou vhodné pro přenos léčiv proti rakovině, díky jejich schopnosti snižovat toxicitu léčiv a jejich uvolňování do organismu před dosažením rakovinných buněk. Předmětem této práce bylo vytvořit nanogel z dextransu a cisplatiny, a také posoudit vliv podmínek přípravy na vzniklé částice. Byl posuzován hydrodynamický průměr částic, jejich zeta potenciál a uvolňování v podmínkách *in vitro*. Kombinací ohřevu a zvýšeného objemu reakční směsi se podařilo připravit nanogely s vhodným hydrodynamickým průměrem (100 nm) a vhodnou rychlostí uvolňování léčiva.

Klíčová slova: Nanogel, cisplatina, dextran, přenos léčiv, hydrodynamický průměr.

## **ABSTRACT**

Nanogels composed of polysaccharides are suitable for anticancer drug delivery, thanks to their ability to decrease the toxicity of anticancer drugs and to limit the drug release before reaching cancer cells. The aim of this work was to prepare nanogels from dextran crosslinked by cisplatin and also to determine the effect of preparation conditions on characteristics of formed particles. Hydrodynamic radius, zeta potential and cisplatin release *in vitro* were investigated. Nanogels with suitable hydrodynamic radius (100 nm) and drug release rates were prepared using increased volume and heating of reaction mixture.

Keywords: Nanogels, cisplatin, dextrane, drug delivery, hydrodynamic radius.

Zde bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D. za jeho trpělivost a odborné rady, které mi poskytl při tvorbě této práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval při přípravě vzorků DXA. Závěrem bych chtěl poděkovat Ing. Alžbětě Vávrové a Ing. Monice Muchové za jejich pomoc při přípravě vzorků a měření na Zetasizeru nano.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1 POLYSACHARIDY</b> .....	<b>10</b>
<b>2 NANOČÁSTICE</b> .....	<b>16</b>
2.1 NANOČÁSTICE V MEDICÍNĚ.....	18
2.2 NANOGELY.....	19
<b>3 CISPLATINA</b> .....	<b>21</b>
4.1 XRF – X-RAY FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE .....	23
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>27</b>
<b>I PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
<b>6 EXPERIMENT</b> .....	<b>29</b>
6.1 MATERIÁLY A METODY .....	29
6.2 OXIDACE DEXTRANU .....	30
6.3 PŘÍPRAVA CISPLATINY .....	32
6.4 PŘÍPRAVA NANOGELŮ .....	33
<b>7 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>35</b>
7.1 NANOGELY PŘIPRAVENÉ Z DXA O VYSOKÉ MOLÁRNÍ HMOTNOSTI .....	35
7.2 NANOGELY PŘIPRAVENÉ Z DXA O NÍZKÉ MOLÁRNÍ HMOTNOSTI.....	36
7.3 ÚPRAVA REAKČNÍCH PODMÍNEK.....	37
7.4 UVOLŇOVÁNÍ CP Z NANOGELU .....	39
7.5 NANOGELY PŘIPRAVENÉ POMOCÍ AKTIVOVANÉ CISPLATINY .....	40
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>42</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>43</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>43</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>49</b>

## ÚVOD

Nanočástice v současné době nacházejí uplatnění v různých oborech a profesích, velký potenciál mají zejména v medicínském a farmaceutickém průmyslu. Nanočástice mají totiž vzhledem ke svým malým rozměrům velký měrný povrch a mohou tedy navázat velké množství látek. To je jeden z hlavních důvodů, proč se především lipidové a polysacharidové nanočástice a nanogely začaly používat pro přenos léčiv. Polysacharidové nanočástice jsou biokompatibilní a navázáním léčiva dokáží snížit jeho toxicitu, čehož je možné využít především v léčbě nádorových onemocnění. Důležitou vlastností polysacharidů je jejich snadná modifikovatelnost, jež spolu s vnějšími či vnitřními podmínkami (teplota, pH, počet funkčních skupin), dokáže ovlivňovat jak vázání, tak uvolňování léčiva. Nanočástice jsou vhodné pro léčbu nádorů také díky tzv. EPR (Enhanced Permeability and Retention) efektu, který zajišťuje pasivní ukládání nanočástic o určité velikosti v nádoru. V této práci se budu zabývat vytvořením nanogelů z oxidovaného dextranu a diammin-dichloroplatinatého komplexu (cisplatina), který bude sloužit jako síťovací činidlo a zároveň je i protinádorovým léčivem. Naším cílem je vytvořit nanogely, které budou v rozmezí 10-150 nm, což by mělo umožnit jejich optimální penetraci do nádoru a zároveň jejich hromadění v tumorech v důsledku EPR efektu.



## **TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYSACHARIDY

Polysacharidy jsou netoxické a přirozeně biodegradabilní polymery. Vytváří dlouhý řetěz složený z 10 a více monosacharidů, které jsou spojeny pomocí glykosidických vazeb. Přírodní polysacharidy se od sebe liší molární hmotností, složením monosacharidů, jejich konfigurací ( $\alpha$  nebo  $\beta$  glykosidickými vazbami), zesíťováním atd. Tyto charakteristiky poté určují funkční vlastnosti polysacharidů, jako je například rozpustnost. Jelikož se většina polysacharidů využívá ve vodném roztoku, je znalost rozpustnosti nezbytná.

Běžné monomerní jednotky polysacharidů jsou například glukóza, fruktóza, manóza a galaktóza. Homopolysacharidy jsou tvořeny pouze jedním opakujícím se monosacharidem (celulóza, glykogen, škrob atd.). Heteropolysacharidy jsou tvořeny dvěma či více polysacharidy (kyselina hyaluronová).

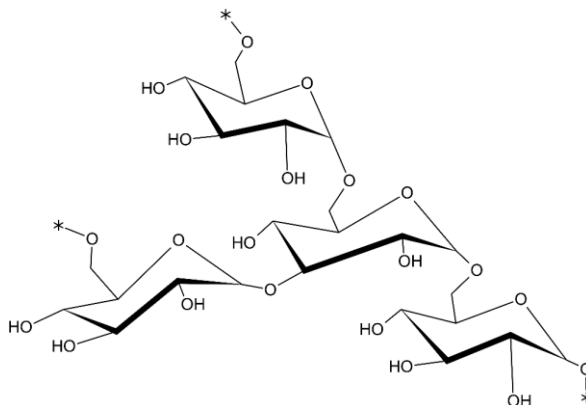
Glykosidická vazba je tvořena kyslíkem a dvěma uhlíky sousedních monomerů. Vzniká kondenzační reakcí mezi  $-OH$  skupinami monomerů, při níž se z jednoho monosacharidu odštěpí  $-OH$  skupina a u druhého monosacharidu se z  $-OH$  skupiny odštěpí pouze atom vodíku za vzniku vody. Podle konfigurace na poloacetalovém uhlíku rozlišujeme  $\alpha$ - a  $\beta$ -glykosidické vazby. Je-li sacharid  $\alpha$ , bude hydroxyl natočen směrem k acetalové vazbě, bude-li  $\beta$ , bude natočen proti poloacetalové vazbě [1].

Podle počtu glykosidických vazeb v monomerní jednotce lze polysacharidy rozlišovat na lineární a větvené. U lineárních polysacharidů, jako je např. celulóza, spojuje glykosidická vazba vždy po jednom uhlíku dvou sousedních monomerních jednotek. V lineárním řetězci se mohou objevovat i různé glykosidické vazby, například u kyseliny hyaluronové, kde jsou  $\beta(1\rightarrow4)$  i  $\beta(1\rightarrow3)$  vazby [2]. Rozvětvené polysacharidy obsahují kromě hlavního řetězce ještě řetězce vedlejší. Například pokud je hlavní řetězec tvořen  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickou vazbou, vedlejší řetězce se poté vytvářejí spojením 1. a 6. uhlíku některých jednotek, tedy  $\alpha(1\rightarrow6)$  glykosidickou vazbou.

V biologických systémech se polysacharidy podílejí na struktuře a hlavních funkcích buňky. Celulóza je základní stavební jednotkou buněčné stěny rostlin. Polysacharidy jako je škrob nebo glykogen plní funkci zásobní a pokud je třeba, lze je převést na energii [3]. V průmyslu jsou polysacharidy využívány jako zahušťovadla, stabilizátory, gelační činidla a také jako emulgátory v potravinách. Dále mají uplatnění ve farmacii a používají se i pro zvýšení výtěžnosti ropy.

## 1.1 Dextran

Dextran je komplexně rozvětvený polysacharid složený z  $\alpha$ -D-glukózových jednotek. Jeho molární hmotnost se může pohybovat od cca 1 po 40 000 kDa. V dextranu převládají  $\alpha(1\rightarrow6)$  glykosidické vazby. Zbytek tvoří  $\alpha(1\rightarrow3)$  vazby, které vytváří větvení dextranu (Obr. 1). Tyto větve z 85 % tvoří jeden nebo dva glukózové zbytky. Dalších 15 % větví má průměrně 33 glukózových zbytků [4].



Obrázek 1 – Struktura dextranu. Hvězdičky označují pokračování řetězců.

Dextran je produkován bakteriemi mléčného kvašení z roztoků obsahujících sacharidy. Komerčně dostupný dextran je syntetizován bakterií *Leuconostoc mesenteroides* nebo pomocí bakterie *Streptococcus mutans*. Pro komerční dextran produkováný bakteriemi *Leuconostoc mes.* se uvádí, že obsahuje 5 %  $\alpha(1\rightarrow3)$  větvení. Pro klinické využití se používá dextran, který získáme částečnou depolymerizací vysokomolekulárního dextranu kyselou hydrolyzou a frakcionací. Jedná se například o Dextran 40 (40 kDa), Dextran 60 (60 kDa) a Dextran 70 (70 kDa)[5].

Podle zdroje dextranu se liší jeho struktura a vlastnosti. Hlavní rozdíly jsou ve stupni větvení, typu glykosidických vazeb, rozpustnosti a optické aktivitě. Dextrany jsou rozpustné ve vodě, formamidu a dimethyl sulfoxidu. Nerozpustné jsou v alkoholu a acetonu. Komerční dextran má vysoký stupeň polydisperzity. Optická rotace vodného roztoku dextranu se pohybuje mezi  $+199^\circ$  to  $+235^\circ$ .

Dextran je nejvíce využíván v medicíně a farmacii. Používá se například při operacích jako antitrombotický prvek pro rozbourání krevních sraženin, protože se váže na červené krvinky a krevní destičky, což vede ke snížení agregace červenýchrvinek a adhezivity destiček.

Dextran o vyšší molární hmotnosti, který již neprochází přes cévní stěnu, slouží pro akutní léčbu hypovolemie, závažné ztráty tělních tekutin vedoucí k nedostatečnému průtoku orgánů krví, a tedy jako objemová náhrada krve [6]. Využívá se také jako lubrikant v očních kapkách. V laboratořích slouží jako matrice pro některé chromatografie. V potravinářství se dextransy nevyužívají, a jsou dokonce zakázány jako aditiva. Potenciálně by mohli sloužit jako inhibitory krystalizace a pro zadržování vlhkosti [7].

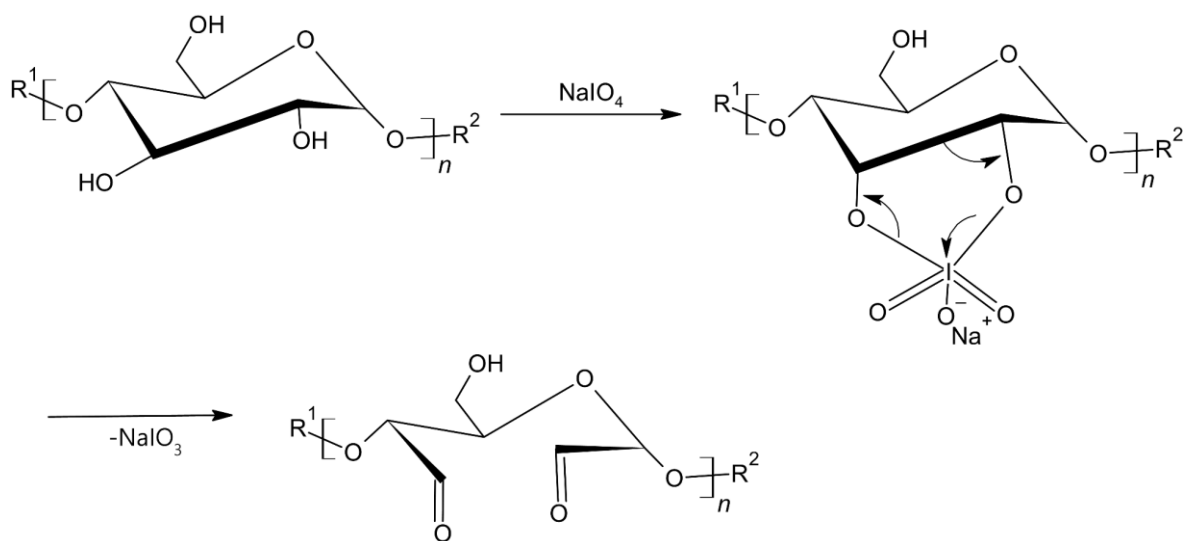
Dále se zkoumá jeho přínos jako povrchové vrstvy některých kovových nanočástic, u kterých zvyšuje jejich stabilitu a biokompatibilitu[8].

V této práci se budu zabývat využitím modifikovaného dextransu ve formě nanogelů pro přenos protinádorového léčiva cisplatinu.

## 1.2 Dicarboxypolysacharidy připravené regioselektivní oxidací

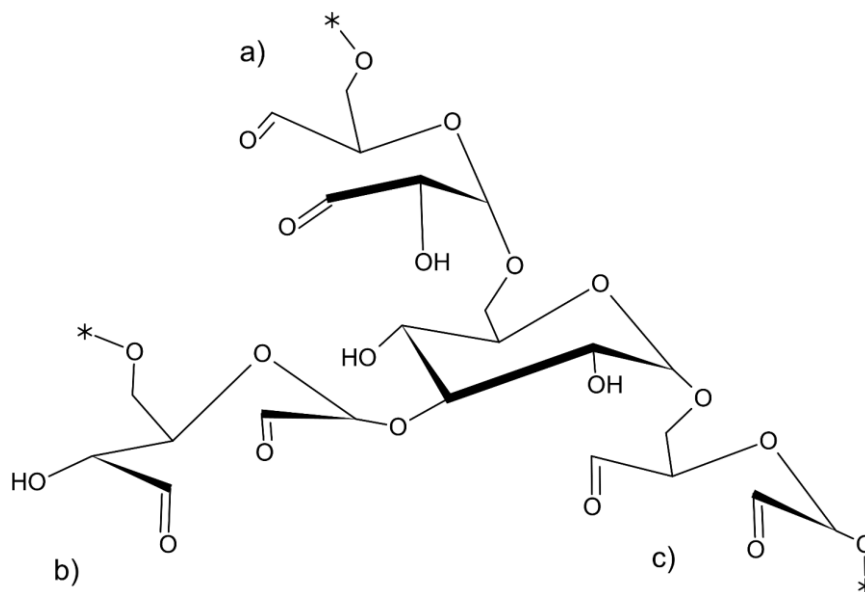
Jedná se o funkční deriváty polysacharidů, které obsahují v jedné oxidované jednotce dvě karboxylové skupiny, které jsou schopny efektivně vázat některá léčiva na bázi platiny. To z nich dělá, spolu s jejich biokompatibilitou a biodegradabilitou, ideální nosiče léčiv[9]

Regioselektivní oxidace polysacharidů na dikarboxypolysacharidy je dvoustupňová reakce. V prvním kroku dochází k oxidaci vicinálních hydroxidových skupin polysacharidu pomocí tzv. periodátu, tedy jodistanu sodného ( $\text{NaIO}_4$ ), na aldehydy. Během tohoto procesu dochází ke štěpení vazby mezi uhlíky nesoucími  $-\text{OH}$  skupiny (Obr. 2). Oxidace vicinálních hydroxidových skupin je podmíněna jejich orientací. K reakci dojde jen v případě, pokud jsou  $-\text{OH}$  skupiny ve vzájemné ekvatoriální-ekvatoriální nebo axiální-ekvatoriální orientaci [10]. Podobného účinku by mohlo být docíleno za využití tetraacetátu olovnatého ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ), ten je ovšem méně používaný a nebyl použit ani v této práci.



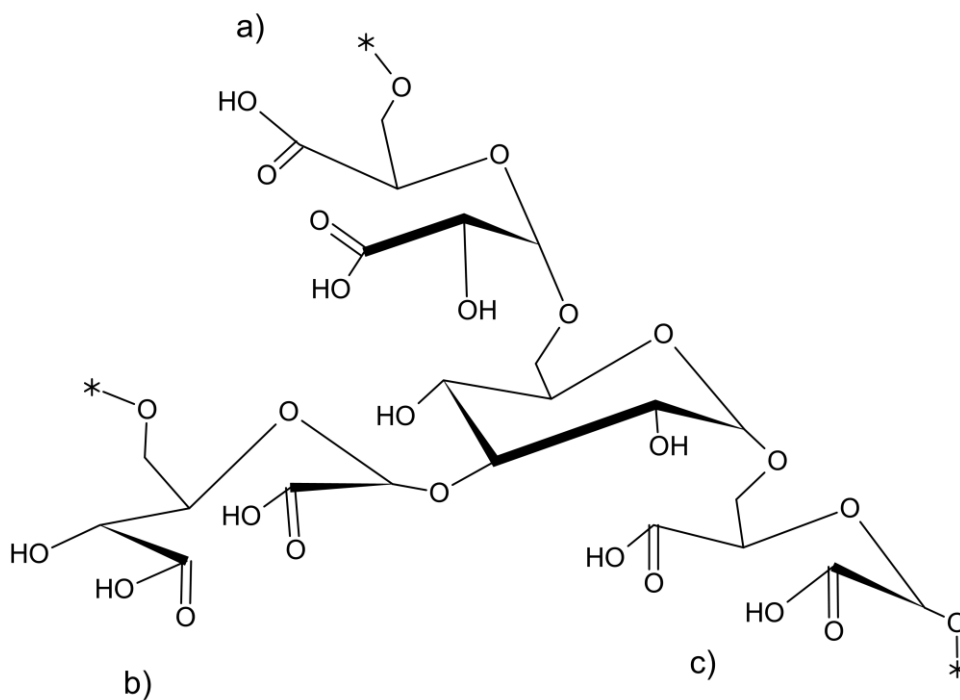
Obrázek 2 - Schéma oxidace polysacharidů pomocí periodátu - tzv. primární oxidace polysacharidu.

Selektivita oxidace také souvisí s počtem vicinálních OH skupin. Pokud monomer obsahuje pouze jeden pár sousedních  $-\text{OH}$  skupin, proběhne oxidace na nich. Při větším množství sousedících  $-\text{OH}$  skupin může dojít k různým reakcím, které dají za vznik více derivátům. Počet a pozice  $-\text{OH}$  skupin je dána strukturou a větvením polysacharidu. V případě dextransu, který je větven glykosidickými vazbami  $\alpha(1\rightarrow6)$  a  $\alpha(1\rightarrow3)$  může dojít ke dvěma reakcím nebo jejich kombinaci, protože glukózové jednotky vázané přes 1. a 6. uhlík se mohou oxidovat na 2. a 3. nebo na 3. a 4. uhlíku nebo může také docházet k dvojité oxidaci spojené s odštěpením kyseliny mravenčí a tvorbou aldehydů na 2. a 4. uhlíku. Glukózová jednotka, která je vázaná i vazbou  $\alpha(1\rightarrow3)$ , neobsahuje žádné vicinální dioly a oxidace na ní neprobíhá. Oxidaci lze zastavit přidáním ethylen glykolu, který reaguje se zbytkovým periodátem. Výsledný produkt oxidace dextransu tak obsahuje monomerní jednotky 2,3- dialdehydextransu, 2,4- dialdehydextransu, 3,4- dialdehydextransu a nezoxidované jednotky (Obr. 3)[11].



Obrázek 3 – Strukturní vzorec dextransu po primární oxidaci, a) 3,4-dialdehydextran b) 2,3-dialdehydextran c) 2,4-dialdehydextran.

Následná, tedy sekundární oxidace aldehydických skupin vzniklých během oxidace periodátem na karboxylové skupiny probíhá pomocí chloritanu sodného ( $\text{NaClO}_2$ ). Výsledkem jsou v případě dextransu 2,3-, 2,4-, 3,4-dikarboxydextran (Obr. 4). Reakce je zastavena přidávkem hydroxidu sodného a vzniká sodná sůl dikarboxydextransu.



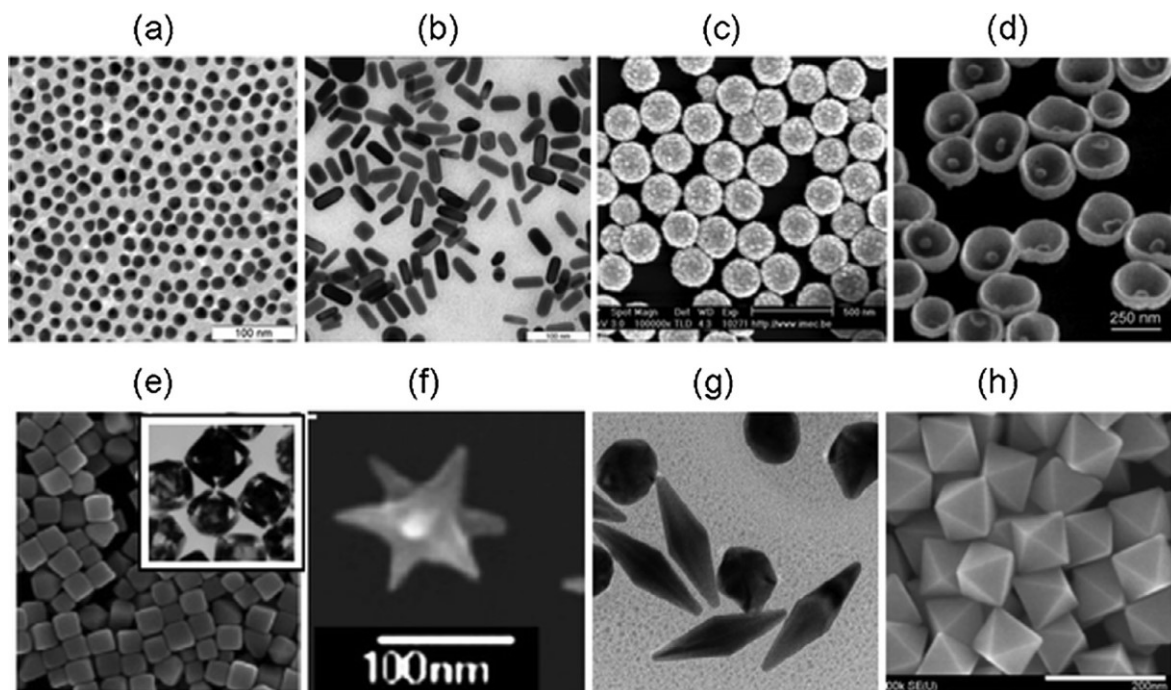
Obrázek 4 – Strukturní vzorec dextransu po sekundární oxidaci, a) 3,4-dikarboxydextran b) 2,3-dikarboxydextran c) 2,4-dikarboxydextran.

Během sekundární oxidace je možné řídit hmotnostní střed molárních hmotností ( $M_w$ ) výsledného polysacharidu pomocí přidání kyseliny amidosulfonové ( $H_3NSO_3$ ) do roztoku před sekundární oxidací. Jedná se o sulfonaci indukované štěpení řetězců [12]. Reakce je započata navázáním kyselé  $-SO_3H$  skupiny na aldehydické skupiny vzniklé během primární oxidace. Tím se skupina  $-SO_3H$  dostane do ideální pozice, kde je schopna protonovat kyslík glykosidické vazby a započít kyselou hydrolyzu [12]. Pomocí změny množství  $H_3NSO_3$  nebo délky sulfonace je možné upravovat střední molární hmotnost polysacharidu v širokém rozsahu od 100 až do 15 %  $M_w$  derivátu připraveného bez  $H_3NSO_3$ . [12] Tato metoda řízení  $M_w$  zároveň snižuje index polydisperzity, což je výhoda obzvláště v případě dextranu. Této metody bylo využito také v této práci pro přípravu částic nanogelů na bázi dikarboxydextranu (DXA).

## 2 NANOČÁSTICE

Jako nanočástice se označují objekty, které mají rozměry mezi 1 až 100 nanometry (nm), což znamená, že nemohou být pozorovány lidským okem. Tento termín je ale někdy také používán i pro částice až do 500 nm nebo pro vlákna a trubice, jejichž rozměry v jednom směru nepřesahují 100 nm[13]. Nanočástice většinou nejsou homogenní útvary, ale jsou často složeny z několika vrstev. Vnější vrstva bývá tvořena různými ionty, surfaktanty a polymery, které jsou zadržovány v blízkosti nanočástice pomocí různých interakcí (elektrostatické působení, slabé interakce...). Tato vrstva bývá označována jako korona. Dále následuje povrchová vrstva, která je anglicky označovaná jako „shell“, a bývá tvořena často naprosto odlišným materiálem než jádro, např. různými polymery, či oxidy. Poslední vrstvou je samotné jádro (core), podle kterého se určuje samotná povaha nanočástice [14].

Dalšími důležitými faktory jsou pro nanočástice jejich náboj, tvar a povaha elektrické dvojvrstvy, která se vytváří mezi molekulou a prostředím. Tvar je závislý nejen na složení nanočástic, ale také na procesu, kterým byly vytvořeny. Nanočástice z jedné látky mohou mít různé tvary, jak můžeme vidět na příkladu nanočástic zlata (Obr. 5). Vlastnosti nanočástic se mohou velice lišit od vlastností mikro i makročástic.



Obrázek 5- Snímky TEM různých tvarů zlatých nanočástic[15]



Způsobů, jak klasifikovat nanočástice, je několik. Například podle složení můžeme nanočástice dělit do 6 hlavních tříd. [14].

První třída jsou nanočástice na bázi uhlíku. Zde se nachází dvě hlavní skupiny, a to fulereny a uhlíkové nanotrubic. Fulereny vytvářejí kulové duté klece tvořené pentagonálním nebo hexagonálním uskupením uhlíků s hybridizací  $sp^2$ . Mají unikátní strukturu, jsou elektrické vodivé a vysoce pevné. Uhlíkové nanotrubic mají protáhlý trubkovitý tvar s průměrem 1-2 nm. Jsou tvořeny grafitovou vrstvou, která se spojí a vytvoří trubici. Uhlíkové trubice mohou vytvářet jedno, dvou nebo vícevrstvou strukturu. Lze je využít například jako plniva a jako podpůrné médium pro anorganické i organické katalýzy [14].

Druhá třída jsou kovové nanočástice. Ty jsou tvořeny výhradně kovovými prekurzory. Některé kovové nanočástice mají velmi specifické opticko-elektrické vlastnosti. Například nanočástice alkalických a ušlechtilých kovů (Cu, Ag, a Au) mají široký absorpční pás v oblasti viditelné části elektromagnetického slunečního spektra, což vede k jejich specifickému zabarvení v závislosti na velikosti a tvaru nanočástic.

Třetí třídou jsou keramické nanočástice, které tvoří anorganické nekovové pevné látky, např. oxidy křemíku. Vytváří amorfni polykrystalické, tuhé, pórovité nebo duté formy. Jsou zkoumány pro využití jako katalyzátory a fotokatalyzátory.

Čtvrtou třídou jsou polymerní nanočástice, v literatuře označovány speciálním termínem „polymer nanoparticle“ (PNP). Klasicky se jedná o nanočástice tvořené organickými látkami. Nejčastěji mají tvar sféry nebo kapsule.

Pátou třídou jsou nanočástice polovodičové. Tyto materiály mají vlastnosti jako kovy i nekovy. Využívané jsou především jako fotokatalyzátory, dále v elektrických zařízeních díky širokým zakázaným pásům (energetickým pásům), ve kterých se nevyskytují žádné elektrony.

Poslední třídou jsou lipidové nanočástice neboli micely. Obsahují lipidové skupiny a jsou efektivně využívány v biomedicínských aplikacích. Klasická lipidová nanočástice má tvar sféry o průměru 10 až 1000 nm. Sféra je tvořena z jedné nebo více fosfolipidových dvojvrstev, které mají hydrofilní a hydrofobní stranu. V případě nanočástic pro přenos léčiv je většinou hydrofilní vrstva na vnější straně a hydrofobní vrstva směrem ke středu částice, kde je uloženo léčivo. Tyto částice jsou upravovány a syntetizovány pro přenos léčiv nebo RNA při léčbě rakoviny [14].

Metody pro výrobu nanočástic se dají v zásadě rozdělit na dva přístupy. Jedním je tzv. top-down přístup. Jedná o destruktivní metody, při kterých látku rozkládáme na menší jednotky až do vzniku vhodných nanočástic. Tyto metody umožňují vytvářet nanočástice s přesnými rozměry i tvary. Mezi tyto metody patří broušení/mletí nebo chemické leptání.

Druhým přístupem je tzv. bottom-up syntéza. Při použití těchto metod jsou nanočástice vytvářeny z jednodušších prekurzorů. Patří mezi ně například laserová pyrolýza nebo molekulární kondenzace. Speciální metodou je biologická syntéza, při které jsou nanočástice vytvářeny pomocí bakterií, hub nebo rostlin. Tato varianta se využívá především kvůli méně toxické povaze procesu a jeho snadné proveditelnosti.

Další klasifikování nanočástic může být podle hodnoty indexu polydisperzity (PDI). Termín polydisperze se používá pro popsání stupně nestejnorodosti rozložení velikosti částic. Hodnoty pod 0,05 označují, že se jedná o vysoce monodisperzní distribuci a hodnoty nad 0,7 zase označují vzorky s velkým rozpětím velikosti částic. Například hodnota PDI pro nanočástice určené jako nosiče léčiv by měla být pod 0,3 [16].

## 2.1 Nanočástice v medicíně

Nanočástice se v oblasti medicíny používají například pro dodání léčiva přímo do určité tkáně nebo jako zobrazovací sondy. Toto použití ovšem vyžaduje jejich nízkou nebo žádnou systémovou toxicitu. Takovéto nanočástice jsou velkým příslibem v oblasti léčby nádorových onemocnění. Běžně totiž léčba rakoviny vyžaduje vysoké opakované dávky účinné látky pro dosažení léčebných účinků, což může vyústit ve vážné vedlejší účinky. Tento problém řeší použití nanotransportérů, které zajišťují cílené a řízené uvolňování léčiva. To umožňuje podávání nižších dávek účinné látky, čímž dojde ke snížení toxicity. Pro správný transport je ovšem nutné znát interakce nanočástic s fyziologickým prostředím cílové tkáně.

Lepšího cílení nanotransportérů při léčbě nádorových onemocnění je dosaženo například pomocí tzv. EPR efektu (Enhanced Permeability and Retention efektu). Při něm dochází k usazování látek o určité minimální velikosti (obvykle liposomy, nanočástice a makromolekulární léčiva) v nádorové tkáni daleko víc než ve zdravé tkáni. Vysvětlením tohoto fenoménu je, že rychlý růst nádorových buněk je doprovázen zvýšeným požadavkem na dostatečný přísuv kyslíku. Uskupení nádorových buněk o velikosti 150-200  $\mu\text{m}$  už potřebuje vlastní cévu pro dostatečný přísuv kyslíku. Tyto nově vytvořené cévy mají abnormální strukturu. Jsou tvořeny z defektních endotelových buněk a postrádají hladkou

svalovou vrstvou. V jejich stěnách se tak vytvářejí relativně velké otvory, tj. dochází k tzv. fenestraci cévní stěny. Nanočástice až do velikosti 200 nm jsou schopny těmito otvory procházet do nádorové tkáně, kde se pak spontánně usazují[17]. Jako ideální velikost nanočástic schopných optimální penetrace do nádoru a zároveň jejich hromadění v důsledku EPR efektu se nejčastěji udává 50 – 150 nm.

Polysacharidy jsou vhodné materiály pro nanotransportéry především díky biokompatibilitě a biodegradabilitě. Polysacharidy je možné získat z velkého množství zdrojů s vysokou výtěžností. Důležitý přínosem může být i rozpustnost ve vodě, což ovšem platí jen u některých polysacharidů v závislosti na jejich vlastnostech. Díky ní je možné využívat polysacharidy pro přenos léčiv s nízkou rozpustností, která mají být podávána orálně nebo injekcí. Mezi nejčastěji používané polysacharidy patří alginát sodný, chitosan, škrob, celulóza nebo kyselina hyaluronová[18].

## 2.2 Nanogely

Nanogely jsou vodní disperze hydrogelních nanočástic složených z fyzikálně nebo chemicky zesíťovaných hydrofilních polymerů. Nanogely jsou schopny zadržovat velké množství vody díky přítomnosti hydrofilních funkčních skupin. Jsou vstřebatelné sliznicemi a je možné je podat i parenterálně. Lze je využít právě pro přenos léčiv, která do své struktury začleňují buď pomocí chemických vazeb, iontových interakcí, vodíkových můstků nebo pomocí hydrofobních interakcí. Nanogely jsou vhodné jak pro lokální i systémové podání zejména díky jejich stabilitě v různých prostředích a schopnosti reagovat na faktory prostředí jako například pH a teplota. Množství léčiva, které lze zakomponovat do nanogelů, je ale často omezené. Další komplikace vzniká v případě, že je vazba mezi nanogelem a účinnou látkou příliš silná, což může vést ke zborcení struktury nanogelu [19].

Nanogely lze připravit například pomocí fyzikálního samouspořádání interagujících polymerů (“physical self-assembly of interactive polymers“), což je metoda, při které dochází ke kontrolovaným spojováním hydrofilních polymerů schopných vzájemných hydrofobních nebo elektrostatických interakcí spolu se vznikem vodíkových můstků mezi nimi [20].

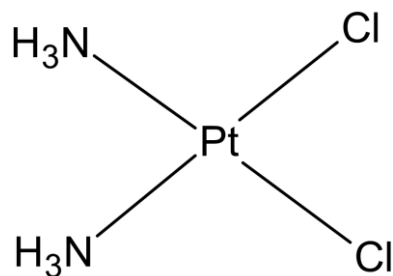
Příkladem nanogelů z polysacharidů jsou nanočástice vytvořené z  $\epsilon$ -poly-L-lysinu a kyseliny hyaluronové, která je vstříkována v podobě nanokapek do jeho roztoku. Tím dojde k vytvoření nekovalentně (elektrostaticky) vázané sítě, která je schopna zapouzdřit doxorubicin. Výsledný nanogel měl velikost částic 120 nm [21].

Dalším příkladem může být nanogel připravený z kyseliny akrylové a hydroxypropyl celulózy. Nanogel je připraven smícháním hydroxypropyl celulózy, kyseliny akrylové, N,N'-methylen-bis-akrylamidu a dodecylsíranu sodného ve vodě, přičemž je roztok udržován pod dusíkovou atmosférou. Polymerizace je započata přidáním peroxodisíranu amonného. V závislosti na koncentracích jednotlivých látek dosahovaly částice nanogelu hydrodynamických průměrů kolem 90 nm. pH nanogelu bylo poté upraveno na hodnotu 2, aby bylo možné navázat léčivo temozolomid [22].

Jiným příkladem může být nanogel připravený z kyseliny hyaluronové modifikované pomocí dikarboxylových ligandů schopných chelace platnatých léčiv. [23] Byla použita například modifikace pomocí kyseliny iminodiotové nebo kyseliny malonové. Takto upravená kyselina hyaluronová byla poté smíchána s cisplatinou, která je protirakovinným léčivem, a zde sloužila také jako síťovací činidlo. Takto připravené nanogely dosahovaly hydrodynamických průměrů částic kolem 10 nm. Cisplatině se věnujeme také v následující kapitole.

### 3 CISPLATINA

Cisplatina je čtvercově-planární komplex, který byl objeven v roce 1845 a je také znám pod jménem Peyronova sůl. Její chemické označení je cis-diammin-dichloroplatnatý komplex a vzorec  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$  (Obr. 6).



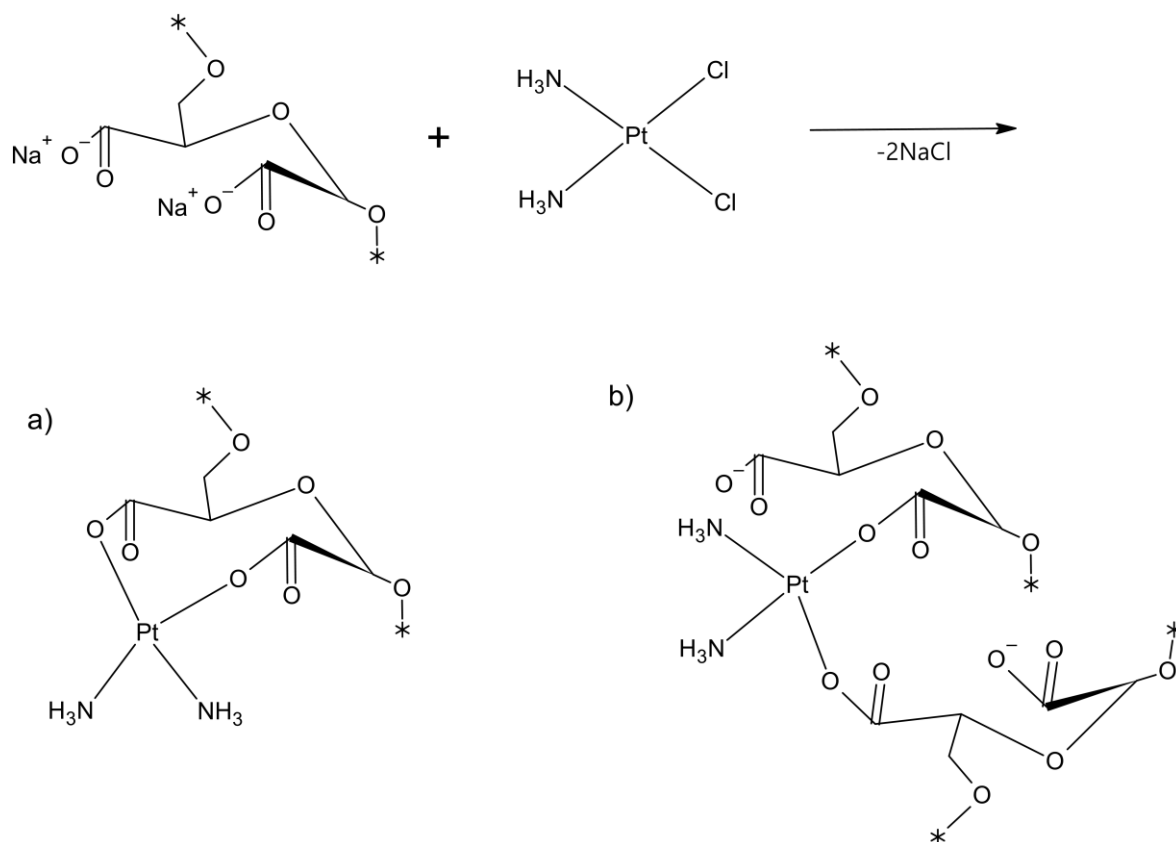
Obrázek 6 - Strukturní vzorec cisplatiny.

Cisplatina je chemoterapeutický lék, který se používá na léčbu rakoviny. Užívá se například při léčbě rakoviny varlat, vaječníků, prsu, hlavy, krku, plic a dalších. Běžně se podává injekčně přímo do žíly. Její užívání sebou nese množství vedlejších účinků. Mezi ně patří snížená tvorba bílých krvinek, zvracení, sluchové problémy nebo problémy s chůzí. Je také embriotoxická, proto ji například není možné podávat těhotným ženám [24].

Protinádorový účinek cisplatiny je založen na schopnosti jejího navázání na DNA pomocí kovalentních vazeb. Po průniku cisplatiny do buňky dojde k záměně jednoho chloridového iontu vodou díky nízké koncentraci chloridových iontů v buňce [25]. Vzniklý komplex je reaktivní a následně dojde k nahrazení vody jednou z nukleových bází DNA, nejčastěji guaninem. Následně dojde k odštěpení i druhého chloridového iontu a navázání na druhou bázi, což zapříčiní zesíťování DNA a zabrání její replikaci. Tím je znemožněna mitóza a dochází k úmrtí buňky. Protože k replikaci DNA dochází nejvíce u nejrychleji se množících buněk, cisplatina vykazuje nejvyšší účinek právě proti rakovinným buňkám.

V této práci se věnujeme přípravě nanogelů na bázi oxidovaného dextranu síťovaných přímo cisplatinou. Cisplatina je schopna fungovat jako síťovací činidlo díky její reakci s funkčními karboxylovými skupinami na řetězcích polysacharidů. Navázání cisplatiny může probíhat více způsoby v závislosti na množství a pozici funkčních karboxylových skupin v jednotkách polysacharidu. Pokud jednotka obsahuje pouze jednu -COOH skupinu dojde k síťování mezi jednotlivými řetězci nebo mezi různými jednotkami téhož řetězce. Příkladem může být kyselina hyaluronová, kde probíhá výhradně tato reakce [23]. Pokud by

jednotka obsahovala více funkčních skupin, může dojít k chelaci cisplatiny a jejímu navázání na jednu jednotku - k síťování zde nebude docházet (Obr. 7).



Obrázek 7 – Schéma reakce cisplatiny a dikarboxydextranové (2,4-DXA) soli a různé možnosti navázání cisplatiny na 2,4-DXA, a) cisplatina navázaná na jednu jednotkou DXA, nedochází k síťování b) cisplatina navázaná mezi dvěma jednotkami 2,4-DXA, může docházet k síťování

## 4 POUŽITÉ METODY

Pro charakterizaci nanogelů jsem použil metodu DLS (Dynamic Light Scattering, přístroj Zetasizer Nano), TEM (Transmisní elektronový mikroskop) a XRF (X-ray fluorescence) spektroskopii.

### 4.1 XRF – X-ray fluorescenční spektroskopie

Pomocí metody XRF je možné zjistit atomární složení vzorku a také zastoupení prvků ve vzorku. Metoda spočívá v ozáření látky rtg. zářením, které zapříčiní excitaci jednoho či více elektronů z hluboko ležících, tzv. core orbitalů, což vede k vyzáření energie atomem ve formě fotonu. Tato energie je charakteristická pro každý atom a dá se využít jak ke kvalitativní, tak kvantitativní analýze prvkového složení látky. V našem případě bylo sledováno množství platiny.

### 4.2 TEM (Transmisní elektronový mikroskop)

Transmisní elektronový mikroskop umožňuje pozorování preparátů do tloušťky 100 nm při vysokém zvětšení a s velkou rozlišovací schopností.

Mikroskop využívá proudu elektronů, které procházejí vzorkem. Z interakce mezi proudem elektronů a vzorkem je poté vytvořen obraz. TEM potřebuje ke své činnosti mnoho systémů, jako je vysokonapěťový zdroj, elektronika k řízení mikroskopu a výkonný vakuový systém pro vyčerpání vnitřních prostor mikroskopu na hodnotu, která zabezpečí střední vlnou dráhu elektronu alespoň v délce 3 m.

### 4.3 Dynamic Light Scattering

Přístroj Zetasizer Nano využívá pro měření charakteristik nanočástic metody zvané Dynamic Light Scattering (DLS). Ta spočívá v ozáření částic laserem a rozptylem jeho světla na nanočásticích v koloidu. Pohybující se částice způsobují konstruktivní a destruktivní interference na snímači, a proto dochází ke kolísání intenzity rozptýleného světla. Pohyb částic je způsoben Brownovým pohybem. Korelací tohoto kolísání v krátkých časových úsecích ( $\tau$ ) získáme tzv. autokorelační funkci (autocorrelation function, ACF)[26] (Rovnice 1):

$$G_1(\tau) = 1 + b * e^{-2D_t q^2 \tau} \quad (1)$$

*b* – konstanta závislá na použitém přístroji a optických nastaveních

$D_t$  – difúzní translační koeficient

$q$  – vektor rozptylu

Vektor rozptylu se získá jako (Rovnice 2):

$$|q| = \frac{4\pi n_o}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}} \quad (2)$$

$n_o$  – index lomu media

$\lambda_0$  – vlnová délka ve vakuu

$\theta$  – úhel rozptylu

Intenzita ACF je často označovaná jako  $G_2(\tau)$  a získává se z korelační funkce  $G_1(\tau)$  pomocí rovnice 3:

$$G_2(\tau) = 1 + G_1(\tau)^2 \quad (3)$$

Pomocí autokorelační funkce DLS lze získat  $D_t$ . Z něj lze vypočítat hydrodynamický poloměr pevných sférických částic Stokes-Einsteinovou rovnicí (Rovnice 4).

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (4)$$

$k_B$  – Boltzmanova konstanta ( $1.38064852 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ )

$T$  – teplota

$\eta$  – absolutní viskozita

$R_h$  – hydrodynamický poloměr

V případě, že částice nejsou sférické, ale cylindrické, nebo se jedná o nanotrubičky, je nutné rovnici upravit na tento tvar (Rovnice 5).

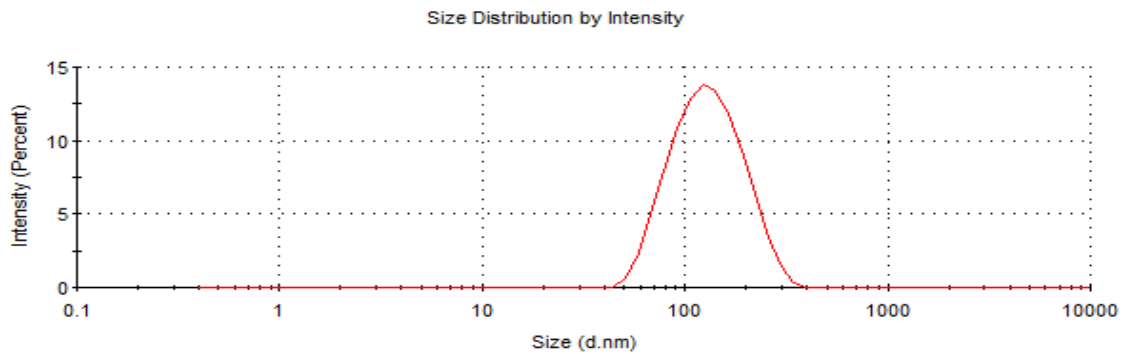
$$D_t = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} \left[ \ln \left( \frac{L}{d} \right) + 0,32 \right] \quad (5)$$

$L$  – délka cylindru

$d$  – průměr cylindru

Program nakonec data z měření vyhodnotí a získáme tabulkové údaje, jako jsou průměrná velikost částic a rozložení velikosti částic (PDI), a také graf rozložení velikosti částic, jehož příklad je na obrázku (Obr. 8).





Obrázek 6 - Příklad rozložení velikosti částic (Zetasizer Nano)

Přístroj dokáže také měřit tzv. zeta potenciál, jinak nazývaný elektrokinetický potenciál. Tento potenciál vzniká mezi prostředím a elektrickou dvouvrstvou (smykovou vrstvou) nanočástic. Elektrická dvojvrstva vzniká na nabitě částici, pokud je rozptýlena ve vodním mediu. Vnitřní vrstva je tvořena ionty/molekulami s opačným nábojem, než má částice samotná. Za touto vrstvou se nachází difúzní vrstva, která je složená z kladných i záporných nábojů. Mezi touto vrstvou a prostředím je ještě takzvaná smyková rovina, která působí jako rozhraní mezi pohybující se částicí a prostředím. Zeta potenciál vyjadřuje rozdíl potenciálů mezi elektrickou dvouvrstvou a prostředím, které ji obklopuje. Podle jeho velikosti můžeme určit, zda je koloidní systém elektrostaticky stabilní, či nikoli. Hodnoty zeta potenciálu 0 až  $\pm 10\text{mV}$  označují částice vysoce elektrostaticky nestabilní, 10 až  $\pm 20\text{mV}$  poměrně stabilní, 20 až  $\pm 30\text{mV}$  mírně stabilní a od  $\pm 30\text{mV}$  vysoce stabilní. [27].

Potenciál na povrchu částic je neměřitelný a je označován jako  $\psi_0$ . Elektrické pole kolem částice klesá podle vztahu (Rovnice 6).

$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x} \quad (6)$$

$\psi$  - povrchový potenciál ve vzdálenosti  $x$

$\psi_d$  - povrchový potenciál difúzní vrstvy

$\kappa$  - Debye-Hückelův parametr

$x$  - vzdálenost

Debye-Hückelův parametr je závislý na iontové síle, což znamená, že pokud zvýšíme přítomnost iontů, dojde ke zúžení dvojvrstvy a snížení zeta potenciálu.

Zeta potenciál nemůže být měřen přímo, a proto se vyvozuje z elektroforetické pohyblivosti ( $\mu_e$ ) částice ve vytvořeném elektrickém poli. Ta se počítá z rovnice 7.

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (7)$$

$v$  – rychlost částice [ $\mu\text{m}/\text{s}$ ]

$E$  – síla elektrického pole [ $\text{V}/\text{cm}$ ]

Nyní můžeme díky Henryho rovnici vypočítat zeta potenciál (Rovnice 8).

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0 \zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (8)$$

$\varepsilon_r$  – relativní permitivita prostředí

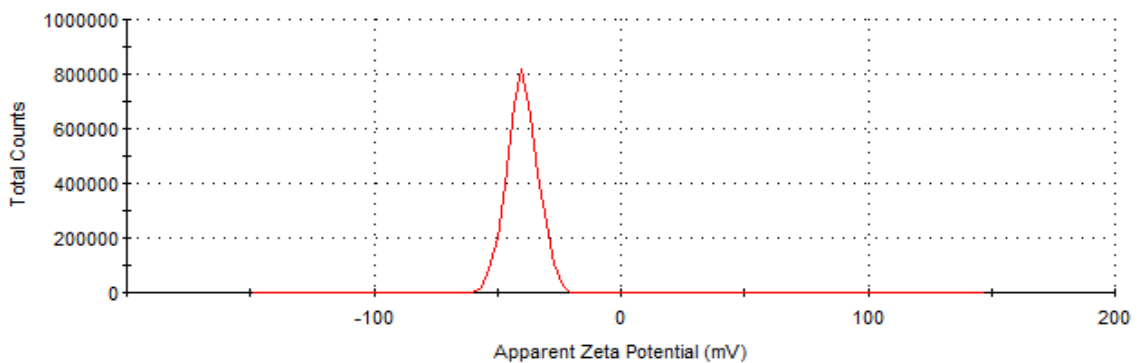
$\varepsilon_0$  – permitivita vakua

$\zeta$  – zeta potenciál

$f(Ka)$  – Henryho funkce

$\eta$  – viskozita prostředí za dané teploty

Rychlost částice je možné měřit dvěma způsoby. První je založena na použití laserového paprsku, který je rozdělen na dva. Jeden prochází vzorkem a druhý slouží jako referenční. Poté jsou oba paprsky zkombinovány a určí se Dopplerův posun. Rychlost částice je poté vypočítána z něj. Druhou variantou je využití elektrického pole o vysoké frekvenci. To přinutí částici oscilovat. Velikost oscilace a fázový úhel (rozdíl mezi střídavým proudem před a po průchodu roztokem) poté slouží k určení velikosti částic a zeta potenciálu. Data poté vyhodnotí přístroj v tabulkách a grafu (Obr. 9)



Obrázek 7 – Distribuce zeta potenciálu (Zetasizer Nano)

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je příprava nanogelů na bázi oxidovaného dextranu síťovaného cisplatinou s možným využitím při léčbě rakovinných onemocnění. Práce popisuje modifikaci dextranu pomocí primární a sekundární oxidace a přípravu DXA o různých molárních hmotnostech a následný mechanismus síťování dextranu cisplatinou. Pro síťování byly použity dva modifikované dextransy o různé molární hmotnosti, které byly poté síťovány při různých teplotách a koncentracích. Následně byla studována závislost hydrodynamického průměru ( $R_h$ ) a zeta potencialů vzniklých nanogelů na podmínkách přípravy pomocí Zetasizer Nano. Nejlepší vzorky byly podrobeny testu pomocí XRF spektroskopie pro zjištění množství navázaného léčiva a byly u nich provedeny studie rychlosti uvolňování cisplatinu.

## **I. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 EXPERIMENT

### 6.1 Materiály a metody

V této práci jsme pracovali s dextranem z bakterií *Leuconostoc spp.* (Sigma Aldrich Co.) o  $M_w$  106 kDa a indexem polydisperzity 5,59 (naměřeno pomocí metody GPC). Pro primární oxidaci byl použit jodistan sodný ( $\text{NaIO}_4$ ) a ethylen glykol (čistota p.a., Penta, Česká republika). Na sekundární oxidaci dialdehydextranu byl použit chloritan sodný ( $\text{NaClO}_2$ , 80 %), kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\geq 99.8$  %), kyselina amidosulfonová ( $\text{H}_3\text{NSO}_3$ , 99.3 %) (Sigma Aldrich, Co.), hydroxid sodný ( $\text{NaOH}$ ,  $\geq 98$  %) (Lachner, Czech Republic). Pro výrobu ciplatiny byl použit tetrachloroplatnatan draselný ( $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ) (AlfaAesar, 98 %), 26 % roztok amoniaku ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (Penta), dusičnan stříbrný ( $\text{AgNO}_3$ ) (Sigma-Aldrich, 99 %), chlorid draselný ( $\text{KCl}$ ) (Sigma-Aldrich, p. a.) a jodid draselný ( $\text{KI}$ ) (Sigma-Aldrich, p. a.). Pro test uvolňování cisplatin z nanogelu byl použit fosfátem pufovaný solný roztok (PBS – Phosphate-buffered saline, pH 7,4, Invitrogen, USA). Dalšími chemikáliemi použitými v průběhu charakterizace vzorků byly dusičnan sodný ( $\text{NaNO}_3$ , 99.8 %) (Lachner, Czech Republic) a dodekahydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 99.6 %) (VWR, Czech Republic). Pro experiment byla využita demineralizovaná voda (0,1  $\mu\text{S}$ ). Na dialýzu produktů byly použity dialyzační membrány schopné zachytit látky o molární hmotnosti (MWCO - molecular weight cut-off) 14 kDa a 3,5 kDa (Sigma Aldrich Co.)

$M_w$  připravených DXA byla stanovena pomocí metody GPC, která byla provedena chromatografem Waters HPLC Breeze (Waters, USA) s detektorem indexu lomu Waters 2414 (teplota driftové trubice 60 °C), kolonou Tosoh TSK gel GMPWXL (300 mm  $\times$  7.8 mm  $\times$  13  $\mu\text{m}$ , teplota 30 °C) a mobilní fází složenou z 0,1 M  $\text{NaNO}_3$  a vodného roztoku 0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ . Pro charakterizaci složení připravené cisplatin a DXA byla využita metoda infračervené spektroskopie. Pro měření byl použit spektrometr Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, USA) vybavený diamantovým krystalem. Měření se provádělo metodou ATR (Attenuated total reflectance – zeslabená úplná reflektance) v rozmezí vlnové délky 4000-700  $\text{cm}^{-1}$  (rozlišení 4  $\text{cm}^{-1}$ , 64 skenů s potlačením vlivů atmosférického vzduchu). Měření zeta potenciálu a  $R_h$  bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) pomocí metody DLS (Dynamic light scattering- Dynamický rozptyl světla) a Smoluchowského modelu. Měřené vzorky byly rozpuštěny ve vodě na koncentraci 1 mg/ml při teplotě 25 °C v kapilární kyvetě DTS1070. Množství navázané cisplatin bylo stanoveno rentgenovou fluorescencí (XRF) pomocí Quant'X

EDXRF analyzátoru (Thermo Scientific, USA). Použité kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním známého množství cisplatin v PBS 7,4.

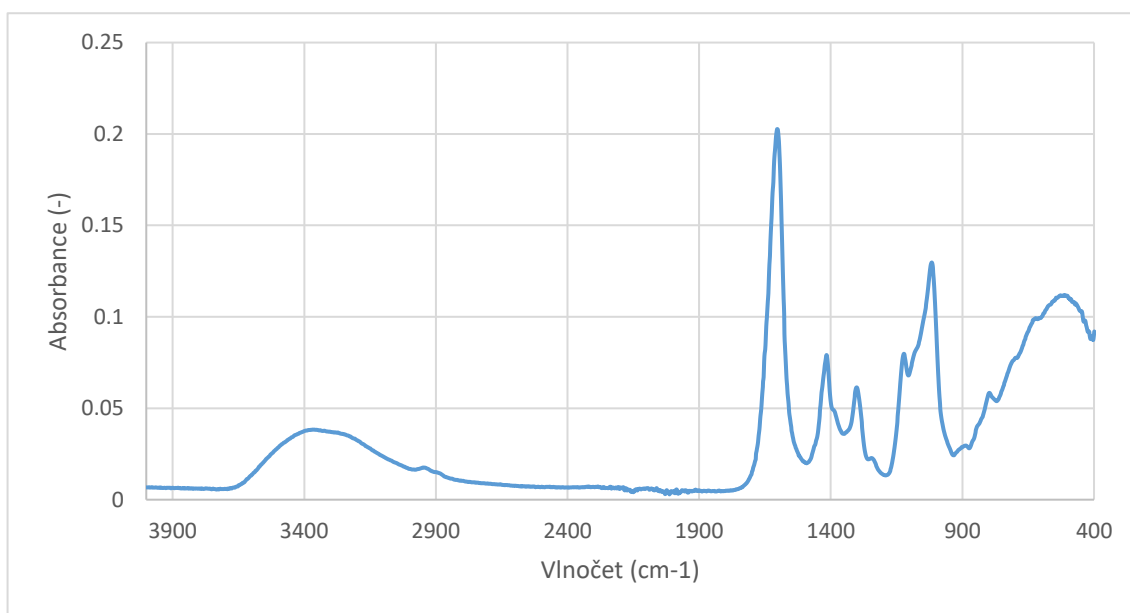
## 6.2 Oxidace dextranu

Nejprve byla provedena primární oxidace dextranu pomocí  $\text{NaIO}_4$ . Pro náš experiment byl zvolen hmotnostní poměr 3,4:1 ( $\text{NaIO}_4$  : dextran) na základě předchozí studie [28]. Periodát o hmotnosti 8,5g byl napřed rozpuštěn v 50 ml demineralizované vody po dobu 30 min při teplotě 30 °C za absence světla. Dextran o hmotnosti 2,5g byl rozpuštěn ve 150 ml demineralizované vody za laboratorní teploty. Po úplném rozpuštění byly oba roztoky smíchány. Primární oxidace probíhala za nepřístupu světla v uzavřené digestoři. Vodní lázeň byla zahřáta na 30 °C a magnetická míchadla byla umístěna jak ve vodní lázni, tak v samotné reakční směsi. Reakce byla po 4 hodinách ukončena přidáním přebytku ethylenglykolu vůči periodátu. Výsledný produkt byl dialyzován proti demineralizované vodě po dobu 2 dnů v dialyzační membráně nepropouštějící látky s vyšší molární hmotností než 14kDa, tedy o MWCO („Molecular-weight cut-off“) = 14 kDa. Voda byla měněna první 3 hodiny každou hodinu a poté dvakrát za den. Produkt byl následně přefiltrován a lyofilizován.

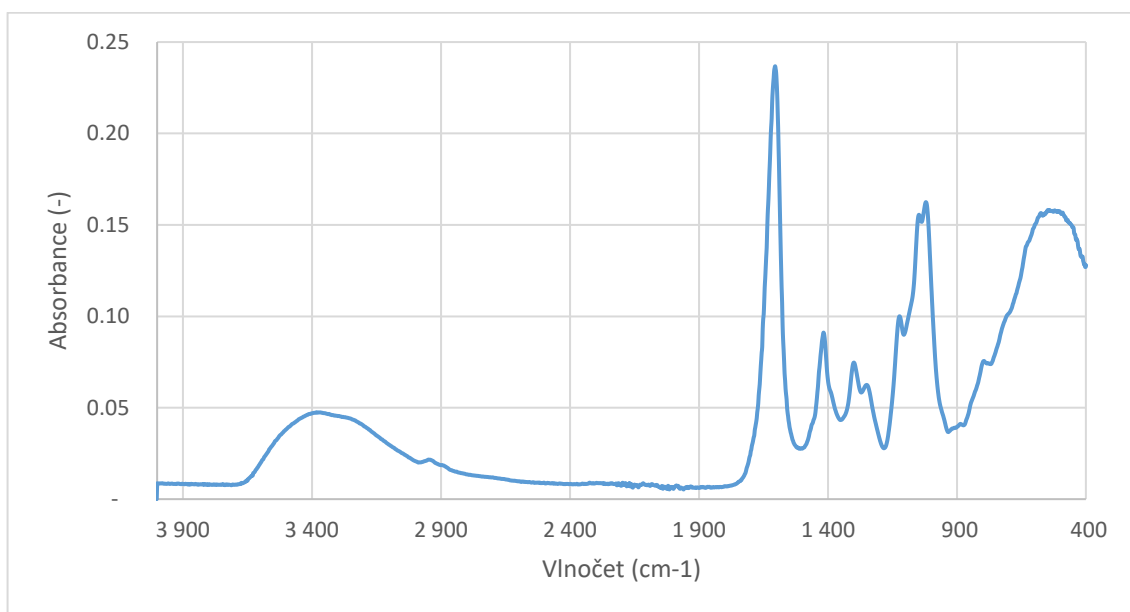
Pro sekundární oxidaci byly připraveny dva vzorky dialdehydextranu (DAXA), každý o hmotnosti 0,5 g. Vzorky byly podrobeny sekundární oxidaci za různých podmínek pro vznik DXA o dvou různých délkách řetězce. První vzorek byl rozmíchán v 50,33 ml vody a poté k němu bylo přidáno 7,721 ml  $\text{NaClO}_4$  (0,35 g/ml) a kyselina octová, jejíž koncentrace byla ve výsledném roztoku nastavena na 0,5M (celkový objem 60 ml). Molární poměr  $\text{NaClO}_2$  a -CHO skupin v DAXA a dosahoval 4 : 1. Došlo k okamžité změně zbarvení roztoku do žluta kvůli vyvíjení  $\text{Cl}_2$ . Reakce poté probíhala za nepřístupu světla a stálého míchání po dobu 7 hodin. Druhý vzorek DAXA byl rozpuštěn v 46,7 ml vody a poté k němu bylo přidáno 3,627 ml kyseliny amidosulfonové (0,11 g/ml) a koncentrace kyseliny octové byla opět nastavena na 0,5 M. Molární poměr mezi kyselinou amidosulfonovou a aldehydickými skupinami DAXA byl 1 : 2 (SAMAC : -CHO). Kyselina amidosulfonová slouží ke snížení molární hmotnosti tím, že štěpí glykosidickou vazbu (viz Kapitola 1.2). Po čtyřech hodinách stálého míchání a bez přístupu světla bylo ke směsi přidáno 7,721 ml  $\text{NaClO}_4$  (0,35 g/ml). Reakční objem tak byl stejný u obou reakcí a reakce dále probíhala stejně jako v prvním případě.

Oxidace byly zastaveny přidáním několika kapek 5 M NaOH, kterým bylo pH směsi nastaveno na hodnotu 8. Vzorky byly opět podrobeny dialýze po dobu dvou dnů a poté

zfiltrvány. První vzorek bylo třeba upravit pomocí zředěného NaOH z pH 6,5 na pH 7,4. Výsledný produkt, sodná sůl dicarboxdextranu, dále značená jako DXA, byl získán pomocí lyofilizace a charakterizován pomocí IR spektroskopie (Obr 10 a 11), kde je jasně patrná přítomnost intenzivních pásů  $-\text{COOH}$  skupin, a jeho molární hmotnost zjištěna pomocí GPC. U prvního vzorku byl naměřen hmotnostní střed molárních hmotností  $M_w = 170$  kDa a index polydisperzity 3,67, u druhého vzorku bylo  $M_w = 11$  kDa a index polydisperzity 1,46.



Obrázek 8 – IR spektrum DXA s  $M_w$  170 kDa.



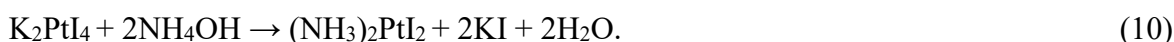
Obrázek 9 – IR spektrum DXA s  $M_w$  11 kDa.

### 6.3 Příprava cisplatiny

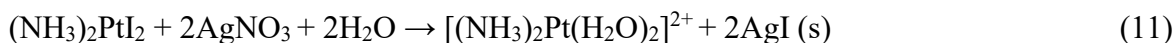
Nejdříve byl navážen 1 g  $K_2PtCl_4$  a k němu přidáno 12 ml vody. Vzniklá suspenze byla míchána do úplného rozpuštění. Dále bylo do roztoku v nadbytku přidáno KI (2,4 g), výsledný molární poměr  $K_2PtCl_4$  : KI byl tedy 1 : 6 (Rovnice 9).



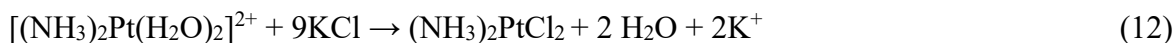
Reakce probíhala za nepřístupu světla po dobu 15 min. Došlo ke změně barvy roztoku z oranžové na velmi tmavě hnědou. Následně bylo do reakční směsi zahřáté na 45 °C přidáno 0,35 ml 26 %  $NH_4OH$  ( $K_2PtCl_4$  :  $NH_4OH$  1 : 2) a směs poté míchána 45 min (Rovnice 10).



Reakční směs byla následně ochlazena v ledové lázni po dobu 10 min a následně zfiltrována přes filtrační papír (0,45  $\mu m$ ). Filtrační koláč byl vysušen ve vakuové sušárně při teplotě 35 °C. Po vysušení meziproduct  $(NH_3)_2PtI_2$  vážil 0,6213g a podle toho bylo vypočteno množství potřebného  $AgNO_3$  pro další reakci. Meziproduct byl rozpuštěn v minimálním množství vody a zahřát na 45 °C. Poté bylo do roztoku přidáno 0,5 g  $AgNO_3$  (220 % přebytek vůči  $(NH_3)_2PtI_2$ ) a reakce probíhala po dobu 45 min za stejných podmínek (Rovnice 11).

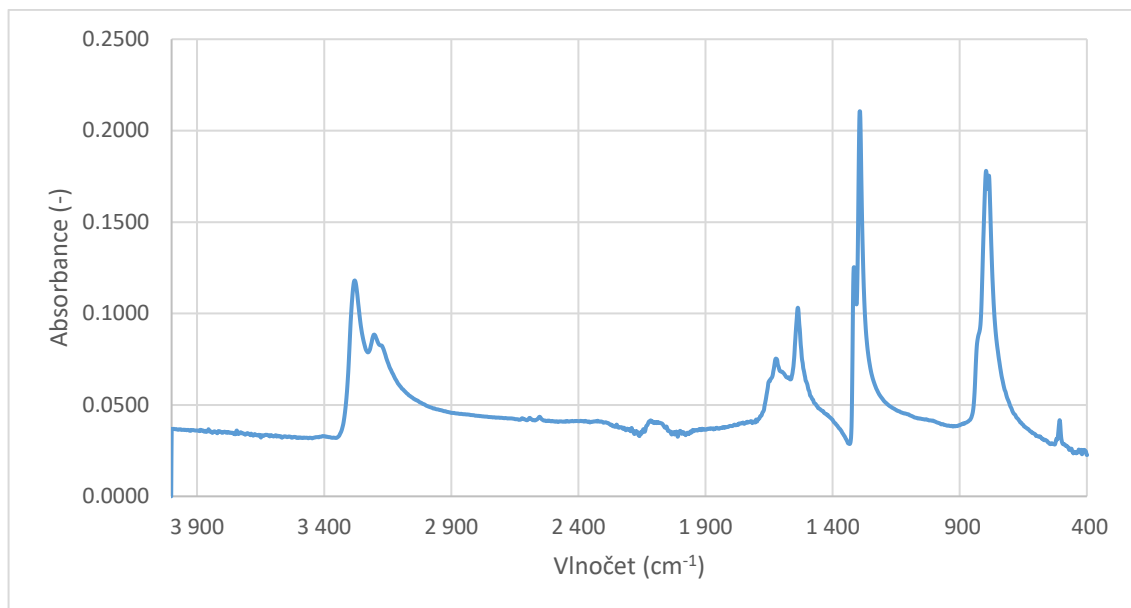


Po reakci byla směs chlazená 10 min v ledové lázni a zfiltrována přes filtrační papír (0,45  $\mu m$ ). Zkouška, zda v roztoku zůstaly zbytkové ionty  $Ag^+$ , byla provedena přidáním pár kapek 1 M HCl. V případě vzniku bílého zákalu roztok stále obsahoval ionty  $Ag^+$  a filtraci bylo nutné provést znovu. Finální roztok by měl být čirý a mít lehce nažloutlé zbarvení. Takovýto roztok byl zahříván na 40 °C a za stálého míchání přidán nadbytek (1 g) KCl (Rovnice 12).



Reakce probíhala 20 min, následně byla směs zchlazena a vyloučené jasně žluté krystalky cisplatiny byly zfiltrovány přes stejný filtr jako předtím a vzniklý filtrační koláč sušen 90 min ve vakuové sušárně. Následná rekrystalizace byla provedena pomocí 1 % roztoku NaCl přivedeného k varu, který byl pozvolna přidáván za stálého míchání k cisplatině. Po vyčerení NaCl je roztok nejprve pomalu chlazen a poté ponechán 45 min v ledové lázni. Krystaly cisplatiny byly opět zfiltrovány a vysušeny ve vakuové sušárně. Výsledná cisplatina byla charakterizována pomocí IR spektroskopie (Obr. 12).





Obrázek 10 – IR spektrum námi připravené cisplatiny

#### 6.4 Příprava nanogelů

Příprava nanogelů spočívá v přímé reakci mezi cisplatinou a oxidovaným dextranem (Obr. 7). Je ovšem nutné zvolit si vhodný poměr mezi síťovadlem (cisplatinou) a DXA. Protože každá oxidovaná jednotka DXA je schopná vázat cisplatinu bidentátně (obsahuje dvě  $-\text{COOH}$  skupiny), k síťování řetězců nedochází, resp. jen v omezené míře, dokud není cisplatinou v nadbytku vůči volným  $-\text{COOH}$  skupinám dextranu. Proto jsme si napřed určili maximální vazebnou kapacitu DXA vůči cisplatině. Hmotnostní poměr obou složek byl vypočten z molárních hmotností cisplatiny  $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , sodné soli DXA  $201,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a stupně oxidace DXA 85 % zjištěného v předchozí práci [28]. Maximální vazebná kapacita DXA pro bidentátně vázanou cisplatinu je tedy asi 56 hm%, což odpovídá hmotnostnímu poměru reaktantů 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA). Pro srovnání byly kromě tohoto poměru testovány ještě dva další hmotnostní poměry a to jeden nižší (4 : 5) a jeden vyšší (9 : 5).

Kromě různých hmotnostních poměrů složek byly pro testy vybrány také dva deriváty DXA s různými molárními hmotnostmi - jeden s  $M_w$  (170 kDa) a jeden s nižším  $M_w$  (11 kDa). U druhého DXA byla cíleně snížena molární hmotnost za použití kyseliny amidosulfonové, jak bylo popsáno v kap. 1.2.

Samotná příprava nanogelů začínala rozpuštěním cisplatinou ve vodě ( $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) za nepřístupu světla. Celou dobu byl roztok probubláván vzduchem, aby nedocházelo k nežádoucím reakcím cisplatinou. Současně byl rozpuštěn ve vodě i DXA ( $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a

roztoky byly dále smíchány podle dříve popsaných hmotnostních poměrů a doplněny vodou na objem 5 ml.

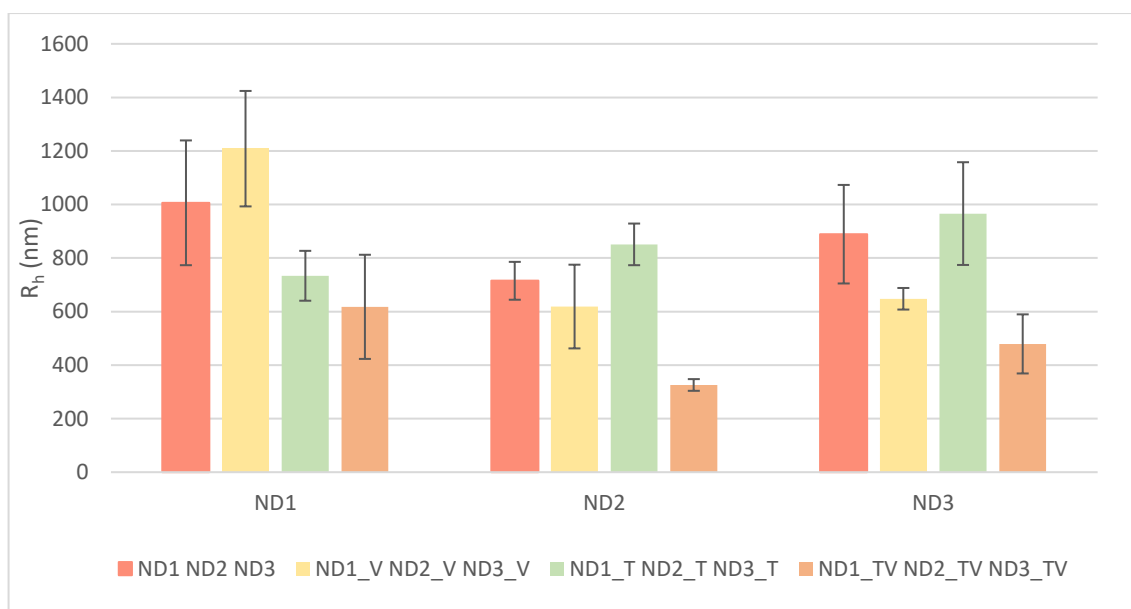
U takto připravených roztoků byly dále testovány různé reakční podmínky. Pro lepší orientaci bylo zavedeno následující označení vzorků. Každý vzorek byl popsán jako ND (zkratka Nanogel DXA) a číslem od jedné do tří podle hmotnostního poměru cisplatinou : DXA (vzestupně, tj. 1 odpovídá hmotnostnímu poměru 4 : 5, zatímco 2 odpovídá hmotnostnímu poměru 6,5 : 5 a číslo 3 odpovídá hmotnostnímu poměru 9 : 5). Tyto vzorky napřed reagovaly 72 hodin za nepřístupu světla a mírného míchání při laboratorní teplotě. Dále byl testován vliv objemu. Vzorky s označením V byly doplněny na objem 40 ml, tj. 8x větší než u standardních vzorků. Vliv teploty byl zkoumán u vzorky s označením T, které byly zahřívány na teplotu 90 °C po jednu hodinu v olejové lázni. Všechny vzorky byly po reakci podrobeny čtyřhodinové dialýze za použití membrány s MWCO 3.5 kDa pro odstranění nenavázané cisplatinu a poté lyofilizovány. Vzorky byly primárně charakterizovány pomocí velikosti hydrodynamického průměru částic a jejich zeta potenciálu na přístroji Zetasizer Nano. Naším cílem bylo vytvořit nanogel s hydrodynamickým průměrem v rozmezí 10–150 nm, PDI pod 0,3 a zeta potenciálem větším než  $\pm 30$  mV (ideální parametry pro přenos léčiv). Při této velikosti mají nanočástice stále velký povrch, jsou schopné pronikat do tumorů, a přitom dochází k jejich zvýšenému usazování v nádorech v důsledku EPR efektu. PDI určuje, že mají dostatečně úzkou distribuci částic na to, aby bylo chování různých částic vzájemně dostatečně podobné. Dále, pokud je absolutní hodnota zeta potenciálu vyšší než 30 mV, tak jsou částice v daném prostředí považovány za stabilní.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Nanogely připravené z DXA o vysoké molární hmotnosti

V prvním experimentu byl síťován DXA o vysoké  $M_w$  (170 kDa) cisplatinou, tak jak bylo popsáno v kapitole 6.3. Byla vytvořena sada 12 vzorků s označením NDx, NDx\_V, NDx\_T a NDx\_TV (kde x je hodnota od 1-3, odpovídající různým poměrům DXA a cisplatinu).

Hydrodynamický poloměr byl změřen vždy třikrát pro každý vzorek přístrojem Zetasizer Nano. Průměrné hodnoty  $R_h$  a příslušné standardní odchylky měření jsou shrnuty v grafu na obrázku 13.

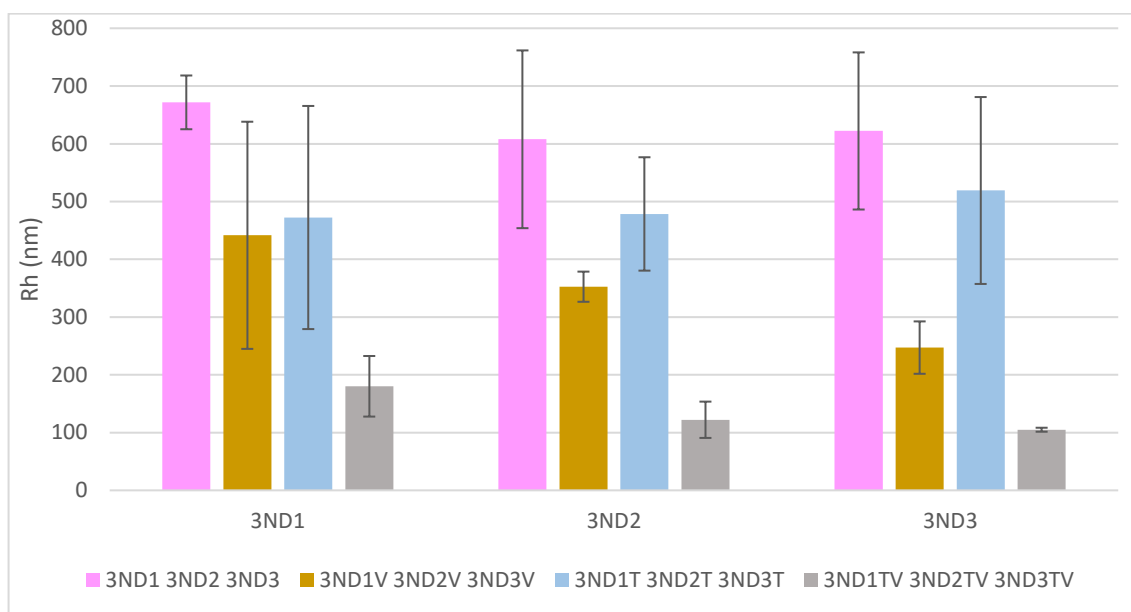


Obrázek 11 -  $R_h$  nanogelů připravených z vysokomolárního DXA rozdělených podle podmínek přípravy (1-3 určuje hmotnostní poměr CP : DXA, T – reakce probíhala 1h za zvýšené teploty, V – reakce probíhala v objemu 40 ml)

Velikosti částic vytvořených z vysokomolárního DXA byly příliš vysoké pro náš cíl, a to bez ohledu na zvýšení objemu reakce (\_V) nebo zvýšení teploty při reakci (\_T) - výsledné hodnoty jsou stejné v rámci chyby měření. U některých vzorků se navíc objevovaly signály částic o velikostech v řádu mikrometrů, což je činí pro naši aplikaci naprosto nevhodné. Kombinací obou podmínek (\_TV) však dosahujeme snížení  $R_h$  částic. Nejnižší průměrné hodnoty  $R_h$  měly částice připravené s molárním poměrem 6,5:5 (cisplatina : DXA), tedy vzorek ND2\_TV s průměrným  $R_h = 326 \pm 22$  nm a PDI = 0,46. Zeta potenciál toho vzorku byl  $-52,9 \pm 3,7$  mV, což ukazuje na stabilní nanočástice.

## 7.2 Nanogely připravené z DXA o nízké molární hmotnosti

Jako další byly síťovány vzorky DXA o nízké  $M_w$ , u kterých byla molární hmotnost upravena kyselinou amidosulfonovou na 11 kDa. Byla opět vytvořena sada 12 vzorků s označením 3NDx, 3NDx\_v, 3NDx\_T, 3NDx\_TV. Číslo 3 před zkratkou ND označuje nanogely připravené z DXA s nižším  $M_w$  (kyselina amidosulfonová reagovala 4 h, než bylo do reakce přidáno  $\text{NaClO}_4$ , viz. Kapitola 7.1). Všechny vzorky byly opět měřeny třikrát a hodnoty v grafu (Obr. 14) jsou jejich průměrné hodnoty  $R_h$  se standardními odchylkami.



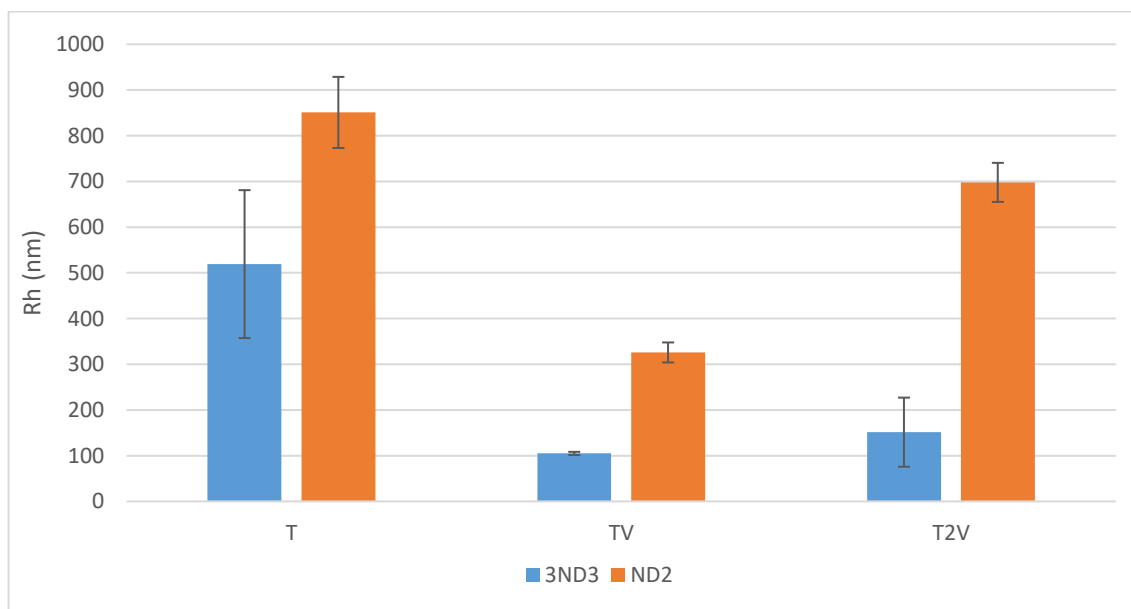
Obrázek 12 -  $R_h$  nanogelů připravených z nízkomolárního DXA rozdělených podle podmínek přípravy. (1-3 určuje hmotnostní poměr CP : DXA, T – reakce probíhala 1h za zvýšené teploty, V – reakce probíhala v objemu 40 ml)

U nanogelů připravených z nízkomolárního DXA podmínky přípravy silně ovlivňují velikost výsledných částic. Podle dat můžeme usoudit, že zvýšení objemu reakce mělo pozitivní vliv na snížení velikosti částic, která je u většiny 3NDx\_V vzorků výrazně nižší než u řady 3NDx. Naopak zvýšení teploty ve spojení se zkrácením reakční doby u nanogelů s označením 3NDx\_T nevedlo ke snížení průměrné velikosti částic v rámci odchylek měření. Jako nejlepší variantu přípravy můžeme opět označit kombinaci vyššího objemu a teploty, tedy vzorky s koncovkou \_TV. Zde se jako nejlepší vzorek jasně jeví 3ND3\_TV s průměrnou velikostí částic  $105 \pm 3$  nm a PDI 0,28. Zeta potenciál tohoto vzorku byl  $-50,4 \pm 2,2$  mV.

### 7.3 Úprava reakčních podmínek

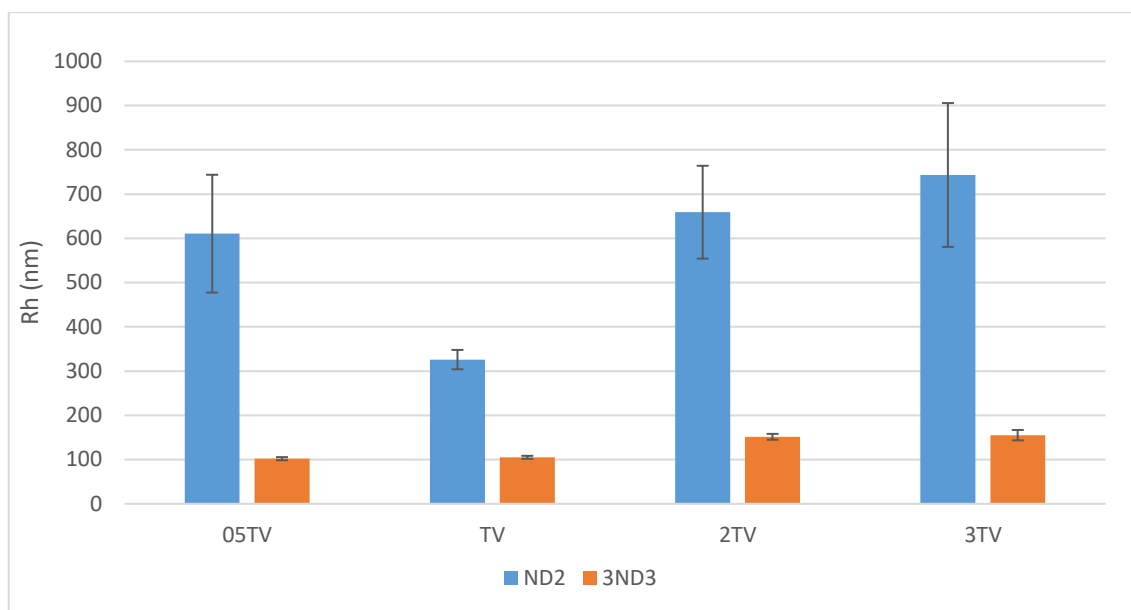
Pro další testy byly vybrány dva nejlepší vzorky z každé sady (ND2\_TV, 3ND3\_TV), u kterých jsme testovali vliv dalších změn reakčních podmínek na jejich vlastnosti. V předchozích testech jsme byli schopni vytvořit nejmenší částice kombinací zvýšení objemu a zkrácení doby reakce za zvýšené teploty (\_TV). Proto jsme se při dalších úpravách drželi těchto zásad. Číslo před písmenem V nebo T označuje změnu těchto podmínek. První testovanou změnou bylo zvýšení objemu reakce na 200 ml (\_2V). Dále byly připraveny vzorky s pozměněnou dobou reakce za zvýšené teploty. První vzorek reagoval 30 min (\_0,5T), druhý reagoval 2 hodiny (\_2T) a třetí 3 hodiny (\_3T). Graf na obrázku 15 ukazuje závislost velikosti částic na objemu reakce. Pro porovnání s nově naměřenými daty byly do grafu zaneseny i data z předešlých měření (ND2\_T, ND2\_TV, 3ND3\_T, 3ND3\_TV).

Zvýšení objemu reakce na objem 200 ml (\_T2V) mělo negativní vliv jak na průměrný  $R_h$  částic, tak na hodnotu odchylky měření v porovnání se sérií \_TV. Hodnoty  $R_h$  3ND3\_T2V byly ale stále znatelně menší než u 3ND3\_T, tedy u vzorku s nejmenším objemem. Podobné zlepšení je možné pozorovat i řady ND2. Nejlepších výsledků ovšem dosahovaly vzorky značené jako \_TV, tedy nanogely připravené zahřátím při objemu 40 ml.



Obrázek 13 - závislost  $R_h$  částic na objemu reakce za zvýšené teploty pro vzorek ND2 a 3ND3

Na druhém grafu (Obr. 16) je vidět závislost  $R_h$  částic na čase ohřevu.

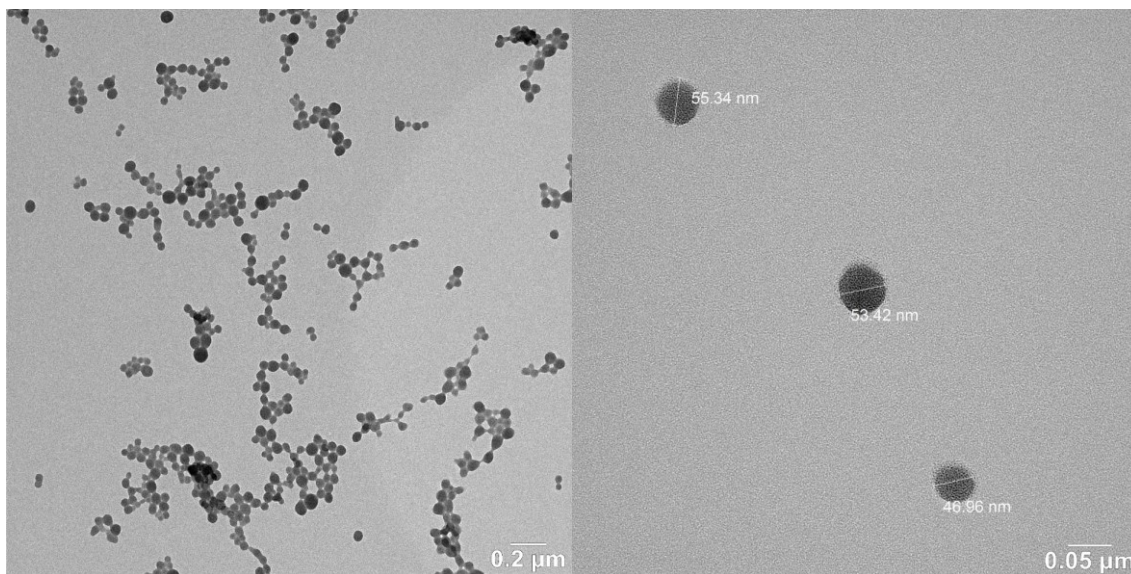


Obrázek 14 - Závislost  $R_h$  části na čase ohřevu při objemu 40 ml pro vzorky ND2 a 3ND3.

V případě vzorku 3ND3 a délky ohřevu 30 min (3ND3\_0,5TV) byl  $R_h$  v rámci odchylky srovnatelný se vzorkem 3ND3\_TV ( $102 \pm 4$  nm), ovšem PDI bylo vyšší (0,35) a zeta potenciál naopak nižší ( $-36,1 \pm 1,4$  mV). Doba ohřevu delší než 1 h naopak už působila negativně a velikost  $R_h$  vzrostla o cca 50 % v porovnání se vzorkem 3ND3\_TV. Podobný trend, tj. vznik nejmenších částic po 1h ohřevu byl pozorován i u série ND2.

U nejlepších vzorků DXA s vysokou (ND2\_TV) i nízkou (3ND3\_TV) molární hmotností byla změřena hmotnostní koncentrace pomocí metody XRF. Vzorek ND2\_TV obsahoval 76 % cisplatinu a vzorek 3ND3\_TV obsahoval 70 % cisplatinu. Pro srovnání, podobné nanogely připravené zesíťováním derivátů hyaluronanu obsahovaly pouze 28 % cisplatinu [23]. Dextranové nanogely jsou tedy schopny pojmout více než 2.5x více léčiva.

S ohledem na velikost, PDI a stabilitu (zeta potenciál) byl jako stěžejní vzorek pro další zkoumání vybrán vzorek 3ND3\_TV s  $R_h = 105 \pm 3$  nm, PDI 0,28 a zeta potenciálem  $-50,4 \pm 2,2$  mV. Tento vzorek byl analyzován pomocí TEM, kde byla změřena velikost částic a určen jejich tvar (Obr. 17).



a)

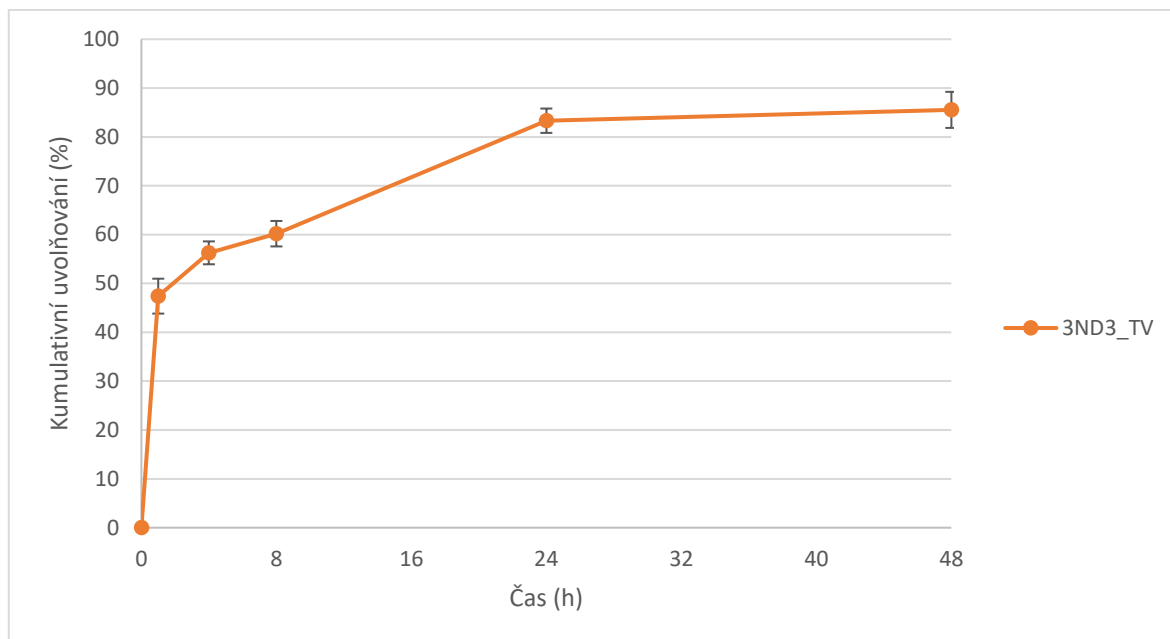
b)

Obrázek 15 – a) Přehledový TEM snímek nanogelu 3ND3\_TV (vlevo) b) Snímek jednotlivých nanogelových částic 3ND3\_TV s jejich průměry změřenými pomocí programu (vpravo)

Pozorování pomocí TEM ukázalo, že částice mají kulovitý tvar a jejich průměr je kolem 50 nm, což odpovídá asi poloviční velikosti, než byla naměřena pomocí Zetasizeru Nano. To je způsobeno tím, že vzorek je před měřením na TEM vysušen, zatímco měření na Zetasizeru Nano probíhá ve vodném médiu. Přítomnost vody způsobuje nabobtnání částice nanogelů a také vznik elektrické dvouvrstvy, což se podepisuje na velikosti  $R_h$ .

#### 7.4 Uvolňování CP z nanogelu

Uvolňování cisplatin bylo pozorováno v podmínkách napodobující prostředí *in vitro* (prostředí v lidském těle), tj. v PBS při 37 °C. Tomuto pozorování byl podroben pouze vzorek 3ND3\_TV. Pro uvolňování bylo rozpuštěno 10 mg vzorku v 5 ml PBS při teplotě 37 °C a tento roztok byl převeden do dialyzační membrány (MWCO = 3,5 kDa) a dialyzován proti 95 ml PBS. V průběhu 48 hodin byly odebírány alikvotní vzorky (5 ml) a tento objem byl do lázně vždy doplněn v podobě 5 ml PBS. Obsah platiny ve vzorcích byl následně charakterizován pomocí XRF spektrometru a z těchto dat bylo vypočítáno kumulativní uvolňování cisplatin, které bylo následně zaneseno do grafu (Obr. 18)



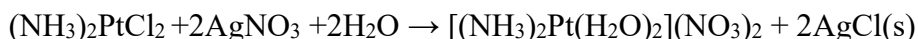
Obrázek 16 – Závislost kumulativního uvolňování cisplatiny z 3ND3\_TV na čase po dobu 48 hodin.

Z grafu je zřejmé, že uvolňování léčiva probíhá příliš rychle, obzvláště v prvních fázích experimentu. Během první hodiny se do lázně uvolnilo téměř 50 % cisplatiny. Toto chování je nežádoucí při léčbě nádorových onemocnění, kdy je upřednostňováno postupné uvolňování léčiva. Pozorované rychlé počáteční uvolňování naznačuje, že velké množství cisplatiny nebylo na nanogel navázáno pomocí chemických vazeb, ale pouze v nanogelu adsorbováno buď v důsledku slabých interakcí mezi  $(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2$  a nosičem, anebo iontových interakcí mezi hydrolyzovanou cisplatinou  $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  a DXA. V pufru se silným iontovým prostředím dojde k rychlému nahrazení cisplatinového zbytku sodnými a draselnými ionty a tím k jeho „vytlačení“ z matrice. V dalším kroku jsme se proto pokusili metodu přípravy dále upravit, zvýšit množství cisplatin navázané v nanogelu pomocí chemických vazeb a tím zpomalit rychlost uvolňování.

## 7.5 Nanogely připravené pomocí aktivované cisplatiny

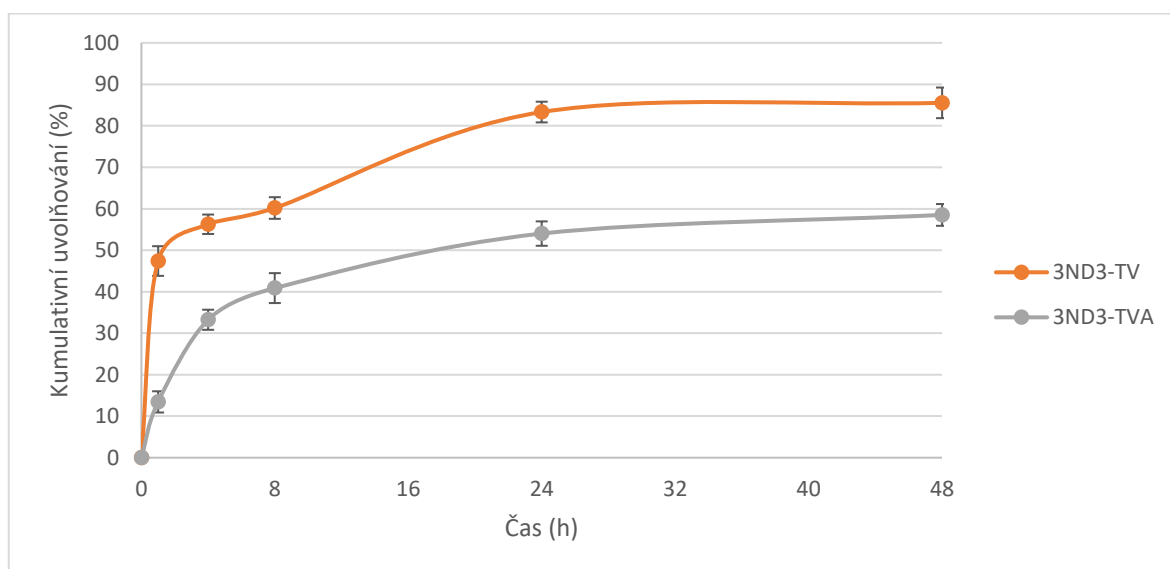
Protože je hydrolyza cisplatin rychlost určujícím krokem tvorby konjugátu (kladně nabitý  $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  komplex je přitahován k záporně nabitým  $-\text{COOH}$  skupinám, které snadno substituují slabě vázané molekuly vody) byla napřed cisplatina rozpuštěna ve vodě po dobu jedné hodiny a následně se nechala reagovat s dusičnanem stříbrným ( $\text{AgNO}_3$ ) (Rovnice 13).





Vzniklý  $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$  komplex je reaktivnější než původně použitá cisplatina a může reagovat přímo s  $-\text{COOH}$  skupinami nosiče, bez nutnosti hydrolyzy. Síťování nanogelu probíhalo za stejných podmínek jako u vzorku 3ND3\_TV (1 hodinu při  $90^\circ\text{C}$  v objemu 40 ml) a vzorek byl označen zkratkou 3ND3\_TVA. Tento vzorek byl charakterizován pomocí Zetasizeru Nano a jeho  $R_h$  byl  $103,3 \pm 2,7$  nm a PDI 0,26. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s těmi naměřenými pro 3ND3\_TV. Naopak zeta potenciál klesl na  $-25,9 \pm 0,1$  mV, což naznačuje menší počet volných  $-\text{COOH}$  skupin nosiče a tím pádem větší úspěšnost chemické konjugace cisplatin.

Následně byl vzorek podroben zkoušce uvolňování cisplatin za stejných podmínek, jaké jsou popsány v kapitole 7.4 a výsledky byl zaneseny do grafu (Obr. 19) spolu s předchozími daty pro srovnání.



Obrázek 17 - Závislost kumulativního uvolňování cisplatin z 3ND3\_TVA na čase po dobu 48 hodin. Pro lepší srovnání je zobrazen i průběh uvolňování cisplatin z 3ND3\_TV.

Uvolňování cisplatin z 3ND3\_TVA je výrazně pomalejší než v případě vzorku 3ND3\_TV a je vidět, že se cisplatina uvolňuje po menších dávkách. Například po první hodině se uvolní ze vzorku 3ND3\_TVA asi jen 13 % vázané cisplatin, což je asi jen čtvrtina v porovnání se vzorkem 3ND3\_TV. Po 24 h to byla asi jen polovina z celkového množství navázané CP, zatímco v případě 3ND3\_TV to už bylo přes 80%. Z toho můžeme vyvozovat, že díky úpravě cisplatin před síťováním DXA došlo k významnému snížení množství cisplatin vázané pomocí iontových interakcí.

## ZÁVĚR

Tato práce se zabývala přípravou nanogelů z dikarboxydextranu síťovaného pomocí cisplatinu. Tento nanogel má sloužit pro přenos cisplatinu do rakovinových buněk a k potenciální léčbě rakoviny. Pro tuto aplikaci jsou vhodné nanočástice o velikosti 10–150 nm, jejichž příprava byla i naším cílem.

Dextran byl modifikován pomocí dvoustupňové oxidace za vzniku dikarboxydextranu, díky které je schopen navázat cisplatinu. Díky tomu, že jedna jednotka dikarboxydextranu má dvě reakční místa schopné vázat cisplatinu, je jeho přenosová kapacita oproti jiným polysacharidům velmi vysoká a připravené nanogely obsahovaly přes 70 hm% cisplatinu.

Velikost částic nanogelu byla ovlivněna pomocí podmínek, za jakých síťování probíhalo (objem, teplota a čas reakce), molárního poměru DXA : cisplatinu a velikostí  $M_w$  použitého DXA. Z našich měření vychází, že ideální podmínky přípravy jsou při objemu 40 ml a teploty 90 °C, kdy reakce probíhá 1 hodinu. Při použití těchto podmínek měly námi připravené nanogely částice o  $R_h$  kolem 100 nm a PDI pod 0,3, tedy limitem vyžadovaným pro farmaceutické aplikace.

Uvolňování léčiva z těchto nanogelů bylo při prvních testech příliš rychlé, a proto byla metoda síťování dále modifikována. Byl zařazen krok spočívající v aktivaci cisplatinu pomocí dusičnanu stříbrného. Tato úprava dokázala zpomalit uvolňování cisplatinu v prvotních hodinách téměř na čtvrtinu původních hodnot. Ačkoliv průběh uvolňování stále není ideální, protože dochází k uvolnění největšího množství cisplatinu během prvních osmi hodin, jedná se o poměrně významný krok k použitelnosti připravených nanogelů pro biologické aplikace.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Biochemie:Sacharidy – MojeChemie* [online]. [cit. 2021-05-10]. Dostupné z: <https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Sacharidy>
- [2] GUO, M.Q., X. HU, C. WANG and L. AI. Polysaccharides: Structure and Solubility, Solubility of Polysaccharides, Zhenbo Xu, IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.71570. [cit. 2021-04-10]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/solubility-of-polysaccharides/polysaccharides-structure-and-solubility>
- [3] MAYES, P. A. Fysiologicky významné sacharidy. In: R. K. MURRAY, *Harperova biochemie*. 4. vyd. v ČR. Praha, Jinočany: Nakladatelství H & H, Vyšehradská, s.r.o., 2002. ISBN 978-80-7319-013-2.
- [4] DHANESHWAR, S., M. KANDPAL, N. GAIROLA a S. KADAM. Dextran: A promising macromolecular drug carrier. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2006, **68**(6), 705. ISSN 2278-8875 [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: doi:10.4103/0250-474X.31000
- [5] SCHAEFER, C., General commentary to drug therapy and drug risks in pregnancy. In: C. SCHAEFER, P. PETERS a R. K. MILLER, *Drugs During Pregnancy and Lactation* [online]. Academic Press, 2015. ISBN 978-0-12-407901-4 [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: doi:10.1016/C2011-0-09100-7
- [6] ARONSON, J.K. Dextrans. In: *Dextrans* [online]. Oxford, 2016, s. 893–898. ISBN 978-0-444-53716-4 [cit. 2021-02-024]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53717-1.00600-4
- [7] BEMILLER, J. N. Dextran. In: B. CABALLERO, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* [online]. Oxford: Academic Press, 2003, s. 1772–1773. ISBN 978-0-12-227055-0 [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227055-X/00330-8
- [8] LIU, Y. *Dextran-coated Iron Oxide Nanoparticles as Biomimetic Catalysts for Biofilm Disruption and Caries Prevention* [online]. Pennsylvania, 2019. Doctoral thesis. University of Pennsylvania. Dostupné z: [https://repository.upenn.edu/dental\\_theses/47](https://repository.upenn.edu/dental_theses/47)
- [9] MÜNSTER, L., M. FOJTŮ, Z. CAPÁKOVÁ, T. VACULOVÍČ, M. TVRDOŇOVÁ, I. KUŘITKA, M. MASÁŘÍK a J. VÍCHA. Selectively Oxidized Cellulose with Adjustable Molecular Weight for Controlled Release of Platinum Anticancer Drugs. *Biomacromolecules* [online]. 2019, **20**(4), 1623–1634. ISSN 1525-7797. [cit. 2021-05-1]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b01807
- [10] KRISTIANSEN, K. A., A. POTTHAST a B. E. CHRISTENSEN. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research* [online]. 2010, **345**(10), Special Issue: Selected Papers from the 15th European Carbohydrate Symposium, Vienna 2009, 1264–1271. ISSN 0008-6215 [cit. 2021-04-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2010.02.011

- [11] KHOMYAKOV, K.P., M.A. PENENZHIK, A.D. VIRNIK a Z.A. ROGOVIN. Synthesis of dialdehydo- and dicarboxydextran. *Polymer Science U.S.S.R.* [online]. 1965, 7(6), 1140–1145. ISSN 00323950 [cit. 2021-03-23]. Dostupné z: doi:10.1016/0032-3950(65)90394-1
- [12] MÜNSTER, L., B. HANULÍKOVÁ, M. MACHOVSKÝ, F. LATEČKA, I. KUŘITKA a J. VÍCHA. Mechanism of sulfonation-induced chain scission of selectively oxidized polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 229, 115503. ISSN 01448617 [cit. 2021-02-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115503
- [13] *What are Nanoparticles? Definition, Size, Uses and Properties* [online]. [cit. 2021-05-09]. Dostupné z: <https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/what-are-nanoparticles.aspx>
- [14] KHAN, I., K. SAEED a I. KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, 12(7), 908–931. ISSN 1878-5352 [cit. 2021-03-05]. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- [15] KHLEBTSOV, N.G. a L.A. DYKMAN. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* [online]. 2010, 111(1), 1–35. ISSN 0022-4073 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jqsrt.2009.07.012
- [16] DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATAELI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M.R. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, 10(2), 57 [cit. 2021-04-07] Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [17] RAJANI, C., P. BORISA, T. KARANWAD, Y. BORADE, V. PATEL, K. RAJPOOT a R.K. TEKADE. 7 - Cancer-targeted chemotherapy: Emerging role of the folate anchored dendrimer as drug delivery nanocarrier. In: A. CHAUHAN a H. KULHARI, ed. *Pharmaceutical Applications of Dendrimers* [online]. Elsevier, 2020, Micro and Nano Technologies, s. 151–198. ISBN 978-0-12-814527-2 [cit. 2021-02-09]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814527-2.00007-X
- [18] KOPEL, P., D. WAWRZAK, V. MILOSAVLJEVIC, A. MOULICK, M. VACULOVICOVA, R. KIZEK a V. ADAM. Nanotransporters for anticancer drug delivery. In: *Advances in Nanotechnology*. UK ed. edition. New York, Nova Science Publishers Inc, 2015, s. 51. ISBN 978-1-63482-971-7 [cit. 2021-05-04]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/data/pub/mv-book.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/data/pub/mv-book.pdf).
- [19] SHARMA, A., T. GARG, A. AMAN, K. PANCHAL, R. SHARMA, S. KUMAR a T. MARKANDEYWAR. Nanogel—an advanced drug delivery tool: Current and future. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2016, 44(1), 165–177. ISSN 2169-1401, 2169-141X [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: doi:10.3109/21691401.2014.930745
- [20] KABANOV, A.V. a S.V. VINOGRADOV. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*

- [online]. 2009, **48**(30), 5418–5429. ISSN 1521-3773 [cit. 2021-04-21] Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1002/anie.200900441](https://doi.org/10.1002/anie.200900441)
- [21] SIMONSON, A. W., A. LAWANPRASERT, T.D.P. GORALSKI, K.C. KEILER a S.H. MEDINA. Bioresponsive peptide-polysaccharide nanogels - A versatile delivery system to augment the utility of bioactive cargo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2019, **17**, 391–400. ISSN 1549-9642 [cit. 2021-04-17]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.nano.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.10.008)
- [22] WU, W, M. AIELLO, T. ZHOU, A. BERLINER, P. BANERJEE a S. ZHOU. In-situ immobilization of quantum dots in polysaccharide-based nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging, and drug delivery. *Biomaterials* [online]. 2010, **31**(11), 3023–3031. ISSN 0142-9612 [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.011](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.011)
- [23] OHTA, S., S. HIRAMOTO, Y. AMANO, M. SATO, Y. SUZUKI, M. SHINOHARA, S. EMOTO, H. YAMAGUCHI, H. ISHIGAMI, Y. SAKAI, J. KITAYAMA a T. ITO. Production of Cisplatin-Incorporating Hyaluronan Nanogels via Chelating Ligand–Metal Coordination. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2016, **27**(3), 504–508. ISSN 1043-1802, 1520-4812 [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: [doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00674](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00674)
- [24] *Cisplatin - Drug Information - Chemocare* [online]. [cit. 2021-05-12]. Dostupné z: <http://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/cisplatin.aspx>
- [25] GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2019, **88**, 102925. ISSN 0045-2068 [cit. 2021-05-04]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bioorg.2019.102925](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925)
- [26] STETEFELD, J., S.A. MCKENNA a T.R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, **8**(4), 409–427. ISSN 1867-2450, 1867-2469 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: [doi:10.1007/s12551-016-0218-6](https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6)
- [27] BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, **235**, 337–351. ISSN 01683659 [cit. 2021-04-20] Dostupné z: [doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017)
- [28] MÜNSTER, L., M. FOJTŮ, Z. CAPÁKOVÁ, M. MUCHOVÁ, L. MUSILOVÁ, T. VACULOVÍČ, J. BALVAN, I. KUŘITKA, M. MASÁŘÍK a J. VÍCHA. Oxidized polysaccharides for anticancer-drug delivery: What is the role of structure? *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, **257**, 117562. ISSN 0144-8617 [cit. 2021-03-23] Dostupné z: [doi:10.1016/j.carbpol.2020.117562](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117562)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

3ND1	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
3ND1_T	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3ND1_TV	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3ND1_V	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
3ND2	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
3ND2_T	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3ND2_TV	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3ND2_V	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
3ND3	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
3ND3_05TV	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 30 min
3ND3_2TV	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 2 hodin
3ND3_3TV	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 3 hodin
3ND3_T	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3ND3_T2V	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 200 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
3ND3_TV	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3ND3_TVA	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s aktivovanou cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny

3ND3_V	Vzorek nanogelu připravený z vysokomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
ACF	Autocorrelation function
Cisplatinu	cis-diammin-dichloroplatinatý komplex
COOH	karboxylová skupina
Da	Dalton, atomová hmotnostní jednotka, odpovídá g.mol <sup>-1</sup>
DAXA	Dialdehydedextran
DLS	Dynamický rozptyl světla
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DXA	Dikarboxydextran
EPR	Enhanced permeability and retention
M <sub>w</sub>	hmotnostní střed molárních hmotností
MWCO	Molecular weight cut off
ND1	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 5 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
ND1_T	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 5 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
ND1_TV	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
ND1_V	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 4 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
ND2	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 5 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
ND2_05TV	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 30 min
ND2_2TV	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 2 hodin
ND2_3TV	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 3 hodin
ND2_T	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 5 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
ND2_T2V	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 200 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
ND2_TV	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
ND2_V	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 6,5 : 5 (cisplatinu : DXA), při objemu reakce 40 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin

ND3	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
ND3_T	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 5 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
ND3_TV	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
ND3_V	Vzorek nanogelu připravený z nízkomolárního DXA, který reagoval s cisplatinou v hmotnostním poměru 9 : 5 (cisplatina : DXA), při objemu reakce 40 ml za laboratorní teploty po dobu 72 hodin
OH	hydroxylová skupina
PBS	Fosfátem pufovaný solný roztok
PDI	Index polydispersity
PNP	polymer nanoparticle, polymerní nanočástice
R <sub>h</sub>	hydrodynamický průměr
RNA	Ribonukleová kyselina
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
XRF	X-ray fluorescence



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 – Struktura dextranu. Hvězdičky označují pokračování řetězců. ....</i>	11
<i>Obrázek 2 - Schéma oxidace polysacharidů pomocí periodátu - tzv. primární oxidace polysacharidu. ....</i>	13
<i>Obrázek 3 – Strukturní vzorec dextranu po primární oxidaci, a) 3,4- dialdehydextran b) 2,3- dialdehydextran c) 2,4- dialdehydextran. ....</i>	14
<i>Obrázek 4 – Strukturní vzorec dextranu po sekundární oxidaci, a) 3,4-dikarboxydextran b) 2,3-dikarboxydextran c) 2,4-dikarboxydextran. ....</i>	14
<i>Obrázek 5- Snímky TEM různých tvarů zlatých nanočástic[15]. ....</i>	16
<i>Obrázek 8 - Příklad rozložení velikosti částic (Zetasizer Nano) ....</i>	25
<i>Obrázek 9 – Distribuce zeta potenciálu (Zetasizer Nano) ....</i>	26
<i>Obrázek 10 – IR spektrum DXA s <math>M_w</math> 170 kDa. ....</i>	31
<i>Obrázek 11 – IR spektrum DXA s <math>M_w</math> 11 kDa. ....</i>	31
<i>Obrázek 12 – IR spektrum námi připravené cisplatiny ....</i>	33
<i>Obrázek 13 - <math>R_h</math> nanogelů připravených z vysokomolárního DXA rozdělených podle podmínek přípravy (1-3 určuje hmotnostní poměr CP : DXA, T – reakce probíhala 1h za zvýšené teploty, V – reakce probíhala v objemu 40 ml) ....</i>	35
<i>Obrázek 14 - <math>R_h</math> nanogelů připravených z nízkomolárního DXA rozdělených podle podmínek přípravy. (1-3 určuje hmotnostní poměr CP : DXA, T – reakce probíhala 1h za zvýšené teploty, V – reakce probíhala v objemu 40 ml) ....</i>	36
<i>Obrázek 15 - závislost <math>R_h</math> částic na objemu reakce za zvýšené teploty pro vzorek ND2 a 3ND3 ....</i>	37
<i>Obrázek 16 - Závislost <math>R_h</math> části na čase ohřevu při objemu 40 ml pro vzorky ND2 a 3ND3. ....</i>	38
<i>Obrázek 17 – a) Přehledový TEM snímek nanogelu 3ND3_TV (vlevo) b) Snímek jednotlivých nanogelových částic 3ND3_TV s jejich průměry změřenými pomocí programu (vpravo) ....</i>	39
<i>Obrázek 18 – Závislost kumulativního uvolňování cisplatiny z 3ND3_TV na čase po dobu 48 hodin. ....</i>	40
<i>Obrázek 19 - Závislost kumulativního uvolňování cisplatiny z 3ND3_TVA na čase po dobu 48 hodin. Pro lepší srovnání je zobrazen i průběh uvolňování cisplatiny z 3ND3_TV. ....</i>	41

