

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



**STUDIUM VLASTNOSTÍ BIODEGRADOVATELNÝCH
NANOČÁSTIC NA BÁZI POLYESTERŮ**

Diplomová práce

Hradec Králové 2020

Jiřina Blažková

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

Dne 15. 5. 2020 v Hradci Králové

.....

Jiřina Blažková

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi Ph.D. za odborné vedení mé práce. Děkuji také za cenné rady, trpělivost, ochotu a přátelský přístup. Dále bych ráda poděkovala za zařazení do projektu SVV 260 547.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Posluchač: Jiřina Blažková

Název práce: Studium vlastností biodegradovatelných nanočástic na bázi polyesterů

Nanočástice (NČ) jsou částice s velikostí 1 – 500 nm v průměru. Přednostně se využívají k řízené distribuci léčiv a jako zobrazovací systémy. NČ mohou enkapsulovat jak hydrofilní, tak hydrofobní léčiva, dále také makromolekuly jako jsou peptidy nebo mRNA.

Cílem této práce bylo blíže specifikovat vybrané vlastnosti NČ připravených z polymeru poly(laktid-ko-glykolidu) (PLGA) s použitím polyvinylalkoholu jako surfaktantu. Zvolenou metodou přípravy byla nanoprecipitace. NČ byly připraveny z větveného PLGA kopolymeru a konvenčního lineárního PLGA polymeru/oligomeru. Hlavní náplní práce byla stabilitní studie. Hodnotil se vliv pH suspenze nanočástic a použitého typu polymeru na jejich morfologii v průběhu jednoho měsíce. Sledovaly se také následující parametry nanočástic se dvěma modelovými léčivy (kurkuminem a prokainem): enkapsulační efektivita, drug loading a recovery yield. Byly provedeny disoluční testy a vyhodnocena vhodnost jednotlivých polymerů pro různé typy léčiv.

Velikost nanočástic se pohybovala v rozmezí od 140 nm do 542 nm, index polydisperzity od 0,057 do 0,254. Hodnoty zeta potenciálu byly od nulového až po -16 mV. Nanočástice z obou polymerů vykazovaly největší stabilitu v kyselém pH, naopak nejméně stabilní byly nanočástice z větveného polymeru ve slabě bazickém pH, kde byl pozorován fenomén cyklického bobtnání. EE se pohybovala od 31 % do 100 % v závislosti na použitém léčivu a polymeru. Pro disoluci kurkuminu byl vhodnější větvený kopolymer PLGA, pro disoluci prokainu nebyla pozorována superiorita některého z polymerů.

Klíčová slova: nanočástice, biodegradace, stabilita, PLGA

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Student: Jiřina Blažková

Title of thesis: A study of biodegradable polyesters based nanoparticles properties

Nanoparticles (NPs) are particles with a diameter size ranging between 1 – 500 nm. They are preferably used as drug delivery systems or imaging systems. NPs are able to encapsulate both hydrophilic and hydrophobic drugs and also macromolecules such as peptides or mRNAs.

The aim of this study was to specify selected properties of NPs prepared from poly (lactide-co-glycolide) polymer (PLGA) using polyvinyl alcohol as a surfactant. Nanoprecipitation was chosen as a preparation method. NPs were prepared from a branched PLGA copolymer and from a conventional linear PLGA polymer/oligomer. The main task was a stability study. The effect of the pH and the type of the used polymer of the nanoparticle suspension on the morphology of the nanoparticles was evaluated over one month period. The following parameters of nanoparticles with two model drugs (curcumin and procaine) were also monitored: encapsulation efficiency, drug loading and recovery yield. Dissolution tests were performed and the suitability of individual polymers for different types of drugs was evaluated.

The NP size ranged from 140 nm to 542 nm with a polydispersity index ranging from 0,057 to 0,254. The measured zeta potential was up to -16 mV. The NPs from both polymers in acidic pH showed the best-long term stability; on the other hand, the least stable nanoparticles were from the branched polymer at a weakly basic pH, where the phenomenon of cyclic swelling was observed. The encapsulation efficiency ranged from 31 % to 100 % depending on the drug and polymer used. A branched PLGA copolymer was more suitable for dissolution of curcumin and no superiority of any of the polymers was observed for dissolution of procaine.

Key words: nanoparticles, biodegradability, stability, PLGA

OBSAH

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Obecná charakterizace a klasifikace nanočástic	12
2.1.1 Uhlíkové nanočástice	12
2.1.2 Kovové nanočástice	13
2.1.3 Polymerní nanočástice	13
2.1.4 Lipidické nanočástice	14
2.1.5 Dendrimery	17
2.2 Příprava polymerních nanočástic	18
2.2.1 Emulzní odpařovací metoda	18
2.2.2 Emulzní-difuzní metoda	20
2.2.3 Nanoprecipitace	20
2.2.4 Vysolování	21
2.2.5 Dialýza	22
2.3 Biodegradovatelné polymery pro přípravu nanočástic	23
2.4 Použitá léčiva	24
2.4.1 Prokain	24
2.4.2 Kurkumin	24
2.5 Využití nanočástic ve zdravotnictví	24
2.5.1 Aktivní targeting	25
2.5.2 Pasivní targeting	25
2.6 Charakterizace nanomateriálů	26
2.6.1 Skenovací a transmisní elektronová mikroskopie	26
2.6.2 Hmotnostní spektrometrie	27
2.6.3 Dynamický rozptyl světla	27

2.6.4 Mikroelektroforéza	28
3 PRAKTICKÁ ČÁST	30
3.1 Použité přístroje	30
3.2 Použité chemikálie	30
3.3 Metody	31
3.3.1 Nanoprecipitace	31
3.3.2 Výtěžnost nanoprecipitace	33
3.3.3 Stabilita nanočástic	33
3.3.4 Vlastnosti nanočástic s kurkuminem	33
3.3.5 Vlastnosti nanočástic s prokainem	35
3.3.6 Solubilizace kurkuminu	36
3.3.7 Disoluce	36
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1 Nanoprecipitace	38
4.1.1 Velikost	39
4.1.2 Polydisperzita	41
4.1.3 Zeta potenciál	42
4.2 Výtěžnost nanoprecipitace	44
4.3 Stabilita	45
4.3.1 Stabilita PLGA A2 v čištěné vodě	45
4.3.2 Stabilita PLGA A2 v PBS pufru	48
4.3.3 Stabilita PLGA A2 v acetátovém pufru	52
4.3.4 Stabilita PLGA 5/5 v čištěné vodě	55
4.3.5 Stabilita PLGA 5/5 v PBS pufru	57
4.3.6 Stabilita PLGA 5/5 v acetátovém pufru	60
4.3.7. Stabilita shrnutí	63

4.4 Vlastnosti nanočástic s kurkuminem	64
4.5 Vlastnosti nanočástic s prokainem.....	65
4.6 Solubilizace kurkuminu	66
4.7 Disoluce	67
4.7.1 Disoluce kurkuminu.....	67
4.7.2 Disoluce prokainu	69
5 ZÁVĚR.....	71
SEZNAM GRAFŮ	72
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	74
SEZNAM TABULEK	75
POUŽITÁ LITERATURA	76

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PLGA 5/5	Kopolymer kyseliny D,L-mléčné a glykolové v poměru 50:50
PLGA A2	Kopolymer kyseliny D,L-mléčné a glykolové s přídavkem 2% kyseliny poly(akrylové) jako větvící složkou
ACE	Aceton
ACN	Acetonitril
CHF	Chloroform
CMC	Kritická micelární koncentrace
DCM	Dichlormethan
DL	Drug loading
DLS	Dynamický rozptyl světla
DMA	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
EE	Enkapsulační efektivita
ETAC	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
MPS	Mononukleárně fagocytický systém
MS	Hmotnostní spektrometrie
PACA	Poly(alkylkyanoakrylát)
PBS pufr	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCL	Poly(ϵ -kaprolakton)
PDI	Index polydisperzity
PEG	Poly(ethylen glykol)
PGA	Poly(glykolová) kyselina
PHB	Poly(hydroxybutyrát)
PLA	Poly(mléčná) kyselina
PLF	Poly(laktid-fumarát)
PLGA	Poly(laktid-ko-glykolid)

PMMA	Poly(methylmethakrylát)
PVA	Polyvinylalkohol
RY	Recovery Yield
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SLS	Statický rozptyl světla
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
XRD	Rentgenová difrakce

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Nanotechnologie je stále se rozvíjející obor zabývající se nanomateriály, tj. materiály s definovanou strukturou na úrovni nanometrů, jejich vývojem a využitím. Využívá se v různých oborech od stavebnictví, vojenského průmyslu, přes strojírenství a elektroniku až po chemický průmysl a zdravotnictví. Ve zdravotnictví se uplatňuje nanotechnologie k diagnostice, k místně specifickému dodání léčiv a genů, ve tkáňovém inženýrství a v nanorobotizaci.

Výhody nanočástic ve farmacii spočívají především ve zvýšení účinku, snížení nežádoucích účinků, distribuci špatně rozpustných léčiv, cílené distribuci a řízeném uvolňování léčiv, čímž přispívají k účinnosti a bezpečnosti terapie. S použitím nanočástic lze využít jak nová léčiva a nové způsoby léčby, tak i zlepšit využití již používaných léčiv. Využívají se nejen u léčby různých onemocnění, ale také umožňují přípravu některých typů vakcín.

Léčiva se mohou enkapsulovat do nanočástic, nebo se adsorbovat na povrch. Jejich následné uvolňování může být způsobeno několika mechanismy zahrnujícími difúzi, degradaci, erozi, průnik rozpouštědla do polymerní matrix a její následné bobtnání. Další možností je stimuli-responzivní uvolňování, kde stimulem může být např. teplota, pH, aplikované elektrické nebo magnetické pole a zvuk.

Cílem práce bylo určit vhodné poměry polymeru a surfaktantu pro další přípravu nanočástic. Pracovalo se s polyesterovými polymery lineárním PLGA 5/5, větveným kopolymerem PLGA s kyselinou poly(akrylovou) A2 a se surfaktantem polyvinylalkoholem (PVA). Hlavní náplní práce bylo sledování stability vybraných vzorků nanočástic. Stabilita se sledovala v roztocích čištěné vody, v mírně kyselém pH a ve slabě bazickém pH. Snahou bylo popsat změny, ke kterým bude docházet v průběhu uchovávání během jednoho měsíce. Výsledky přispějí k objasnění mechanismů uvolňování léčiv z nanočástic. Dalším úkolem bylo zjistit, který z polymerů je vhodnější pro enkapsulaci hydrofilního léčiva a který pro lipofilní léčivo. Pomocí disolučních testů se sledovalo uvolňování těchto léčiv z nanočástic připravených z obou polymerů.

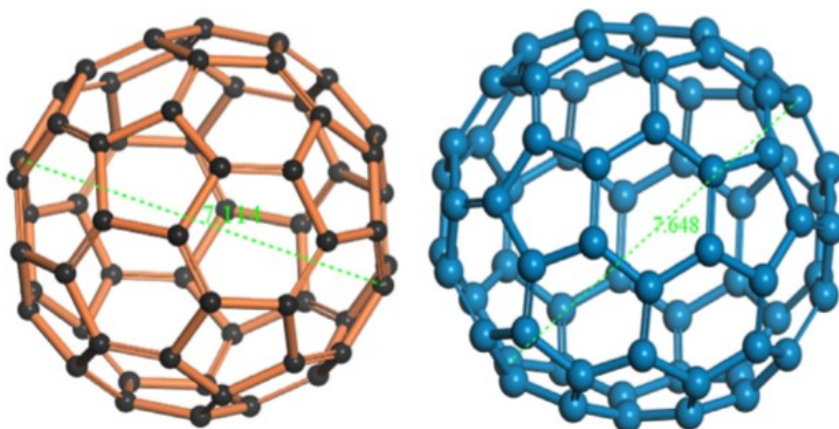
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakterizace a klasifikace nanočástic

Nanočástice se v rámci medicínských oborů definují jako koloidní částice o velikosti 1 – 500 nm. Velikost nanočástice určuje její osud v organismu. Delší cirkulace dosáhnou částice menší než 100 nm proti částicím větším. Jejich biomedicínské využití spočívá v řízené dodávce léčiv na specifická místa organismu. Mohou mít vlastní terapeutický efekt, nebo sloužit k diagnostice. Léčiva mohou být v nanočásticích enkapsulována nebo adsorbována na povrch. Charakteristiku nanočástic představuje také zeta potenciál. Zeta potenciál odpovídá velikosti náboje částice. S rostoucím zeta potenciálem roste povrchový náboj částice. Hraje klíčovou roli ve fyzikální stabilitě nanosuspenzí, stabilní budou takové suspenze, jejichž hodnota zeta potenciálu bude větší než + 30 mV nebo menší než – 30 mV. S rostoucím zeta potenciálem rostou repulzní síly mezi částicemi, což slouží k prevenci agregace částic. Nanočástice lze klasifikovat dle jejich vlastností, velikosti a morfologie. Níže jsou blíže specifikované různé druhy nanočástic klasifikované dle materiálu, ze kterého se vyrábějí.[1–6]

2.1.1 Uhlíkové nanočástice

Mezi hlavní zástupce uhlíkových nanočástic patří fulereny a uhlíkové trubičky. Fulereny jsou tvořeny atomy uhlíku v hybridizaci sp^2 navzájem spojenými do pětiúhelníků nebo šestiúhelníků. Takto spojené uhlíky představují duté útvary připomínající svou strukturou fotbalový míč, viz Obrázek 1.[2, 7]



Obrázek 1: Struktura fulerenu C_{60} a C_{70} (zleva)[7]

Nejstabilnějším a nejznámějším je fuleren C_{60} , nicméně byly objeveny jak fulereny s vyšším počtem uhlíků: C_{70} , 76 , 84 , 90 , 94 , tak s nižším, kam se řadí C_{28} , 34 .

Fulereny vyžadují chemickou modifikaci kvůli jejich špatné rozpustnosti ve vodě. Vyznačují se scavengerovou aktivitou, tzn. zhášením volných radikálů daným jejich redoxními vlastnostmi. Uvádí se i protizánětlivé, protivirové nebo antibakteriální vlastnosti. Potenciálně se by se mohly uplatit jako nosiče léčiv a genů.[2, 7]

K navázání léčiv může docházet dvěma způsoby. Buď se léčivo enkapsuluje do fulerenu za tvorby suspenze, nebo se léčivo na základní strukturu fulerenu kovalentně váže. Tímto způsobem se mohou vázat aminokyseliny nebo steroidy.[7]

Uhlíkové trubičky mají tvar pláště válce s výrazně delší výškou, která může být 0,5 – 30 nm. Kratší trubičky s délkou 0,5 – 2 nm se vyznačují nižší toxicitou než delší trubičky. Tvoří je jedna, dvě nebo více vrstev. Podobně jako fulereny vyžadují pro biomedicínské použití povrchovou modifikaci kvůli své hydrofobicitě. Vyznačují se dlouhou stabilitou a vysokou citlivostí, proto je lze potenciálně využít jako vysoce citlivé bio-senzory nebo jako nosiče léčiv a genů. Kromě toho se slouží i v elektronice, ve výrobě sportovního zboží nebo vodních filtrů.[8]

2.1.2 Kovové nanočástice

Jedná se o kovové částice v rozmezí 10 – 100 nm, které se připravují z alkalických nebo častěji ušlechtilých kovů. Mezi nejvýznamnější kovové nanočástice se řadí zlaté a stříbrné nanočástice, ale existují i další, např. platinové. Lze na ně pomocí thio-metalické nebo jiné chemie navázat protilátky, ligandy i léčiva. K jejich syntéze lze využít živé organismy: houby, bakterie nebo rostliny, což představuje z ekologického hlediska výhodnější přípravu než klasická syntéza. Klasická syntéza zlatých nanočástic spočívá v redukci zlatých solí redukčním činidlem, např. citrátem sodným nebo kyselinou askorbovou. Uplatňují se v medicíně, ve které se využívá jejich antimikrobních vlastností a působení proti rakovinným buňkám a ke konstrukci vakcín. Dále se využívají při katalýze nebo ve fotografování, kde se uplatňuje bromid stříbrný a jodid stříbrný také ve formě nanočástic.[2, 9–11]

2.1.3 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou definovány jako pevné, koloidní částice, jejichž velikost je v rozmezí od 10 nm do 500 nm. Mohou se vytvářet z polymerů přírodních nebo syntetických. Jako výhodnější se jeví syntetické, protože přírodní se často liší v čistotě. Nejčastěji se používají polymery poly(mléčná) kyselina (PLA), poly(glykolová)

kyselina (PGA), poly(laktid-ko-glykolid) PLGA nebo poly(ϵ -kaprolakton) (PCL). Jejich výhoda tkví v biokompatibilitě a přirozené vstřebatelnosti. Použitý polymer ovlivňuje vlastnosti, strukturu a místo aplikace částice. Např. nanočástice z poly(butyl kyanoakrylátu) se zdají vhodné pro distribuci do mozku, poly(alkylkyanoakrylát) (PACA), konkrétně např. poly(ethylkyanoakrylát), disponují vhodnými mukoadhezivními vlastnostmi.[5, 6]

K přípravě lze použít různé techniky, mezi něž patří metody odpařování rozpouštědla, vysolování nebo dialýza – viz samostatná kapitola. Morfologicky se jedná převážně o nanokapsle a nanosféry. Nanosféry mají maticovou stavbu, celé je tvoří polymer. Léčiva se adsorbují na povrch částice nebo se enkapsulují dovnitř ve formě tuhé disperze. Naopak nanokapsle obsahují uvnitř lipofilní nebo hydrofilní tekutinu, ve které se léčivo rozpouští. Využívají se v různých oblastech, např. v elektronice, fotonice nebo v environmentální technologii. V medicíně slouží k distribuci léčiv, jejich výhody spočívají ve schopnosti distribuovat léčiva na různá místa v organismu a v možnosti řízení rychlosti uvolňování léčiv.[5, 6]

2.1.4 Lipidické nanočástice

2.1.4.1 Vezikulární lipidické částice

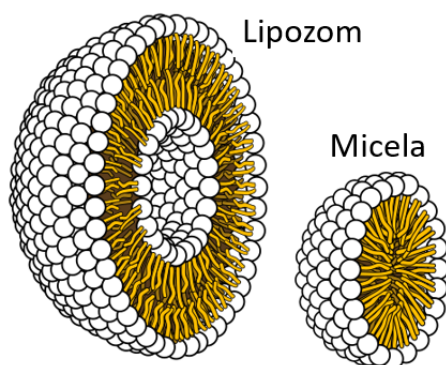
Lipozomy disponují vezikulární strukturou tvořenou lipidovou dvojvrstvou. Podle počtu dvojvrstev se dělí na unilamelární tvořené jednou dvojvrstvou s velikostí od 100 nm do 800 nm a multilamelární o velikosti od 500 nm do 5 μ m, které se skládají z několika soustředných dvojvrstev. Modifikací lipozomů lze získat další typy, mezi které se řadí dlouhodobě cirkulující lipozomy a imunolipozomy. Dlouhodobě cirkulující lipozomy obsahují na svém povrchu úseky hydrofilních polymerů (např. poly(ethylenglykol) (PEG)), což způsobuje, že zůstávají v krevním oběhu po delší dobu z důvodu menší míry vychytávání buňkami mononukleárně fagocytického systému (MPS). Imunolipozomy mají na svém povrchu navázané různé protilátky, díky kterým se váží v různých částech těla podle použité protilátky. Pro přípravu neutrálních lipozomů se jako lipid používá fosfatidylcholin, záporně nabitě se syntetizují z kyseliny fosfatidové, fosfatidylglycerolu a fosfatidylserinu. Kladně nabitě lipozomy se mohou připravovat ze stearylaminu, nebo kationických lipidů např. směsi 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-

propan (DOTAP) a cholesterolu nebo směsi dimethyldioktadecyl ammonium bromid a cholesterolu.[12–14]

Příprava spočívá v odpaření organického rozpouštědla z roztoku lipidů, z něhož vzniká tenký film lipidů. Za stálého míchání se film hydratuje vodným roztokem pufru obsahujícím léčivo, které se má enkapsulovat. Vznikají multilamelární vezikuly, nebo po následné mechanické dispergaci, popř. extruzi, unilamelární lipozomy. Tímto způsobem se vyrábějí lipozomy obsahující ve vodě rozpustné léčivo.[13]

Mezi jejich výhody patří biokompatibilita, možnost inkorporace hydrofilního léčiva dovnitř lipozomu a lipofilního do lipidové dvojvrstvy a snadná obměna následujících vlastností: velikosti, náboje a povrchových vlastností. Poslední jmenované se upravují při syntéze změnou podmínek nebo přidáním dalších látek. Naopak nevýhody lipozomů představují nízká enkapsulační efektivita (EE), rychlé uvolnění hydrofilního léčiva v krevním oběhu a nízká stabilita při uchovávání. Konvenční lipozomy se rychle eliminují z krevního oběhu díky vychytávání MPS. Klinicky se lipozomy využívají u cytostatik nebo antimykotik. Kationické lipozomy z DOTAP se studují pro přenos genové informace.[6, 12, 14]

Micely jsou druh koloidních nanočástic s velikostí od 10 do 100 nm. Tvoří je molekuly tenzidů, což jsou amfifilní molekuly s tendencí hromadit se na rozhraní fází. Hydrofilní část surfaktantu se na rozhraní fází orientuje do vodné fáze a hydrofobní mají tendenci shlukovat se dohromady. Obrázek 2 zobrazuje strukturu lipozomu a micely.[3]



Obrázek 2: Struktura lipozomu a micely[15]

Micely vznikají, pokud koncentrace tenzidu v roztoku překročí kritickou micelární koncentraci (CMC). Výhodnější vlastnosti vykazují micely připravené z

amfifilních kopolymerů proti konvenčním surfaktantům. Vyznačují se nižší CMC a díky fyzikální interakcím mezi řetězci v jádře zůstávají více stabilní po naředění.[3]

Způsob přípravy micel se vybírá podle rozpustnosti blokového kopolymeru. Pokud se používá ve vodě rozpustný kopolymer, mohou se připravit prostým rozpuštěním surfaktantu při koncentraci nad CMC. Micely z kopolymerů špatně rozpustných ve vodě se mohou připravovat emulzní metodou, kdy se léčivo a kopolymer rozpustí v organickém rozpouštědle a tento roztok se přidá do vodného roztoku, který se míchá. Následně se organické rozpouštědlo odpaří. Pro přípravu lze použít velké množství povrchově aktivních látek, včetně různých polymerů a kopolymerů, např. různé druhy poloxamerů a PEGylovaných polymerů, kam patří např. PEG-750-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000].[3, 16]

V jádře se mohou solubilizovat lipofilní léčiva, na povrch se adsorbují hydrofilní. Hydrofilní povrch, který se někdy nazývá korona, má rozvětvenou strukturu, váže na sebe vodu a v prostoru zaujímá různé konformace. Tímto se snižuje opsonizace micel, čímž dochází ke sníženému vychytávání MPS. Následně se prodlužuje plazmatický poločas. Podobně jako ostatní nanočástice se aplikují k cílené distribuci léčiv, dále v kosmetice.[3, 17]

2.1.4.2 Pevné lipidické částice

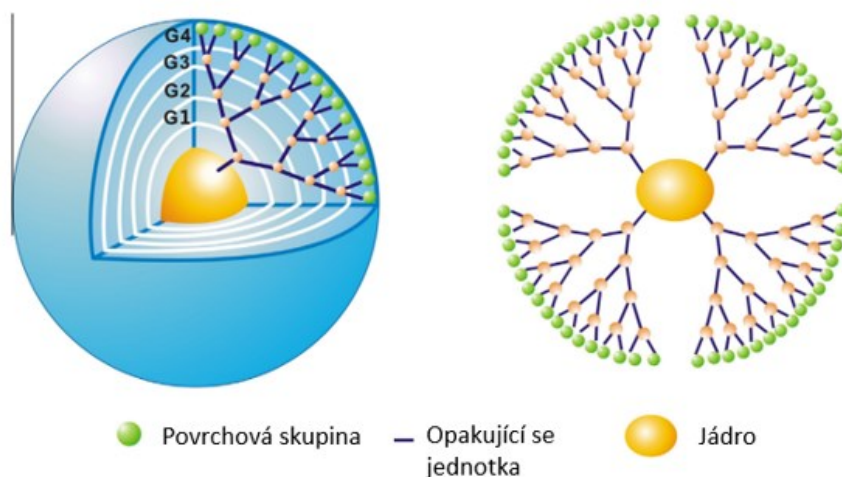
Pevné lipidické nanočástice jsou koloidní částice tvořené lipidy pevnými při tělesné teplotě o velikosti 50 nm – 1 μm. V porovnání s polymerními a anorganickými nanočásticemi se vyznačují řadou výhod, viz níže. Skládají se z lipidové matrice s krystalickou, amorfni nebo smíšenou strukturou, která zůstává pevná i za tělesné teploty, surfaktantu a někdy kosurfaktantu. Pro přípravu se používají nejčastěji mono-, di- a triglyceridy, mastné kyseliny, mastné alkoholy nebo vosky. Jsou biokompatibilní, částečně biodegradovatelné a jejich bod tání se nachází nad tělesnou teplotou lidského organismu. Kromě samostatně používaných pevných lipidů se mohou využívat i jejich směsi s tekutými lipidy nebo oleji. Takto připravené nanočástice se nazývají nanostrukturované lipidové nosiče a považují se za druhou generaci pevných lipidických nanočástic. Mezi používané surfaktanty se řadí fosfolipidy, monoacylglyceroly mastných kyselin s dlouhým řetězcem, poloxamery, polysorbáty nebo některé estery. Tyto částice se vyznačují vysokou stabilitou, nízkou toxicitou a schopností enkapsulovat jak lipofilní,

tak hydrofilní léčiva. Mezi jejich nedostatky patří nízká EE, riziko uvolnění léčiva při uchování (zejména v případě lipidických částic první generace, zamezují tomu přidání tekuté lipidy) a vysoký index polydisperzity (PDI) u některých typů příprav.[18]

Možnosti přípravy zahrnují homogenizaci za horka, homogenizaci za studena, emulzní odpařovací metodu a mikroemulzi. Metoda mikroemulze spočívá ve vytvoření mikroemulze ze směsi mastné kyseliny s nízkou teplotou tání (kyseliny stearové), emulzifikátoru (polysorbátu 20), koemulzifikátoru (butanolu) a vody. Tato směs se zahřeje na 65 – 70°C, následně se přidá do studené vody (2 – 3°C). Protože mikroemulze již obsahuje kapénkovou strukturu, není k tvorbě nanočástic potřeba přidávat další energii. Jejich potenciální využití spočívá hlavně v léčbě rakoviny v individualizované a vysoce efektivní terapii díky možnostem povrchových modifikací nanočástic.[18, 19]

2.1.5 Dendrimery

Dendrimery představují polymerní nanočástice s trojrozměrnou strukturou podobnou stromu. Jejich velikost se pohybuje od 5 do 20 nm, jsou monodisperzní, dobře rozpustné a snadno povrchově modifikovatelné. Skládají se ze tří částí: jádra, na které se váží koncentricky uspořádané opakující se větvené jednotky, zakončení tvoří terminální skupiny. Obrázek 3 znázorňuje strukturu dendrimeru.[1, 20, 21]



Obrázek 3: Struktura dendrimeru [20]

Velikost dendrimeru, molární hmotnost i počet terminálních skupin se řídí nastavením při syntéze. Syntetizuje se krokově, v každém kroku vzniká větvení, které se

nazývá generace dendrimeru. Dendrimery se připravují konvergentním nebo divergentním způsobem. Divergentní metoda postupuje od jádra na periferii. V každém kroku se váže nová rozvětvená jednotka, která se následně musí zbavit chránících skupin, aby se mohl proces zopakovat. Nejprve se váže na jádro, následně na navázané jednotky. V konvergentní se syntetizuje naopak: od periferie k jádru. Nejdříve se vytvoří větvící jednotka sloučením dvou a více skupin, v dalším kroku se sloučí dvě takto vzniklé jednotky. Tento postup se opakuje, až vznikne tzv. dendron, na konci syntézy dochází k jeho připojení na jádro.[20, 21]

Léčivo může být v dendrimeru připojeno kovalentně na terminální skupiny, nebo se může vázat nekovalentně uvnitř dendrimeru vodíkovými můstky nebo van der Waalsovými silami. Dendrimery slouží k řízené distribuci léčiv a genů, v tkáňovém inženýrství nebo jako bio-senzory např. k diagnostice rakoviny.[1, 20]

2.2 Příprava polymerních nanočástic

Polymerní nanočástice se dají připravit z polymerů již připravených nebo z monomerů. Z biodegradovatelných polymerů se používají PLA, PLGA, PCL, PACA, chitosan nebo alginát, z nichž pouze PACA se polymeruje v průběhu přípravy částic. Způsoby přípravy z připravených polymerů zahrnují emulzní metody, precipitaci, vysolování, dialýzu a superkritickou kapalinovou technologii. Postupy zahrnující polymeraci jsou mikro-emulze, mini-emulze, emulze bez surfaktantu a mezifázová polymerace.[4, 5]

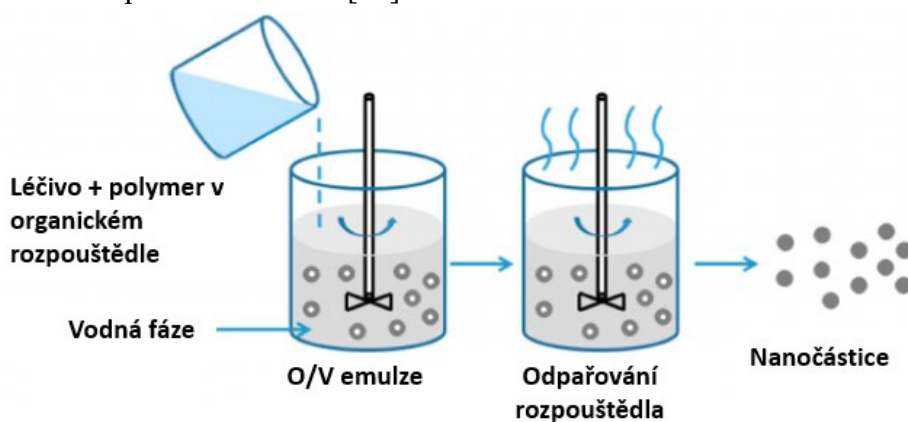
Výběr syntézy ovlivňuje řada faktorů, kam patří typ polymerního systému, místo aplikace, požadavky na enkapsulaci a požadované fyzikálně chemické vlastnosti nanočástic: velikost, tvar, stabilita částic a distribuce velikosti částic. Níže jsou popsány metody přípravy z již připravených polymerů, které lze snadno aplikovat v laboratorních podmínkách a nevyžadují použití specifických nástrojů.[4, 5, 22]

2.2.1 Emulzní odpařovací metoda

Emulzní odpařovací metoda je nejčastěji aplikovaná a první objevená metoda. Zvlášť se připraví organická a vodná fáze. Organickou fází tvoří polymer, např. PLGA nebo PLA, rozpuštěný v rozpouštědle nemísitelném s vodou. Dříve k tomuto účelu sloužily hlavně dichlormethan (DCM) a chloroform (CHF), dnes se dává přednost ethylacetátu (ETAC) kvůli lepšímu toxikologickému profilu. Vodná fáze obsahuje vodu

a stabilizátor, např. polyvinylalkohol (PVA). Vytvoří se emulze přidáním vodné fáze k organické fázi a následným použitím ultrazvuku nebo vysokorychlostního homogenizátoru. Poté se odpařuje rozpouštědlo za stálého míchání za laboratorních podmínek, nebo za sníženého tlaku. Vzniklá suspenze nanočástic se čistí centrifugací a případně lyofilizuje nebo jinak zpracovává. Fyzikálně chemické vlastnosti nanočástic ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří volba rozpouštědla, použitý stabilizátor a jeho koncentrace, koncentrace polymeru, poměr organické a vodné fáze a čas a energie homogenizace. Jedná se o jednoduchou metodu, ale poměrně zdlouhavou. Další nevýhodou představuje možná koalescence během odpařování rozpouštědla.[5, 6, 23]

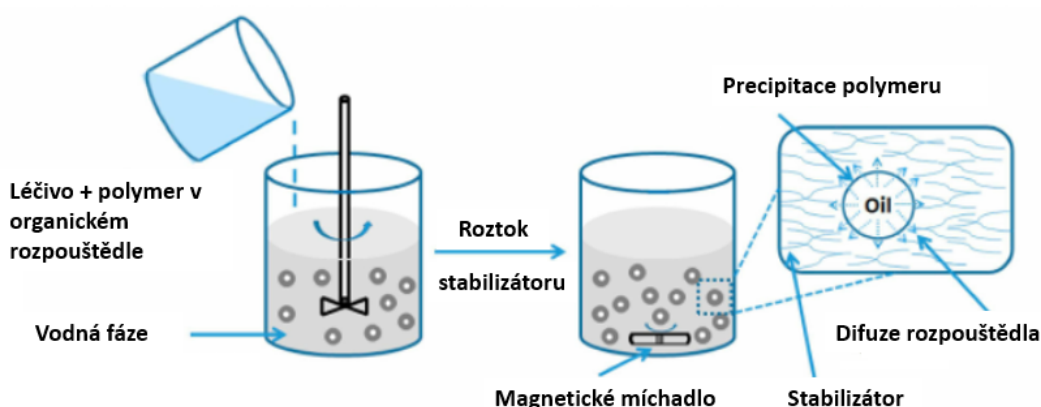
Může se využívat jednoduchých i dvojitých emulzí. U jednoduchých emulzí (O/V) se léčivo rozpouští v organické fázi. Tento způsob přípravy je vhodný pro lipofilní léčiva. U dvojitých emulzí (V/O/V) se používá léčivo rozpustné ve vodě nebo protein. Léčivo se rozpustí spolu se surfaktantem v malém množství vody, tato část se disperguje do organické fáze obsahující polymer. Vzniklá emulze se disperguje do vodné fáze, která může i nemusí obsahovat surfaktant a vzniká násobná emulze. Obrázek 4 zobrazuje emulzní odpařovací metodu.[23]



Obrázek 4: Schéma emulzní odpařovací metody [24]

2.2.2 Emulzní-difuzní metoda

Emulzní-difuzní metoda představuje modifikovanou emulzní odpařovací metodu. Používá se směs organických rozpouštědel, jedno rozpouštědlo je vždy s vodou mísitelné: aceton (ACE) a druhé s vodou nemísitelné: DCM. Organická fáze se pomalu přidává do vodné, roztok se promíchává. S vodou mísitelné rozpouštědlo rychle difunduje z emulzních kapének, s vodou nemísitelné vytváří nanoemulzi, která se v dalším kroku odpaří. Tato metoda byla dále modifikovaná, protože při vzniku nanočástic hrozila agregace částic, navíc se při ní používala toxická rozpouštědla. Modifikovaná se velmi podobá původní, používá se při ní směs rozpouštědel mísitelných s vodou: ethanol (EtOH)/ACE nebo methanol (MeOH)/ACE. První rozpouštědlo se vyznačuje vyšší afinitou k polymeru, druhé ke stabilizátoru. Po přidání organické fáze nejprve difunduje rozpouštědlo s větší afinitou k vodné fázi (alkoholy), dochází k redukci velikosti emulzních kapének. Následně difunduje ACE do vodné fáze a precipitací vznikají nanočástice, rozpouštědla se opět odpařují. Obě metody se používají např. pro polymer PLGA se stabilizátorem PVA. Emulzní-difuzní metoda je znázorněna na Obrázku 5.[25]



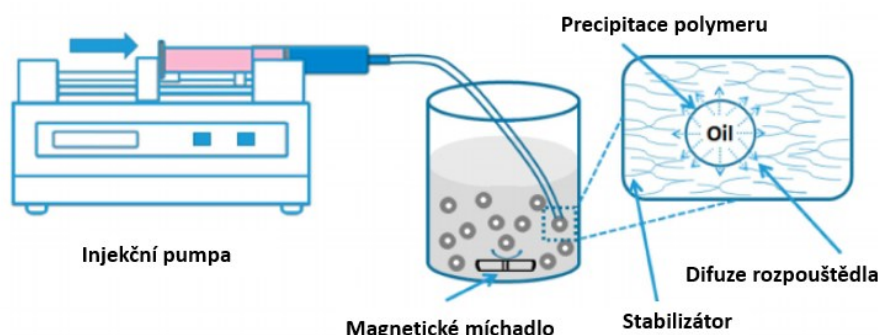
Obrázek 5: Schéma emulzní-difúzní metody [24]

2.2.3 Nanoprecipitace

Nanoprecipitace se provádí pomalým přidáváním organické fáze k fázi vodné za stálého míchání. Organickou fází obvykle tvoří s vodou mísitelné rozpouštědlo: ACE, směs ACE s EtOH nebo MeOH nebo směs ACE s malým přídatkem vody. V této fázi se nachází polymer. Běžně se využívají polymery PCL, PLA, PLGA, PACA a Eudragity, např. Eudragit RL 100 a Eudragit L 100. V organické fázi se většinou rozpouští také léčivo. Ve vodné fázi může být rozpuštěn stabilizátor, např. PVA nebo Polysorbát 80,

nicméně stabilizátor se nemusí přidávat do směsi vůbec. Fyzikálně chemické vlastnosti polymerních nanočástic a úspěšnost metody jsou určeny podmínkami, za kterých se přidává organická fáze: rychlost míchání, rychlost a způsob přidávání organické fáze a poměr organické a vodné fáze. Po přidání organické fáze dochází k difúzi rozpouštědla do vody, supersaturaci a tvorbě nanočástic mechanismem precipitace. Organické rozpouštědlo se následně odpařuje za sníženého tlaku. Nanočástice vytvořené tímto způsobem mají dobře definovanou velikost a úzkou distribuční křivku.[5, 6, 26–28]

Nanoprecipitace je vhodná pro hydrofobní léčiva a pro tvorbu částic menších než 100 nm. Mezi výhody nanoprecipitace se řadí nízká energetická náročnost, vysoká reprodukovatelnost, snadná produkce ve větším množství, jednoduchost a rychlost díky jedнокrokovému postupu. Mezi nedostatky patří nízká EE zejména hydrofilních léčiv a nízká změna velikosti produkovaných částic. Nanoprecipitaci zobrazuje Obrázek 6.[22]

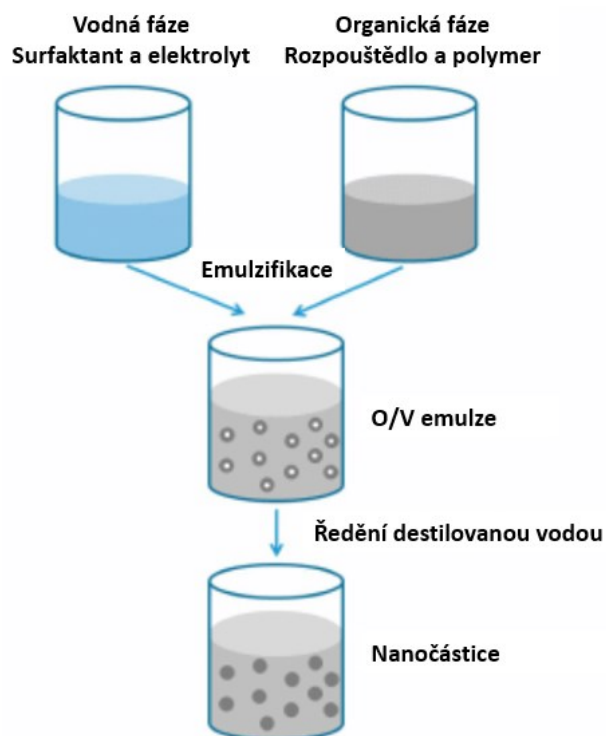


Obrázek 6: Schéma nanoprecipitace [24]

2.2.4 Vysolování

Jedná se o modifikovanou emulzní odpařovací metodu. V tomto případě se používají rozpouštědla mísitelná s vodou: ACE nebo acetonitril (ACN). Narozdíl od ostatních způsobů přípravy, tato metoda využívá soli jako např. chlorid hořečnatý, chlorid vápenatý, chlorid sodný, octan hořečnatý nebo sacharóza o vysokých koncentracích, které slouží jako vysolovací činidla. Léčivo a polymer se rozpustí v organické fázi, surfaktant a sůl ve vodné fázi. Přidáním vodné fáze do organické se připraví emulze, vysoká koncentrace solí způsobuje omezenou mísitelnost s vodou mísitelných rozpouštědel. Emulze se následně ředí destilovanou vodou a dochází k vysrážení polymeru ve formě nanočástic. Difuze organické fáze nastává snížením koncentrace soli, díky ředění vodnou fází. Vzniklá suspenze se čistí filtrací a lyofilizuje. Nevýhoda vysolování spočívá v

inkompatibilitě mnoha léčiv se solemi. Přípravu nanočástic vysolováním znázorňuje Obrázek 7.[5, 6]



Obrázek 7: Schéma vysolování [24]

2.2.5 Dialýza

Dialýza se vyznačuje poskytováním malých nanočástic s nízkým PDI. Polymer se v tomto případě rozpustí v organickém rozpouštědle, tento roztok se umístí do dialyzační trubice. Trubice se umístí do roztoku rozpouštědla, ve kterém polymer není rozpustný. Toto rozpouštědlo musí být mísitelné s rozpouštědlem polymeru. Rozpouštědla se mísí, polymer se sráží díky supersaturaci způsobené klesajícím množstvím organického rozpouštědla. Rozpouštědla vhodná pro dialýzu jsou dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylacetamid (DMA), dimethylformamid (DMF), mezi vhodné polymery patří PLGA, poly(methylmethakrylát) (PMMA), poly(laktid-fumarát) (PLF) a poly(hydroxybutyrát) (PHB) .[5]

2.3 Biodegradovatelné polymery pro přípravu nanočástic

Z polymerních materiálů se nejvíce používají polyestery: poly(α -hydroxy) kyseliny, PCL, PACA a polysacharidy: chitosan a algináty.[4]

Mezi poly(α -hydroxy) kyseliny se řadí PLA, PGA a jejich kopolymer PLGA. Jedná se o lineární alifatické syntetické polymery. Pro přípravu nanočástic se využívají pouze polymery PLA a PLGA. PGA se pro syntézu nanočástic příliš nehodí kvůli rychlé degradaci a špatné rozpustnosti. Jejich syntéza spočívá buď v kondenzační polymeraci nebo se polymerizují metodou otevření kruhu, kdy se při syntéze otevírá cyklický laktid. PLA je hydrofobnější než PLGA díky methylové skupině, poměr PGA a PLA při přípravě PLGA určuje výsledné vlastnosti PLGA. V lidském těle esterová vazba hydrolyzuje a vznikají původní monomery, kyselina mléčná a glykolová, které se zapojují do citrátového cyklu. Oba polyestery jsou schváleny k terapeutické aplikaci léčiv.[4, 29, 30]

Podobnými vlastnostmi jako PLA se vyznačuje i PCL. Jedná se o hydrofobní, alifatický polymer, který se také syntetizuje polymerací za otevření kruhu. Degraduje se hydrolyticky na ϵ -kaprolakton, případně se může dále metabolizovat na 6-hydroxyhexanovou kyselinu, oba produkty jsou poměrně bezpečné. Je schválen k terapeutické aplikaci léčiv.[4]

PACA se syntetizují z alkylyanokrylátových monomerů aniontovou polymerací ve vodném roztoku, při které se používá hydroxidový iont. Degradují se v těle na poly(akrylovou kyselinu) a příslušný alkohol. V nižším množství se mohou odbourávat také za vzniku formaldehydu a alkylykanoakrylátu, čímž mohou působit toxicky. Některé PACA jsou schváleny Food and Drug Administration.[4, 29]

Chitosan je deacetylovaný derivát chitinu, který se řadí mezi přírodní materiály a tvoří schránky korýšů. Skládá se z molekul glukosaminu a N-acetyl-glukosaminu. Je hydrofilní, ve vodě se nerozpouští. Jeho výhodné vlastnosti čítají snadnou modifikaci postranních skupin, může se mísit s jinými polymery pro úpravu biologických vlastností, např. s kyselinou poly(akrylovou), využívá se i k povrchové modifikaci nanočástic. Chitosan se degraduje lysozymem a bakteriálními enzymy v tlustém střevě, rychlost degradace závisí na stupni deacetylace a na molekulové hmotnosti. Používá se při hojení

ran v různých formách krytích, v nanočásticích k distribuci genů nebo k orální a plicní distribuci léčiv díky mukoadhezivním vlastnostem.[4, 29]

Algináty se podobají chitosanu, extrahují se z hnědých řas. Tvoří je kyselina L-glukuronová a kyselina D-manuronová spojené vazbou 1-4. Lidské tělo nemá enzymy štěpící tuto vazbu. Vazbu mohou rozkládat pouze bakterie tlustého střeva v případě perorálního podání. Uvolňování léčiv dále probíhá disociací alginátových částic.[4, 6, 29]

2.4 Použitá léčiva

V experimentální části byla používána dvě modelová léčiva, konkrétně hydrofilní prokain a kurkumin jako lipofilní léčivo. Proto je v následující části uvedena stručná charakteristika těchto léčiv.

2.4.1 Prokain

Prokain je léčivá látka patřící do skupiny esterových lokálních anestetik. Ve formě hydrochloridu se jedná o bílý krystalický prášek rozpustný ve vodě, EtOH a CHF. Vyznačuje se hodnotou logP 2,14, čímž se řadí mezi výrazně hydrofilní látky. Jeho molekulová hmotnost je 236,3 g/mol. Taje při teplotě 61°C. UV spektrum prokainu se vyznačuje absorpčními maximy při 221 a 290 nm ve vodě.[31]

2.4.2 Kurkumin

Kurkumin je polyfenolická přírodní látka, která se vyskytuje v oddenku Kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*). Jedná se o oranžovožlutý krystalický prášek nerozpustný ve studené vodě, rozpouští se v EtOH. Tato špatná rozpustnost ve vodě brání jeho většímu využití ve zdravotnictví, stejně tak nízká dostupnost po perorálním podání. Jeho logP se odhaduje na 3,62 (dle jiného zdroje na 4,12), má tedy vyšší lipofilitu. Molární hmotnost je 368,37 g/mol, teplota tání 183°C. UV spektrum kurkuminu se vyznačuje absorpčním maximem při 426 nm v ethanolu.[32, 33]

2.5 Využití nanočástic ve zdravotnictví

Biodegradovatelné nanočástice mají široký potenciál využití od virových onemocnění jako syndrom získaného selhání imunity (AIDS), virová hepatitida B a C, v imunizaci chřipky, přes tuberkulózu, prionová onemocnění, diabetes mellitus, až po léčbu rakoviny nebo lokální imunosupresi při transplantaci orgánů. Jejich výhody tkví v mnoha ohledech, kam patří řízené uvolňování, cílená distribuce, zvýšení rozpustnosti

špatně rozpustných léčiv, zvýšení stability molekul díky ochraně před enzymy, vyšší biodostupnost po perorálním podání. Nanočástice jsou schopny jak distribuce malých molekul, tak i makromolekul, kam patří peptidy a geny, proti mikročásticím se vyznačují lepším průnikem do buněk. Níže jsou uvedeny způsoby cílené distribuce (targetingu) léčiv.[4, 34]

2.5.1 Aktivní targeting

Aktivního targetingu se dosahuje navázáním specifické molekuly na povrch částice. Tato specifická molekula se váže cílovou strukturou v místě, kam se má účinná látka distribuovat. Vazba může být jak kovalentní, tak nekovalentní: adsorpcí na povrch elektrostatickými silami nebo hydrofobními interakcemi. Jako vazebné molekuly se mohou používat bílkoviny, peptidy, nukleové kyseliny, malé molekuly a další. Používanými molekulami, kterými se cílí, mohou být protilátky, aptamery (jednořetězcové oligonukleotidové řetězce DNA nebo RNA), folát, transferrin (krevní glykoprotein, který na sebe váže železo) nebo peptid RGD (arginin-glycin-kyselina asparagová). Aktivního targetingu se využívá u léčiv s vážnými nežádoucími účinky, např. v léčbě rakoviny, v diagnostice k označování daných struktur kontrastními látkami při vyšetřování magnetickou rezonancí, počítačovou tomografií nebo pozitronovou emisní tomografií.[4, 35]

2.5.2 Pasivní targeting

Pasivní targeting je dán fyzikálně chemickými vlastnostmi nanočástic, kam patří velikost, náboj, použitý materiál a hydrofobicita. Klíčovou roli u pasivního targetingu hraje MPS. MPS se skládá z fagocytujících mononukleárních buněk, které odstraňují z krve cizorodé částice. Pohlcení částic předchází opsonizace, tj. navázání cirkulujících proteinů (opsoninů) na částice, čímž dojde k označení částic pro odstranění. Po i.v. podání se částice větší než 6 – 10 μm vychytávají v plicích, čehož se dá využít v léčbě rakoviny plic ke specifické distribuci doxorubicinu, karboplatiny a kamptotecinu. Částice o velikosti 100 nm – 6 μm jsou vychytávány MPS a hromadí se v játrech a slezině. Rychleji se jsou vychytávány částice hydrofobní a nabitě než částice neutrální a hydrofilní. Cílení na makrofágy se dá využít u zánětlivých onemocnění, např. u revmatoidní artritidy. Naopak částice menší než 20 – 30 nm se rychle eliminují v ledvinách a jsou vylučovány ven z těla. Nanočástice o velikosti 20 – 100 nm nejsou tedy rozpoznávány MPS ani

vylučovány ledvinami. Prodloužení doby cirkulace lze dosáhnout kromě použití malých částic také povrchovou modifikací s cílem zvýšit hydrofilitu. Jako výhodná se jeví modifikace pomocí PEG. PEG se skládá z dlouhých polymerních hydrofilních řetězců, které nenesou náboj, díky čemuž se výsledné nanočástice vyhnou vychytávání MPS.[4]

2.6 Charakterizace nanomateriálů

Charakteristiku nanomateriálů lze provést z několika různých pohledů. Mezi běžně používané parametry sloužící k popisu nanočástic patří velikost, distribuce velikosti, tvar nanočástic, povrchový náboj, povrchová struktura a charakterizace vnitřní struktury. U krystalických nanomateriálů lze hodnotit také krystalickou strukturu. V neposlední řadě lze uvést hodnocení chemického složení, molekulové hmotnosti nebo rozpustnosti nanomateriálů. Metody se mohou rozdělit podle toho, zda se nanočástice měří v suchém stavu nebo v suspenzi. Mezi způsoby charakterizace v suchém stavu se řadí TEM, SEM, mikroskopie atomárních sil, rentgenová difrakce (XRD), hmotnostní spektrometrie (MS) a další. První tři uvedené metody jsou zobrazovací techniky a využívají se k hodnocení povrchu, popř. velikosti. XRD se používá při hodnocení krystalických struktur k určení velikosti krystalů. MS lze použít k popisu elementárního složení a určení molekulové hmotnosti. Měření nanočástic v suspenzi zahrnují dynamický rozptyl světla (DLS), statický rozptyl světla (SLS), mikroelektroforézu a další. DLS se používá při zjišťování velikosti a PDI, SLS pro stanovení molekulové hmotnosti. Pomocí mikroelektroforézy se hodnotí zeta potenciál. Níže se budu více věnovat popisu nejznámějších metod: TEM, SEM a MS. Protože během experimentů se měřilo na přístroji Zetasizer ZS 90, bude déle uveden popis DLS a mikroelektroforézy, které jsou tímto přístrojem používány.[36, 37]

2.6.1 Skenovací a transmisní elektronová mikroskopie

SEM i TEM jsou zobrazovací techniky podobné optické mikroskopii sloužící k zobrazení různých struktur včetně nanomateriálů. Obě pracují s elektrony místo fotonů, skleněná čočka je zde nahrazena elektromagnetickou čočkou a zobrazovaný obraz se ukazuje na počítači. TEM pracuje na podobném principu jako optický mikroskop. Elektrony procházejí několika elektromagnetickými čočkami, mezi kterými se nachází vzorek, poté se vytváří obraz. Měření probíhá ve vakuu. Rozlišení u TEM se pohybuje od

mikrometrů, po atomové rozlišení, zároveň umožňuje zobrazení vnitřních struktur.[38–40]

V případě SEM jsou obrazy vzorků získány skenováním elektronových paprsků, tyto mikroskopy mohou poskytovat rozlišení menší než 1 nm, nicméně zobrazují pouze povrchové struktury. Při měření se vzorek opět nachází ve vakuu. Narozdíl od TEM vyžaduje tato metoda pokovení vzorku. Vysílané urychlené elektronové paprsky dopadají na vzorek a interagují s ním. Takto produkují sekundární elektrony, zpětně rozptýlené elektrony a rentgenové paprsky, které jsou detekovány a převáděny v počítači na obrazce. [38, 41]

2.6.2 Hmotnostní spektrometrie

MS se používá ke stanovení druhu a množství chemických látek ve vzorku. Při měření se vzorek bombarduje elektrony, čímž dochází k jeho ionizaci. Molekuly se mohou štěpit i na fragmenty. Většina vzniklých iontů nese náboj +1. Ionty se rozdělí aplikovaným elektrickým polem podle poměru hmotnost ku náboji a jsou detekovány. Výstup tvoří hmotnostní spektra, která se porovnávají se spektry známých látek nebo se porovnávají charakteristické fragmentační vzorce. Využití této metody je velmi široké, v chemickém průmyslu ke stanovení kvality, v analýze životního prostředí nebo se stanovují rezidua pesticidů v potravinách.[42]

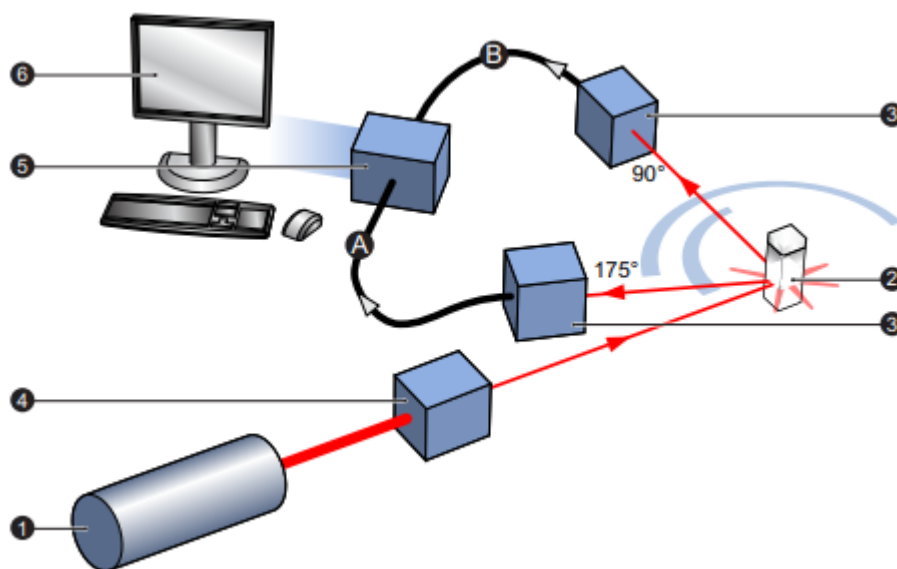
K analýze nanočástic se používá MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight. Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Zásadní odlišnosti od klasické metody jsou následující. K ionizaci vzorku dochází prostřednictvím matrice. Jako matrice slouží 2,5-dihydroxybenzoová kyselina nebo α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina. Její funkcí je zprostředkování přenosu energie mezi laserem a testovaným vzorkem. Matrice omezuje nežádoucí štěpení, ke kterému může docházet při samostatném bombardování. Následně se aplikuje elektrické pole, ionty se urychlí a měří se čas potřebný k tomu, aby ionty dosáhly detektoru.[43, 44]

2.6.3 Dynamický rozptyl světla

DLS měří Braunův pohyb, při kterém se menší částice pohybují rychleji a větší pomaleji. Vztah mezi rychlostí pohybu při Braunově pohybu a velikostí částic udává Einsteinova-Stokesova rovnice. Při měření se analyzuje míra neuspořádaného pohybu

částic v rozptýleném světle. U malých částic se rychle mění obrazce rozptýleného světla, u velkých se mění pomaleji.[45]

Měření probíhá následovně: laser vysílá světelný paprsek, který osvětluje vzorek v kyvetě. Část světelného paprsku se po průchodu vzorkem rozptýlí. Detektor měří intenzitu rozptýleného světla po průchodu vzorkem. Protože intenzita rozptýleného světla musí být v úzkém rozmezí, tlumič redukuje nebo zesiluje množství vysílaného světla. Z detektoru putuje signál do korelátoru, kde se porovnává intenzita rozptylu. Zjišťuje se v něm, jakou rychlostí se intenzita mění. Po průchodu korelátorem putuje informace do počítače. Schéma měření využívající DLS, viz. Obrázek 8.[45]

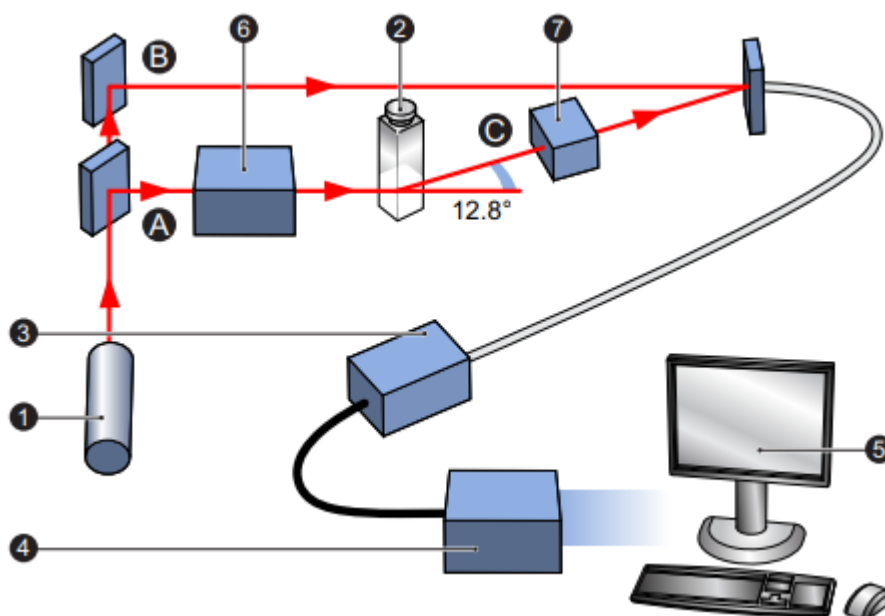


Obrázek 8: Součásti Zetasizeru měřící velikost: 1. laser, 2. kyveta se vzorkem, 3. detektor, 4. tlumič, 5. korelátor, 6. počítač [45]

2.6.4 Mikroelektroforéza

Při měření se laserový paprsek rozdělí na referenční paprsek a paprsek procházející vzorkem. Paprsek prochází centrem vzorku v kyvetě, detekovaná je jeho část rozptýlená pod úhlem $12,8^\circ$. Kyveta má na obou koncích elektrody. Při aplikaci elektrického pole na elektrody se částice začnou v měřeném objemu pohybovat, což se projeví jako kolísání intenzity detekovaného světla. Frekvence tohoto kolísání je úměrná rychlosti částic, rychlost částic je mimo jiné závislá právě na zeta potenciálu. Z detektoru putuje signál do digitálního signálového procesoru a z něj do počítače. Při měření se také využívá tlumič, který redukuje nebo zesiluje množství vysílaného světla. Poslední

součástí jsou kompenzační optiky sloužící ke korekci tloušťky stěny kyvety a lomu dispergačního činidla. Na obrázku 10 jsou součásti Zetasizeru měřící zeta potenciál.[45]



Obrázek 9: Součásti Zetasizeru měřící zeta potenciál: 1. laser, 2. kyveta, 3. detektor, 4. digitální signálový procesor, 5. počítač, 6. tlumič, 7. kompenzační optiky, A. dopadající paprsek, B. referenční paprsek, C. rozptýlený paprsek [45]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Použité přístroje

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

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

Ultrazvuková sonda Mikrosplitze (Bandelin, Německo)

Váhy Kern 440-53N (Kern, Balingen, Německo), max. 400 g, d= 0,01 g

Pipety Finnpiptette F2, Thermo Fisher Scientific (Thermo Fischer Scientific, USA)

Zetasizer ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK)

Sušárna Memmert, Memmert (Schwabach, Německo)

Multifunkční chlazená centrifuga MPW 260R, MPW Medical Instruments (Varšava, Polsko)

Třepací vodní lázeň GFL 1083, GFL (Burgwedel, Německo)

Spektrofotometr Specord 205, Analytik Jena (Jena, Německo)

3.2 Použité chemikálie

PLGA A2 – kopolymer kyseliny D,L-mléčné a glykolové s přísádkem 2% kyseliny poly(akrylové) jako většící složkou, FaF, KFT [46]

PLGA 5/5 – kopolymer kyseliny D,L-mléčné a glykolové v poměru 50:50, FaF, KFT [46]

PVA (polyvinylalkohol), Merck (Praha, ČR)

ACE (aceton), Penta s r.o. (Chrudim, ČR)

Čištěná voda, KFT FaF UK

PBS pufr - fosfátem pufovaný fyziologický roztok - sáčky, Merck (Praha, ČR)

Kyselina octová, Merck (Praha, ČR)

Octan sodný, Merck (Praha, ČR)

Kurkumin, Merck (Praha, ČR)

Prokain-hydrochlorid, Merck (Praha, ČR) – dále uvedeno pouze jako prokain

Polysorbát 20, Tween® 20, Merck (Praha, ČR)

Poloxamer F-127, Pluronic® F-127, Merck (Praha, ČR)

Cholát sodný, Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Německo)

Poloxamer P 188, Kolliphor® P 188, Merck spol. s r.o. (Praha, ČR)

3.3 Metody

Nanočástice se připravovaly nanoprecipitací, následně se zjišťovaly jejich parametry. Nejprve se optimalizovala příprava částic, částice s vyhovujícími parametry se znovu připravovaly pro stabilitní, enkapsulační a disoluční experimenty.

Veškeré koncentrace roztoků jsou uvedeny jako hmotnostní koncentrace (m/V).

3.3.1 Nanoprecipitace

3.3.1.1 Příprava organické fáze

Roztoky pro přípravu organické fáze byly připraveny jako zásobní 5% (m/V) roztoky polymerů PLGA A2 a PLGA 5/5 v ACE a byly skladovány za snížené teploty. Ze zásobního roztoku polymeru se vždy odebíralo potřebné množství roztoku, v případě potřeby se ředilo ACE na 2 % nebo 1 % (m/V) koncentrace, viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Příprava organické fáze včetně vlastní navážky polymeru

Roztok polymeru	Složení organické fáze	Navážka polymeru v organické fázi
5% roztok	1 ml zásobního roztoku polymeru	50 mg
2% roztok	0,4 ml zásobního roztoku + 0,6 ml ACE	20 mg
1% roztok	0,2 ml zásobního roztoku + 0,8 ml ACE	10 mg

3.3.1.2 Příprava vodné fáze

Vodnou fází tvořil roztok PVA v čištěné vodě. Připravil se 3% (m/V) také do zásoby a byl skladován za snížené teploty. Na nižší koncentraci se opět ředil čištěnou vodou v případě potřeby, viz Tabulka 2, nebo se použil 3%.

Tabulka 2: Příprava vodné fáze včetně vlastní navážky surfaktantu

Roztok PVA	Složení vodné fáze	Navážka PVA ve vodné fázi
3 % roztok	10 ml zásobního roztoku PVA	0,3 g
2 % roztok	6,7 ml zásobního roztoku PVA + 3,3 ml čištěné vody	0,2 g
1 % roztok	3,3 ml zásobního roztoku PVA + 6,7 ml čištěné vody	0,1 g
0,5 % roztok	1,7 ml zásobního roztoku PVA + 8,3 ml čištěné vody	0,05 g

3.3.1.3 Příprava nanočástic

Do 10 ml vodné fáze v kádince umístěné na magnetické míchačce se přidával po kapkách mikropipetou 1 ml organické fáze. Po smísení fází se kádinky s roztoky přemístily na magnetickou míchačku do digestoře, kde se docházelo k odpařování ACE. Po odpaření, které trvalo 120 minut, se nanočástice purifikovaly a byly podrobeny analýze, popř. se s nimi dále pracovalo.

3.3.1.4 Purifikace nanočástic

Po přípravě surové suspenze se vybrané vzorky nanočástic purifikovaly na centrifuze. Suspenze se nejprve rozpipetovala do mikrozkušavek o objemu 2 ml a centrifugovala. Centrifugace probíhala při 7 200 g třikrát při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Po prvním a druhém cyklu se supernatant rozdispergoval v čištěné vodě. Jestliže v mikrozkušavce zůstal nerozpustný sediment, vzorek se přemístil do nové mikrozkušavky.

3.3.1.5 Hodnocení velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu nanočástic

Hodnocení probíhalo na přístroji Zetasizer ZS 90, vzniklé nanočástice se charakterizovaly z hlediska velikosti, PDI a zeta potenciálu. Na hodnocení se suspenze nanočástic se naředila v lékovce čištěnou vodou v poměru 1:10. Pro změření velikosti a PDI se část suspenze z lékovky přemístila do standardní polystyrenové kyvety. Velikost a PDI byly změřeny najednou, měření probíhalo v triplikátu při teplotě 25°C. Poté se

suspenze injekční stříkačkou přemístila do kyvety opatřené elektrodami pro měření zeta potenciálu. Měření probíhalo v triplikátu při teplotě 25°C.

3.3.2 Výtěžnost nanoprecipitace

Vzorky nanočástic z 2% roztoků polymerů a všech koncentrací PVA se připravily a podrobily zkoušce na výtěžnost. Nanočástice se purifikovaly na centrifuze. Po první a druhé centrifugaci se odebral supernatant a nahradil se čištěnou vodou, ve které byl roztřepán. Po třetím cyklu se odebral supernatant a částice se rozpustily v ACE. Obsah jednotlivých mikrozkušavek byl kvantitativně převeden do předem zvážené lékovky, která se umístila do sušárny vyhřáté na 60°C. ACE se nechal odpařit a po vychladnutí se lékovka zvažila a vypočítala se se výtěžnost.

Recovery yield (RY) – výtěžnost, viz Rovnice 1 – říká, kolik z navážky polymeru se podařilo zformulovat do podoby nanočástic:

Rovnice 1: Vzorec pro výpočet výtěžnosti

$$(1) RY (\%) = \frac{\text{hmotnost vzniklých nanočástic}}{\text{hmotnost navážky polymeru}} * 100 [47]$$

3.3.3 Stabilita nanočástic

Bylo připraveno 6 vzorků nanočástic z 2% roztoků polymerů a 1% roztoku PVA, 3 šarže byly z PLGA A2 a 3 z PLGA 5/5. Šarže č. 1 od každého polymeru se ponechala v čištěné vodě, změřila se v den přípravy. Vzorky byly hodnoceny z hlediska velikosti, PDI a zeta potenciálu, suspenze se ředila 1:20. Kádinka s nanočásticemi se skladovala v kádince z borosilikátového skla za snížené teploty překrytá parafilmem. Vzorky byly odebírány každý den po dobu jednoho měsíce. Zbylé šarže č. 2 a 3 se purifikovaly jedním cyklem na centrifuze a sediment se rozdispergoval v případě šarží č. 2 ve 2,5 nM acetátovém pufru o pH 4 a v případě šarží č. 3 v 1 mM PBS pufru o pH 7,4. Další postup se shodoval se šarží č. 1.

3.3.4 Vlastnosti nanočástic s kurkuminem

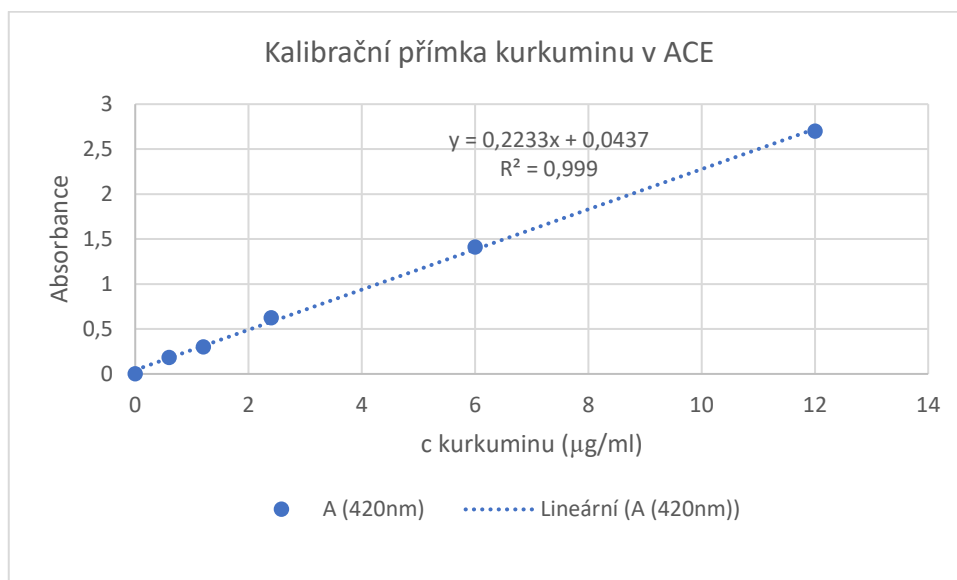
Vzorky nanočástic z 2% roztoků PLGA A2 a 5/5 a 1% roztoku PVA se připravily s přídavkem 25 µg kurkuminu do organické fáze při přípravě nanočástic. Po odpaření ACE se změřila velikost, PDI a zeta potenciál. Suspenze se přečistila dvěma cykly centrifugy při 10 000 g a teplotě 15°C. Po prvním kole se odebral supernatant a sediment se roztřepal v čištěné vodě, po druhém kole se sediment rozpustil v ACE. U tohoto

roztoku se proměřila absorbance při 420 nm proti ACE jako slepému vzorku. Z rovnice 2 kalibrační přímky, která je zobrazena v Grafu 1, byla odečtena koncentrace.

Rovnice 2: Rovnice kalibrační přímky kurkuminu v ACE

$$(2) y = 0,2233x + 0,0437$$

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



Graf 1: Kalibrační přímka kurkuminu v ACE měřena při 420 nm

Roztok se kvantitativně převedl do předem zvážené lékovky a umístil do sušárny vyhřáté na 60°C . Po odpaření ACE byla zvážena hmotnost vzniklých nanočástic a vypočítaly se následující parametry podle:

Enkapsulační efektivita (EE), viz Rovnice č. 3 – říká, jaké množství použitého léčiva se enkapsulovalo do vzniklých nanočástic:

Rovnice 3: Vzorec pro výpočet enkapsulační efektivity

$$(3) EE (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného léčiva}}{\text{navážka léčiva}} * 100 [47]$$

Drug loading (DL), viz Rovnice č. 4 – udává, jaké množství nanočástic je tvořeno účinnou látkou

Rovnice 4: Vzorec pro výpočet drug loadingu

$$(4) DL (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného léčiva}}{\text{hmotnost vzorku}} * 100 [47]$$

Recovery yield (RY) – viz. výtěžnost nanoprecipitace – Rovnice č. 1

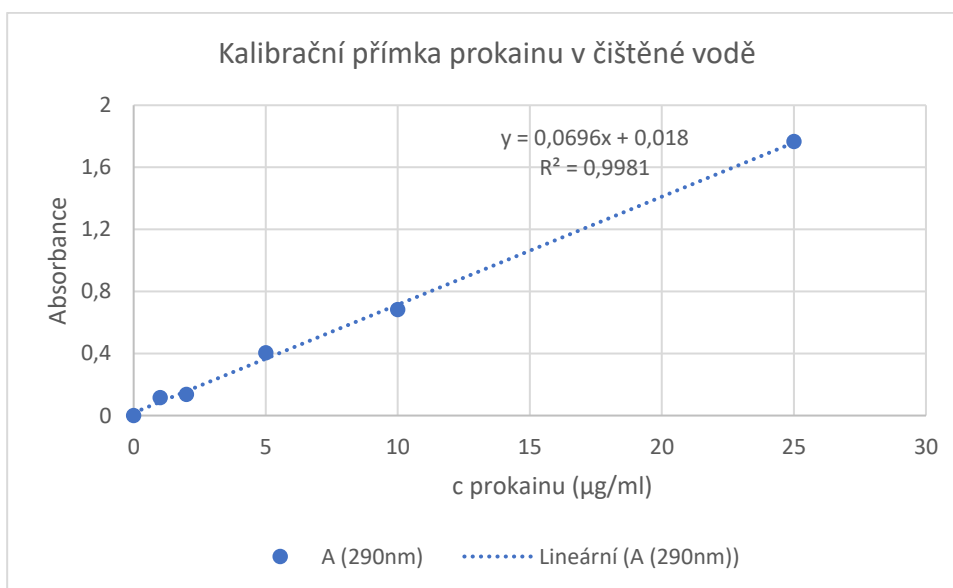
3.3.5 Vlastnosti nanočástic s prokainem

Připravily se vzorky nanočástic z 2% roztoků PLGA A2 a 5/5 a 1% roztoku PVA, do vodné fáze se přidalo 0,250 mg prokainu. Suspenze nanočástic byla purifikována dvěma cykly centrifugace při 10 000 g a teplotě 15°C. Po druhém cyklu se sediment rozpustil v ACE, ve kterém je prokain nerozpustný a vzorek se centrifugoval, tentokrát při 15 000 g, při 5°C po dobu 20 minut. Po odebrání supernatantu byl sediment rozpuštěn v čištěné vodě a byla změřena absorbance při 290 nm proti čištěné vodě jako slepému vzorku. Dle rovnice 5 podle kalibrační přímky, viz Graf 2, byla vypočítána koncentrace léčiva v supernatantu, EE byla spočítána dle Rovnice 3.

Rovnice 5: Rovnice kalibrační přímky prokainu v čištěné vodě

$$(5) y = 0,0696x + 0,018,$$

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



Graf 2: Kalibrační přímka prokainu v čištěné vodě měřena při 290 nm

Výše uvedené roztoky se vytvořily znovu, po odpaření ACE se změřila velikost, PDI a zeta potenciál. Poté se vzorek purifikoval dvěma cykly centrifugy při 10 000 g a 15 °C a po druhém kole se sediment rozpustil v ACE. Roztok se kvantitativně převedl do předem zvážené lékovky a umístil se do sušárny vyhřáté na 60°C. Po odpaření ACE byla zvážena hmotnost nanočástic a spočítal se RY dle rovnice 1 a DL dle rovnice 4.

3.3.6 Solubilizace kurkuminu

Kurkumin je ve vodě prakticky nerozpustný, bylo proto nejprve třeba zvýšit jeho rozpustnost pro další práci s ním a pro stanovení disolučního profilu. Pro experiment bylo použito 0,25 mg kurkuminu. Dále byly připraveny 1% (m/V) roztoky následujících solubilizačních agens: Polysorbát 20, Pluronic F-127 (poloxamer 407), cholát sodný, PVA a Kolliphor P-188 (Poloxamer 188). Navážka kurkuminu se smísila s 25 ml roztoku solubilizátoru, vzniklé soustavy se nechaly míchat 30 minut. Následně se všechny proměřily v triplicátu na spektrofotometru při 425 nm s použitím čištěné vody jako slepého vzorku. Všechny zmíněné solubilizátory mají při dané vlnové délce nulovou absorbanci.

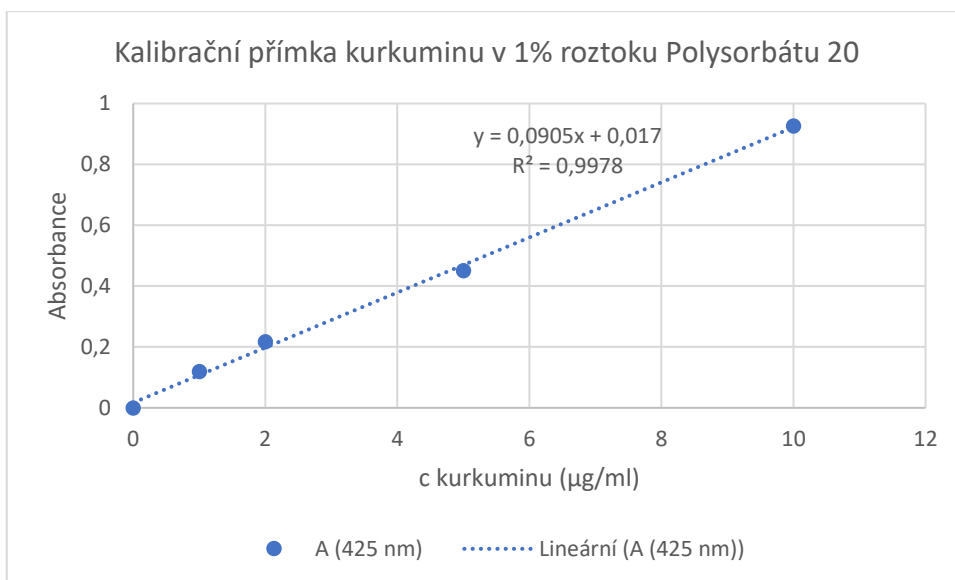
3.3.7 Disoluce

Pro tento experiment se připravily vzorky nanočástic z obou polymerů s oběma léčivy. Pro přípravu nanočástic byly použity roztoky 2% polymerů a 1% roztok PVA. Navážka kurkuminu byla 0,025 mg na jednu šarži a navážka prokainu 0,25 mg. Po odpaření ACE byly nanočástice purifikovány dvěma cykly centrifugace při 10 000 g a teplotě 15°C. Po druhém kole se sediment roztřepal v disolučním médiu a napipetoval do dialyzační membrány o MWCO 6 000 – 8 000 g/mol. Dialyzační membrány se zalepily akrylátovým lepidlem a vložily do lékovek s 10 ml disolučního média. Jako médium se použil 1% roztok Polysorbátu 20, aby se předešlo precipitaci uvolněného léčiva v případě kurkuminu a v případě prokainu čištěná voda. Naplněné lékovky se umístily do vodní lázně o teplotě 37°C. Po časových intervalech 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin, 12 hodin, 24 hodin, 31 hodin a 48 hodin bylo vyměněno disoluční médium. Odebrané vzorky se proměřily v triplicátu na spektrofotometru při 425 nm proti 1% roztoku Polysorbátu 20 v případě kurkuminu a při 290 nm proti čištěné vodě v případě prokainu. Pomocí Rovnic 5 a 6 kalibračních přímek, viz Grafy 2 a 3, bylo stanoveno množství uvolněného kurkuminu a prokainu v odebraném mediu. Nakonec bylo vypočítáno kumulativní množství uvolněného léčiva a ze získaných dat byly sestaveny disoluční přímky.

Rovnice 6: Rovnice kalibrační přímky kurkuminu v 1% roztoku Polysorbátu 20

$$(6) y = 0,0905x + 0,017,$$

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



Graf 3: Kalibrační přímka kurkuminu v 1% roztoku Polysorbátu 20 měřena při 425 nm

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Nanoprecipitace

Nanoprecipitací se připravilo 24 vzorků nanočástic, 12 vzorků z PLGA 5/5 a 12 z PLGA A2. Při tom se použily koncentrace roztoků obou polymerů 5%, 2%, 1% a koncentrace roztoku PVA 3%, 2%, 1% a 0,5%. U každého vzorku se hodnotila velikost, PDI a zeta potenciál. Tabulka 3 uvádí průměrné velikosti nanočástic, průměrný PDI a průměrný zeta potenciál, včetně směrodatných odchylek.

Tabulka 3: Přehled připravených vzorků a průměrných hodnot velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD (n. a. = not available)

Vzorek		Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
5/5 5%	3% PVA	542,1	10,495	0,254	0,018	-0,684	0,017
	2% PVA	512,7	6,829	0,210	0,033	-0,657	0,013
	1% PVA	408,5	3,947	0,252	0,016	n. a.	n. a.
	0,5% PVA	340,7	1,144	0,173	0,011	-1,497	0,252
5/5 2%	3% PVA	459,8	2,418	0,163	0,014	-0,484	0,076
	2% PVA	427,1	3,412	0,161	0,024	-0,642	0,011
	1% PVA	275,6	1,639	0,057	0,014	n. a.	n. a.
	0,5% PVA	303,6	2,634	0,076	0,012	-1,343	0,042
5/5 1%	3% PVA	312,0	2,985	0,139	0,012	-0,887	0,067
	2% PVA	284,7	0,826	0,097	0,009	-1,003	0,159
	1% PVA	224,7	1,780	0,109	0,012	n. a.	n. a.
	0,5% PVA	202,3	0,082	0,071	0,010	-8,657	0,320
A2 5%	3% PVA	325,8	2,125	0,225	0,004	-5,473	0,150
	2% PVA	274,2	1,554	0,169	0,019	-6,383	0,611
	1% PVA	276,3	6,989	0,193	0,012	-8,973	0,392
	0,5% PVA	267,5	0,510	0,150	0,035	-12,067	0,262
A2 2%	3% PVA	296,4	1,226	0,078	0,013	-1,343	0,125
	2% PVA	191,1	1,268	0,057	0,009	-2,897	0,070
	1% PVA	209,8	0,455	0,079	0,016	-6,170	0,276
	0,5% PVA	201,4	0,613	0,059	0,008	-12,567	0,929
A2 1%	3% PVA	196,1	1,003	0,116	0,010	-2,163	0,306
	2% PVA	211,6	0,655	0,082	0,003	-1,707	0,172
	1% PVA	148,7	0,082	0,073	0,016	-15,967	1,759
	0,5% PVA	140,4	0,170	0,057	0,025	-10,857	0,648

4.1.1 Velikost

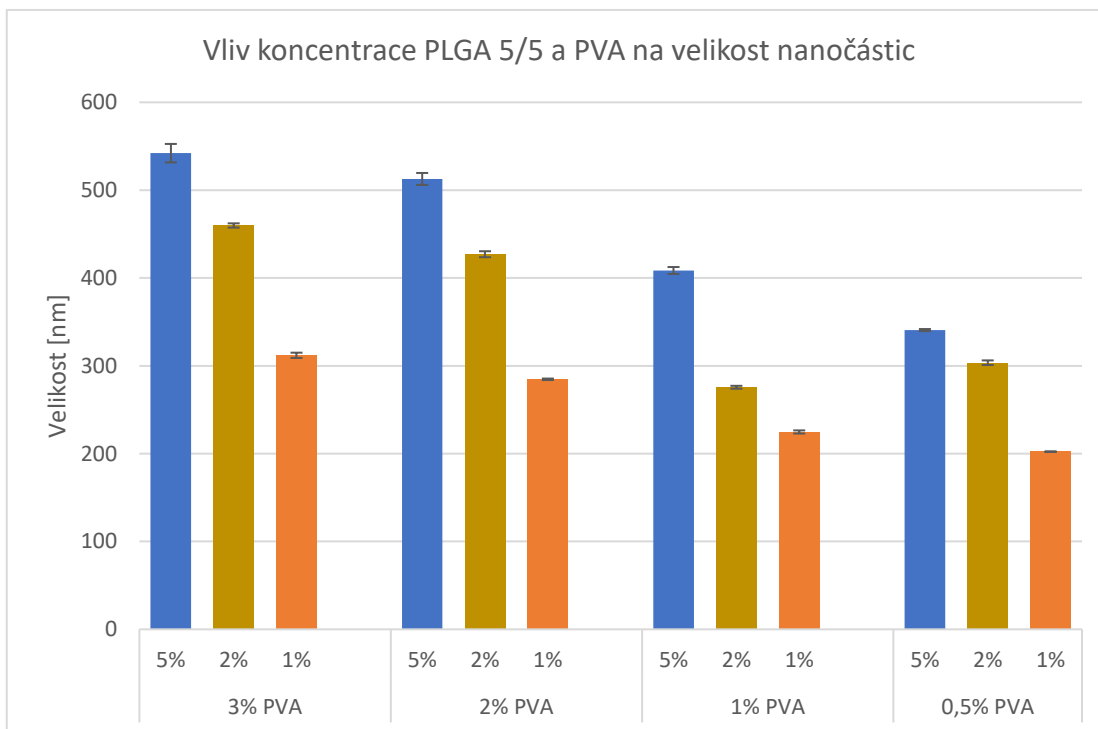
Velikost nanočástic se pohybovala od 140,4 nm u vzorku z 1% PLGA A2 a 0,5% PVA do 542,1 nm u vzorku z 5% PLGA 5/5 a 3% PVA. Tato velikost předurčuje vychytávání nanočástic MPS.

Menší nanočástice vznikají při použití větveného PLGA A2. Pravděpodobně se tak děje díky větší hydrofilitě polymeru PLGA A2, kterou způsobují volné karboxylové skupiny. PLGA A2 tak snáze interaguje s PVA než PLGA 5/5. Vyšší míra interakcí PVA s polymerem nastává ve fázi difuze ACE do vodného prostředí. Tím může být oddálena nukleace při navozené supersaturaci, čímž dochází k většímu rozptýlení jader v roztoku. To vede v konečném důsledku k menšímu počtu kolizí vznikajících částic a jejich menší výsledné velikosti.

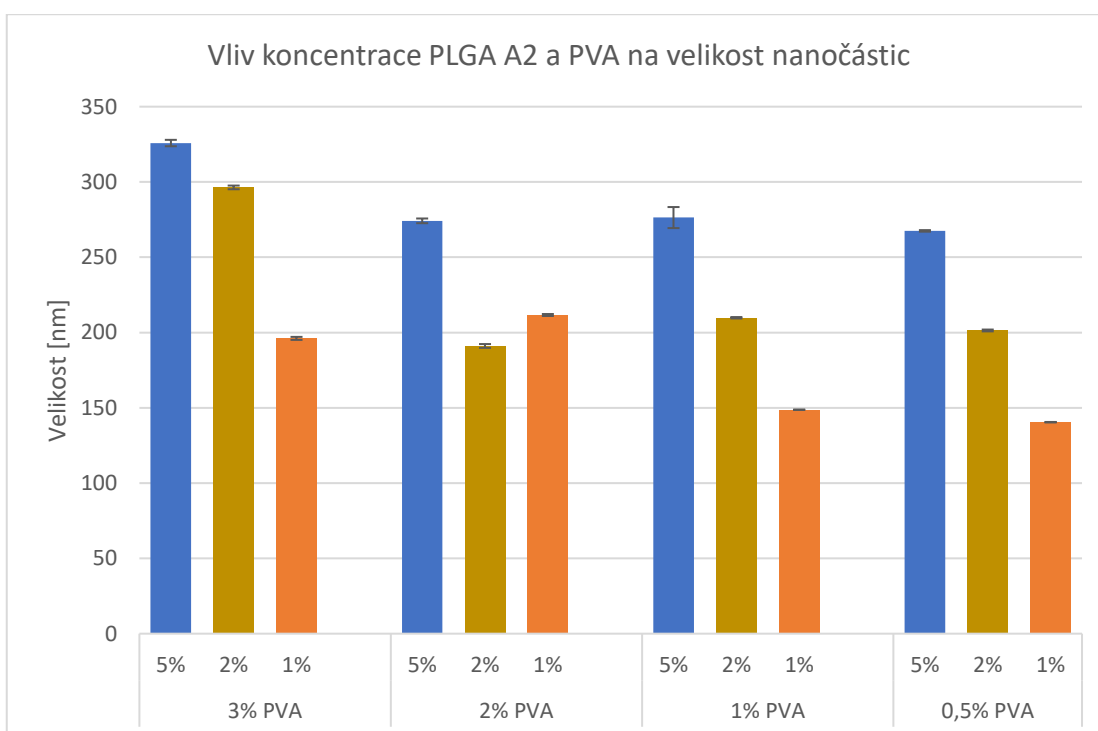
Z naměřených výsledků vyplývá, že v případě obou polymerů s klesající koncentrací polymeru klesá i velikost nanočástic. Tedy s použitím většího množství polymeru při přípravě dosáhneme větších výsledných částic a naopak. Větší částice vznikající při vyšší koncentraci roztoku PLGA jsou velmi pravděpodobně dané vznikem agregátů částic, což koreluje i s výsledky výrazně vyšších hodnot PDI u vzorků s vyšší velikostí (viz. polydisperzita). V praxi to znamená pravděpodobně to, že primární částice vznikají víceméně stejné při různých koncentracích PLGA, nicméně při vyšších koncentracích polymeru dochází k jejich shlukování.

Vliv koncentrace roztoku PVA na velikost nanočástic z PLGA 5/5 je obdobný jako vliv koncentrace roztoku PLGA 5/5 na velikost. S klesajícím množstvím PVA klesá velikost nanočástic. PVA se u PLGA 5/5 adsorbuje na povrch a způsobuje, že výsledné částice jsou větší.

Na rozdíl od PLGA 5/5 použitá koncentrace roztoku PVA nemá zřejmý vliv na velikost nanočástic vytvořených z PLGA A2. Vysvětlením rozdílného vlivu různých koncentrací roztoku PVA na velikost vznikajících částic lze spatřovat ve struktuře PLGA A2, která je rozvětvená s větším počtem karboxylových terminálních skupin, a tím je dána vyšší hydrofilita výsledného materiálu. PVA jako polymerní amfifil s HLB přibližně 18 bude na povrch na karboxyly bohatých částic vázán volněji. Výsledky zobrazují Grafy 4 a 5.



Graf 4: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA 5/5 a koncentrace roztoku PVA na velikost nanočástic

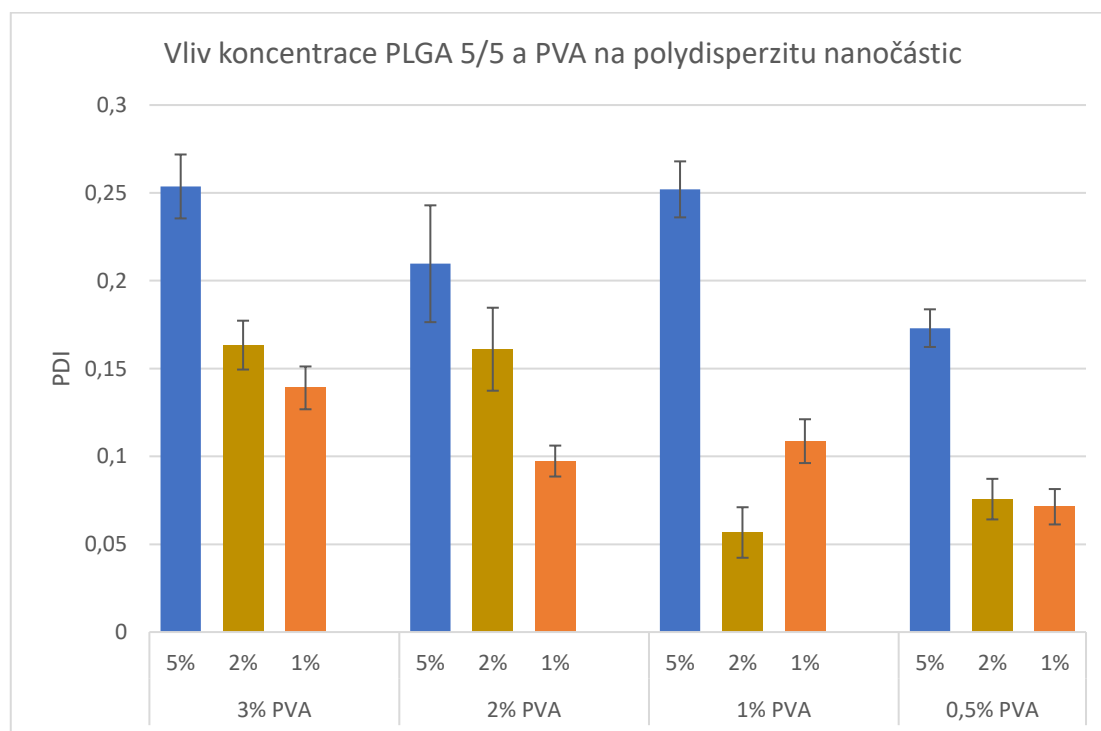


Graf 5: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA A2 a koncentrace roztoku PVA na velikost nanočástic

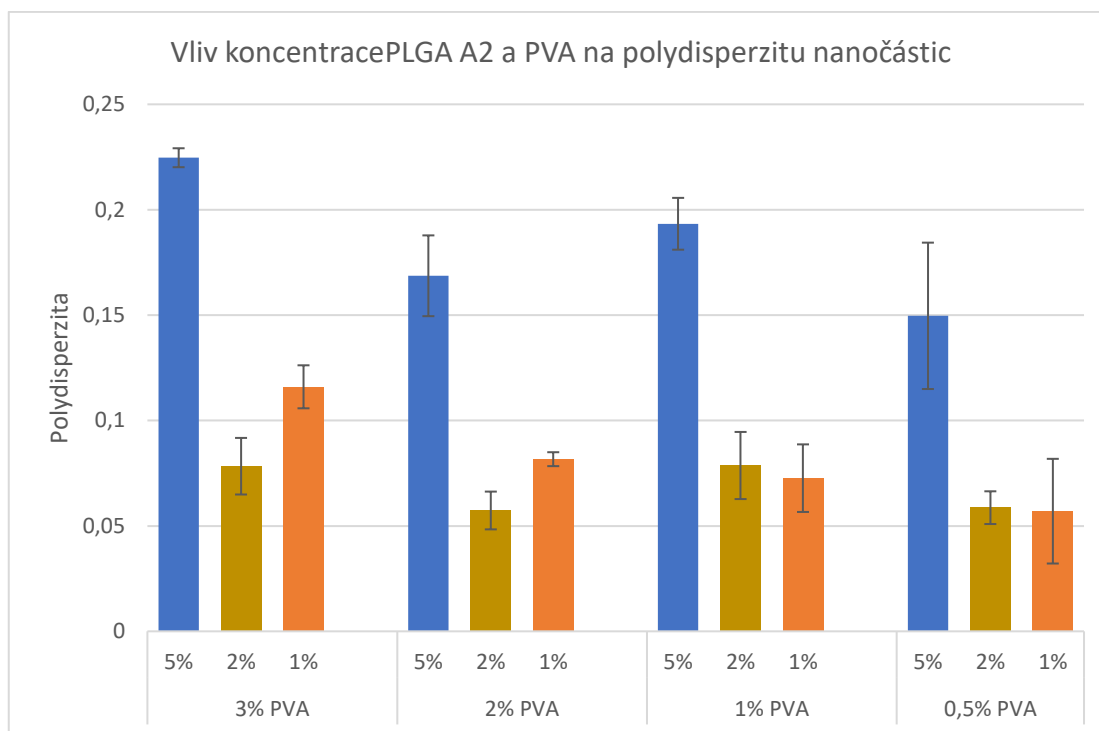
4.1.2 Polydisperzita

Dalším hodnoceným parametrem byl PDI. Nejnižšího PDI dosahovaly vzorky z 2% PLGA 5/5 a 1% PVA, z 2% PLGA A2 a 2% PVA a vzorek z 1% PLGA A2 a 0,5% PVA s průměrnou hodnotou PDI 0,057, naopak nejvyšší hodnota činila 0,254 u vzorku připraveného z 5% PLGA 5/5 a 3% PVA. Do hodnoty 0,2 se vzorky považují za monodisperzní (ISO 22412:2017). Tato hodnota byla překročena u několika vzorků, na jejichž přípravu se použila 5% koncentrace polymerů. Z grafů je patrná závislost pro PLGA 5/5: s klesající koncentrací PLGA 5/5, klesá PDI nanočástic. Při použití vyšších koncentrací polymerů zřejmě dochází k tvorbě nanočástic s větším PDI, což lze vysvětlit agregací nanočástic, viz velikost výše. Pro přípravu monodisperzních vzorků je vhodnější použít nižší koncentrace PLGA než 5 %.

Zároveň polymer PLGA A2 vždy poskytl vzorky s nižšími PDI než PLGA 5/5. Tento jev lze objasnit vyšší hydrofilitou polymeru A2, která je popsána výše, viz velikost. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Grafech 6 a 7.



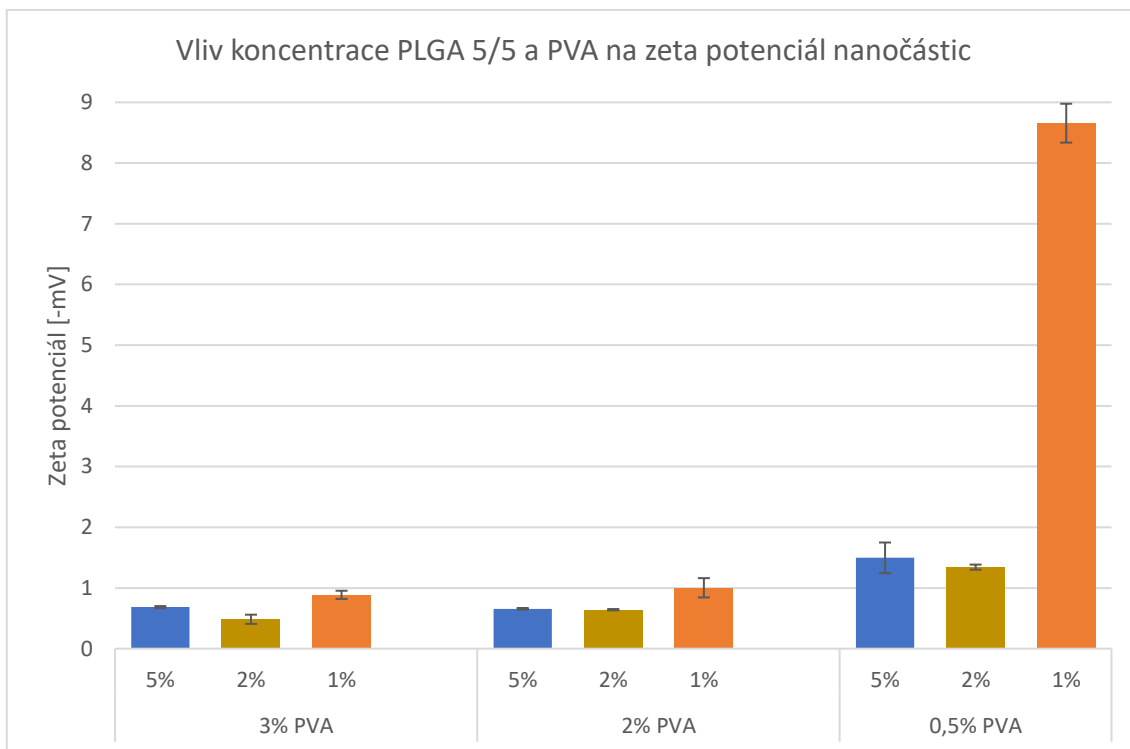
Graf 6: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA 5/5 a koncentrace roztoku PVA na PDI nanočástic



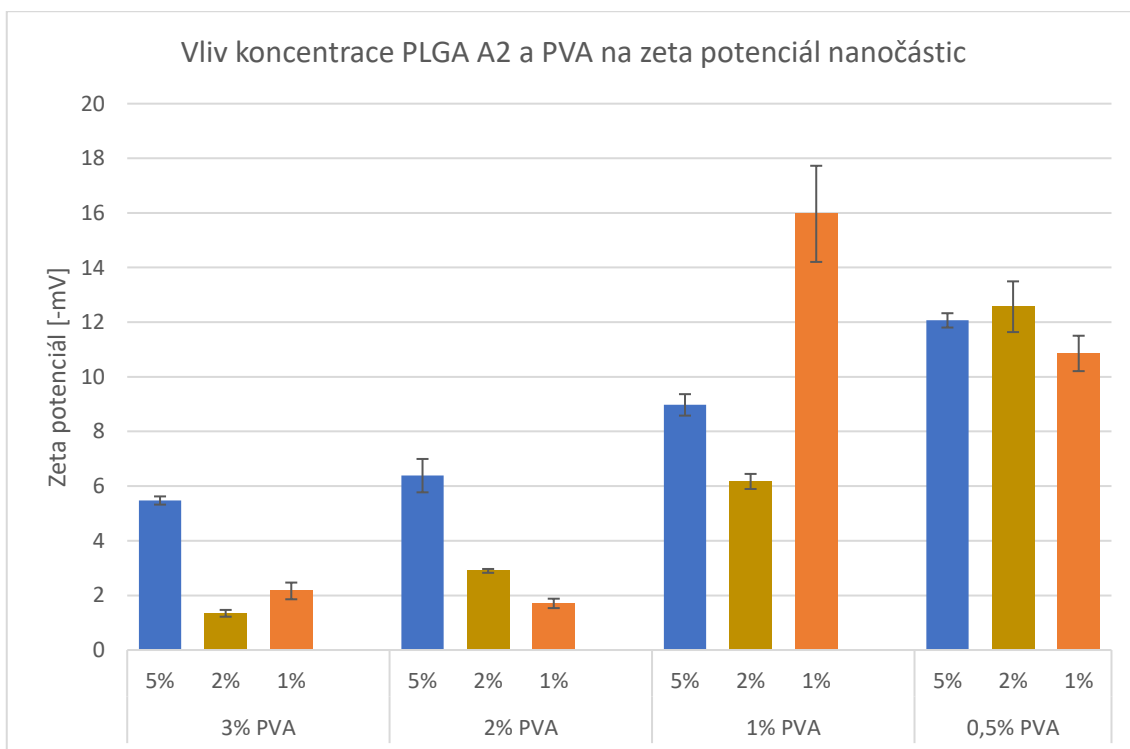
Graf 7: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA A2 a koncentrace roztoku PVA na PDI nanočástic

4.1.3 Zeta potenciál

Měřený zeta potenciál se pohyboval vždy v záporných hodnotách. Jeho hodnoty se pohybovaly od -0,48 po -15,97 mV. V případě PLGA 5/5 se téměř všechny hodnoty pohybovaly blízko nuly, kromě vzorku z 1% PLGA 5/5 a 0,5 % PVA, jehož hodnota je -8,66 mV, viz Graf 8. V případě vzorků z PLGA A2 byl zeta potenciál o něco vyšších absolutních hodnot, viz Graf 9. Vyšší zeta potenciál u PLGA A2 je způsoben volnými karboxylovými skupinami, které mohou být ve vodném prostředí ionizované. U 5% a 2% koncentrace roztoku polymeru docházelo k poklesu zeta potenciálu s klesající koncentrací PVA. Lze říci, že PVA zakrýval záporný náboj adsorpcí na povrch nanočástic úměrně koncentraci. Kumulace PVA na povrchu pravděpodobně nastávala u všech vzorků, čímž se dá vysvětlit jejich nízký zeta potenciál. Obecné pravidlo říká, že pro stabilní nanosuspenzi je třeba absolutních hodnot zeta potenciálu přes ± 30 mV. V této práci se podařilo demonstrovat, že i soustava s měřitelným zeta potenciálem s hodnotami blízkými nule je časově velmi stabilní. Stabilitu suspenze zaručuje u podobného typu soustav solvatační obal na povrchu částice spolu se stérickým působením PVA.



Graf 8: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA 5/5 a koncentrace roztoku PVA na zeta potenciál nanočástic, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu



Graf 9: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA A2 a koncentrace roztoku PVA na zeta potenciál nanočástic, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu

Pro většinu dalších experimentů byly vybrány vzorky z 2% koncentrací roztoků polymerů a 1% koncentrace roztoku PVA. Snahou bylo vybrat takové vzorky, které mají nízký PDI, nízký zeta potenciál a jsou tvořeny stejnými koncentracemi polymeru a PVA.

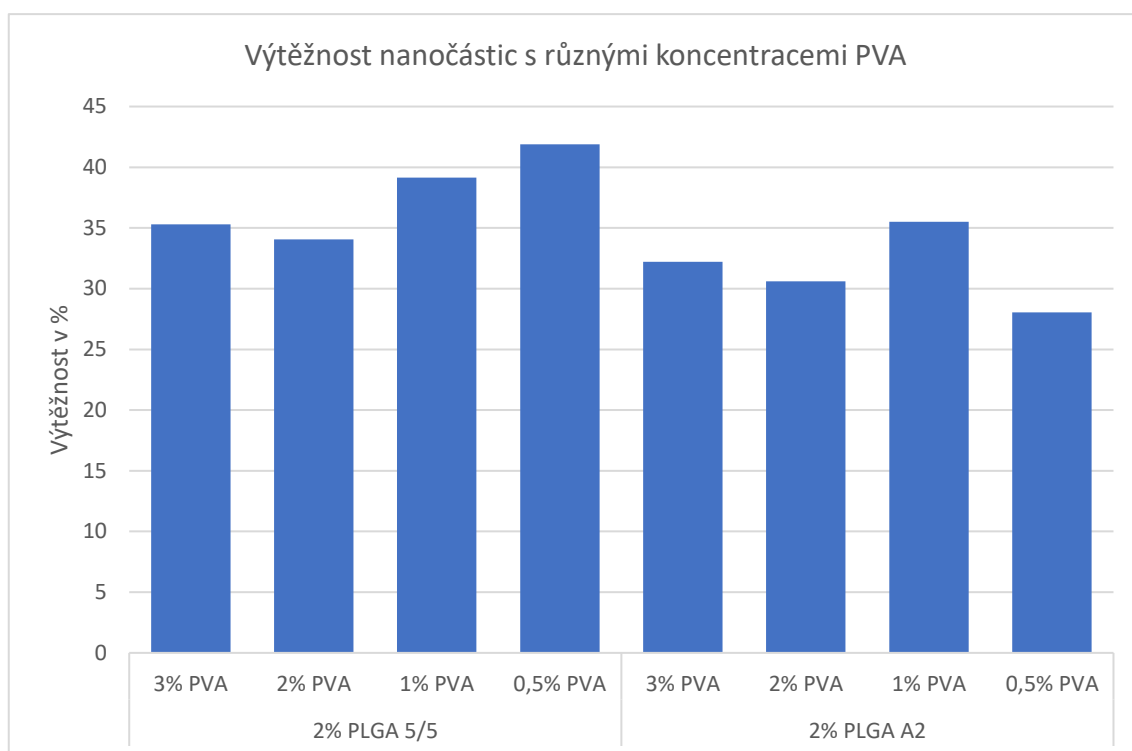
4.2 Výtěžnost nanoprecipitace

U vybraných vzorků, viz Tabulka 4, se provedl experiment na výtěžnost. Ve všech případech se použil 2% roztok polymeru, navážka polymeru tedy činila 20 mg. Výtěžnost se pohybovala od 34,1 % do 41,9 % u PLGA 5/5, v případě PLGA A2 dosahovala od 28,1 % do 35,5 %. Větší výtěžnost vykazoval PLGA 5/5 proti PLGA A2 v příslušných koncentracích roztoku PVA. Je možné, že množství nanočástic se při nanoprecipitaci vytváří přibližně stejné, ale PLGA A2 tvoří nanočástice menší, které jsou obtížněji izolovatelné opakovanou centrifugací, což se projeví na nižší výtěžnosti celého procesu.

PLGA 5/5 vykazuje mírně stoupající trend výtěžnosti nanočástic s klesající koncentrací PVA proti tomu u polymeru PLGA A2 se žádná závislost pozorovat nedá. Stoupající trend v případě polymeru 5/5 lze vysvětlit tím, že menší množství PVA méně ovlivňuje proces saturace a nukleace. S vyššími koncentracemi PVA se bude více projevovat jeho osmotické působení, což bude snižovat efektivitu saturace a nukleace. To se projeví jako nižší výtěžnost. Přehled výtěžností uvádí Graf 10.

Tabulka 4: Přehled výtěžností jednotlivých vzorků s navážkou polymeru 20 mg

Vzorek		Hmotnost vzniklých nanočástic [mg]	Výtěžnost (%)
2% 5/5	3% PVA	7,06	35,3
	2% PVA	6,81	34,1
	1% PVA	7,83	39,2
	0,5% PVA	8,38	41,9
2% A2	3% PVA	6,44	32,2
	2% PVA	6,12	30,6
	1% PVA	7,10	35,5
	0,5% PVA	5,61	28,1



Graf 10: Výtěžnosti jednotlivých vzorků v % připravených z 2% roztoků polymerů s různými koncentracemi PVA

4.3 Stabilita

Ve stabilitní studii se hodnotilo 6 suspenzí nanočástic. Všechny vzorky se připravily z 2% roztoků polymerů PLGA a 1% roztoku PVA. V průběhu jednoho měsíce se u každé suspenze měřila velikost, PDI a zeta potenciál. Níže jsou popsány jednotlivé vzorky.

4.3.1 Stabilita PLGA A2 v čištěné vodě

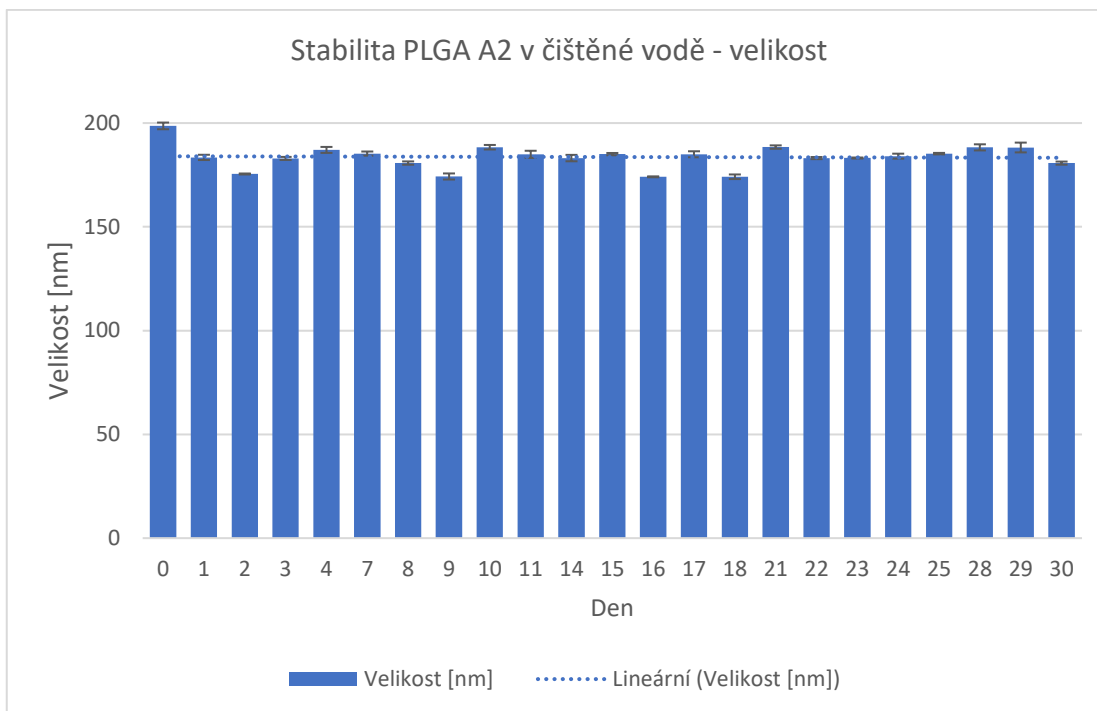
Vzorek nanočástic připravených z PLGA A2 se uchovával v čištěné vodě. Tabulka 5 zobrazuje přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů včetně SD.

Tabulka 5: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii

Stabilita PLGA A2 v čištěné vodě						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
0	198,6	1,613	0,080	0,014	-4,973	0,564
1	183,5	1,266	0,055	0,000	-7,843	0,575
2	175,5	0,236	0,074	0,017	-9,713	0,133

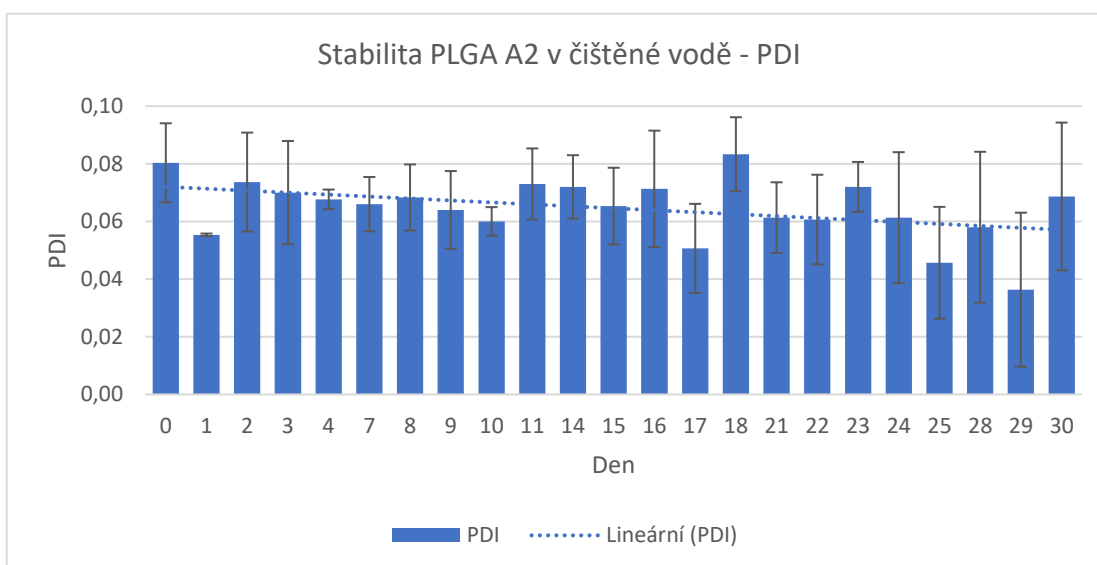
Stabilita PLGA A2 v čištěné vodě						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
3	183,0	0,732	0,070	0,018	-10,113	0,521
4	187,1	1,438	0,068	0,003	-9,920	0,591
7	185,3	0,993	0,066	0,009	-9,667	0,107
8	180,7	0,793	0,068	0,011	-8,517	1,059
9	174,3	1,466	0,064	0,013	-7,067	0,480
10	188,4	1,087	0,060	0,005	-5,920	0,379
11	184,9	1,725	0,073	0,012	-8,110	0,201
14	183,1	1,543	0,072	0,011	-8,643	2,667
15	185,0	0,556	0,065	0,013	-7,047	0,141
16	174,1	0,216	0,071	0,020	-14,400	1,435
17	185,0	1,452	0,051	0,015	-7,960	1,061
18	174,1	1,112	0,083	0,013	-6,717	0,070
21	188,4	0,818	0,061	0,012	-8,890	0,824
22	183,1	0,519	0,061	0,016	-7,033	0,095
23	183,2	0,236	0,072	0,009	-7,007	0,094
24	184,1	1,190	0,061	0,023	-7,233	0,634
25	185,3	0,368	0,046	0,019	-7,197	0,107
28	188,3	1,472	0,058	0,026	-12,133	0,450
29	188,2	2,361	0,036	0,027	-11,600	0,141
30	180,7	0,748	0,069	0,026	-8,603	0,152

Nejnižší hodnota velikosti činila 174,1 nm a nejvyšší hodnota dosahovala 198,6 nm. Tudiž rozsah hodnot byl 24,5 nm. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Grafu 11, viz níže. Z grafu je vidět stagnující trend. Velikost se tedy prakticky nezměnila po celé sledované období, z čehož vyplývá, že esterové vazby nehydrolyzují, nebo hydrolyzují velmi pomalu a nedochází k erozi nanočástic ve vodním prostředí. Eroze a bobtnání tedy nebudou nijak významnými mechanismy při disoluci léčiv z těchto nosičů. Pokud by docházelo k uvedeným jevům, velikost by se v průběhu času měnila.



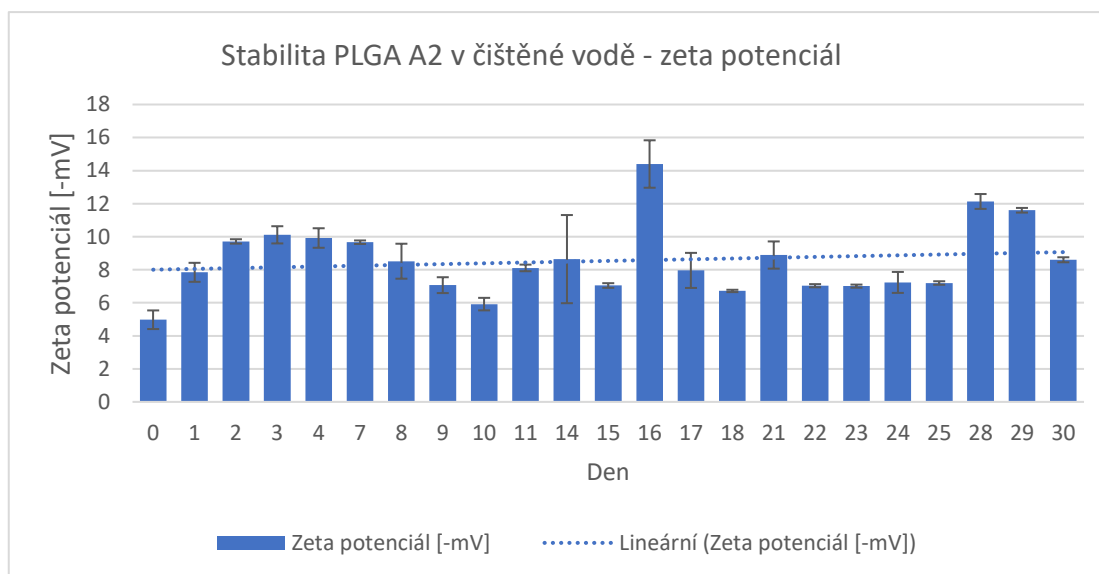
Graf 11: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii

Hodnoty PDI se pohybovaly od 0,036 do 0,083, tudíž rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou činil 0,047. Vzorek zůstal po celou dobu experimentu monodisperzní. Hodnoty zobrazuje Graf 12. V grafu je viditelný mírný klesající trend, který lze vzhledem k výsledkům prakticky neměnné velikosti, viz velikost, považovat za zanedbatelný.



Graf 12: Vývoj PDI nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii

Zeta potenciál se pohyboval v rozmezí od -4,97 do -14,40 mV, tedy rozdíl minima a maxima 9,43 mV. Graf 13 sleduje vývoj zeta potenciálu. Z grafu je patrné, že hodnoty zeta potenciálu se nijak výrazně nemění v průběhu možného hydrolytického působení okolního prostředí.



Graf 13: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu

4.3.2 Stabilita PLGA A2 v PBS pufru

Další hodnocený vzorek byl tvořen nanočásticemi z PLGA A2 v mírně alkalickém pH. Nanočástice se centrifugovaly a byly redispergovány pufrům PBS. Tabulka 6 shrnuje průměrné hodnoty se SD.

Tabulka 6: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii

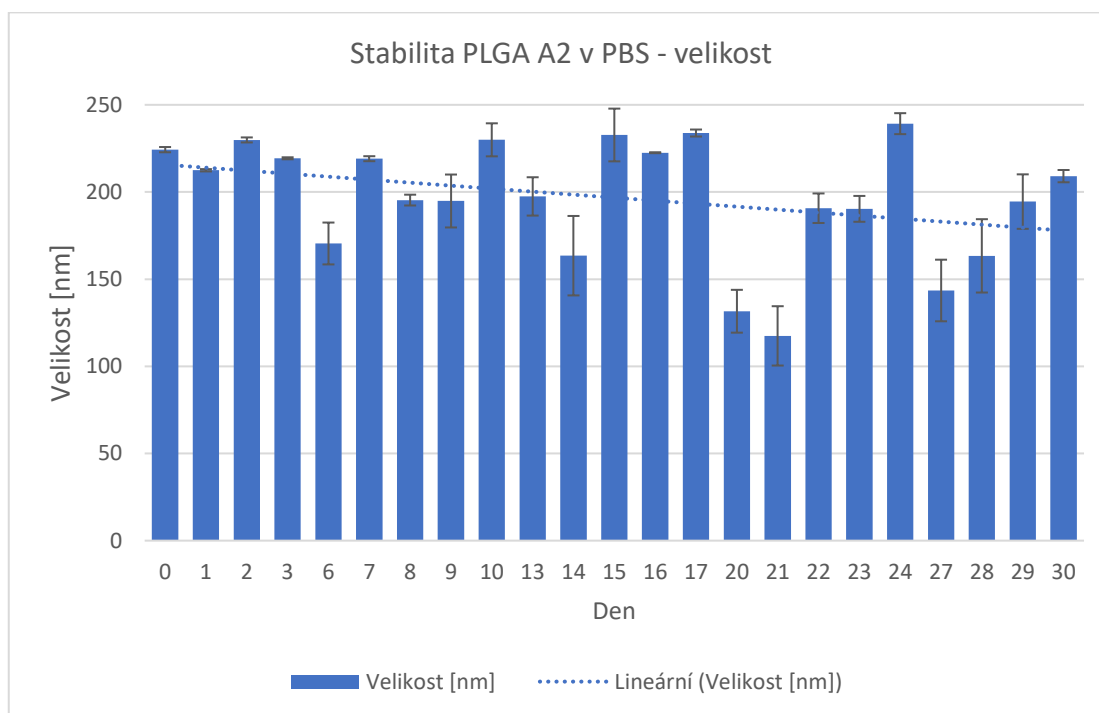
Stabilita PLGA A2 v PBS						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
0	224,3	1,497	0,220	0,022	-9,930	0,719
1	212,5	0,660	0,245	0,004	-9,330	0,042
2	229,9	1,443	0,233	0,005	-8,180	0,367
3	219,3	0,573	0,183	0,005	-7,710	0,249
6	170,5	12,009	0,489	0,048	-8,620	1,281
7	219,1	1,424	0,225	0,014	-9,347	0,335
8	195,4	3,101	0,281	0,010	-10,097	0,494
9	194,8	15,179	0,497	0,039	-9,742	0,269

Stabilita PLGA A2 v PBS						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
10	229,9	9,471	0,284	0,016	-13,786	2,054
13	197,5	10,995	0,301	0,019	-10,170	0,375
14	163,5	22,781	0,462	0,025	-8,080	0,481
15	232,7	15,126	0,230	0,036	-9,247	0,246
16	222,5	0,262	0,221	0,005	-7,743	0,199
17	233,8	2,007	0,257	0,016	-9,633	0,571
20	131,6	12,280	0,396	0,045	-11,067	0,094
21	117,5	17,020	0,429	0,015	-7,083	1,341
22	190,7	8,468	0,278	0,017	-8,673	0,576
23	190,3	7,409	0,330	0,050	-9,870	0,550
24	239,2	6,020	0,179	0,075	-11,267	0,818
27	143,5	17,666	0,387	0,048	-10,720	0,641
28	163,4	21,031	0,436	0,072	-9,080	1,112
29	194,5	15,627	0,400	0,070	-9,893	0,581
30	209,1	3,522	0,241	0,011	-7,610	0,813

Naměřené hodnoty velikosti vzorku se v průběhu experimentu lišily. Velikost nanočástic byla v rozsahu od 117,5 do 239,2 nm, tudíž rozdíl mezi minimální a maximální hodnotou dosáhl 121,7 nm. Jedná se o největší rozsah ze všech vzorků. Mezi jednotlivými hodnotami se objevovaly velké rozdíly. Hodnoty vyobrazuje Graf 14. Trend v tomto grafu je klesající, zároveň se liší hodnoty z jednotlivých měření. Velká proměnlivost jednotlivých měření v rámci tohoto vzorku může být vysvětlena ionizací volných karboxylových skupin na povrchu nanočástic a s tím spojené výraznější repulzní síly. Tyto vedou k vyšší incidenci srážek v rámci vzorku a v konečném důsledku mohou mít za následek vyšší míru fluktuace hodnot v rámci těchto měření.

Jiné vysvětlení zahrnuje fenomén popsany Dittrichem a Šnejdrou. Jedná se o cyklické bobtnání biodegradovatelných polymerů, kdy dochází k cyklickému bobtnání a následnému odbobtnání polymeru. Jednotlivé cykly mohou být dlouhé i několik dní a jsou závislé na pH a iontové síle okolního prostředí. Toto cyklické bobtnání zahrnuje hydrolýzu esterových vazeb a je tedy pravděpodobné, že PLGA A2 podléhá hydrolýze rychleji než jeho alifatický protějšek. Podobně jako původní autoři bylo i v této práci pozorováno, že se jedná o fenomén závislý na pH a iontové síle. Např. v čistěné vodě k tomuto jevu nedocházelo.[48]

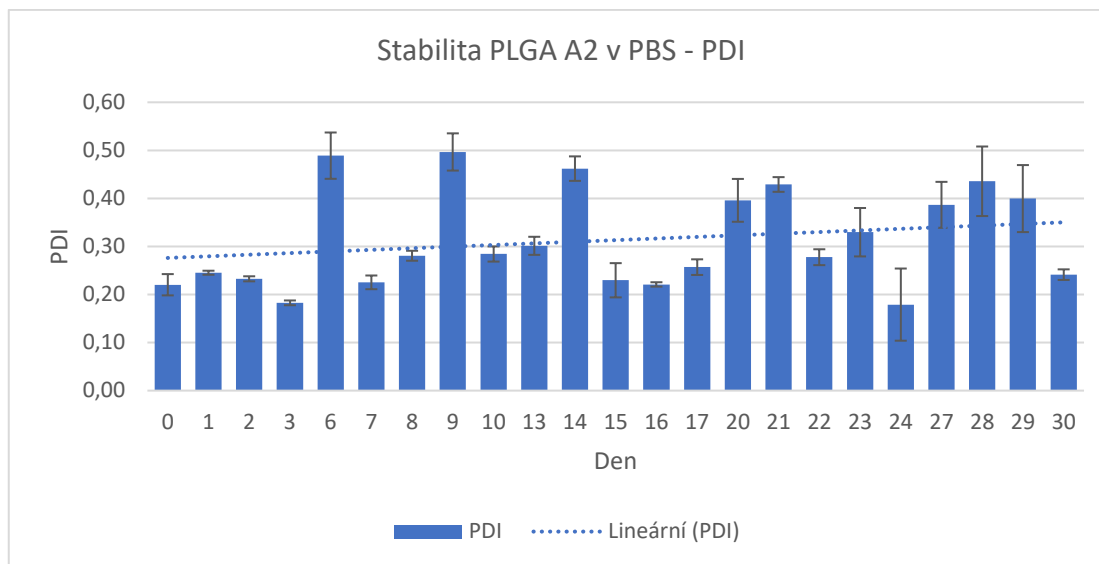
V původní práci bylo pracováno s tělísky PLGA o hmotnosti několik desítek až stovek miligramů a v průběhu sledovaného období byl pozorován znatelný úbytek hmotnosti polymeru. Tento je v této práci pozorován nebyl. Bohužel není možné ověřit, zda docházelo k erozi polymeru a uvolňování osmoticky aktivních metabolitů se současným bobtnáním, ale výsledky s ostatními médii naznačují, že tomu tak nebylo. Nanočástice PLGA v uzavřeném kompartmentu (podobně jako např. v buňce) erodují velmi pomalu. Vysvětlením může být použití částic s velikostí v nanodimenzi, které dodává materiálům jedinečné vlastnosti, jiným vysvětlením je použití PVA jako stabilizátoru, který byl na částici vázán natolik pevně, že kompenzoval úbytek hmoty způsobený erozí materiálu. Tento úbytek byl však ve srovnání s původní prací velmi nízký.[48]



Graf 14: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii

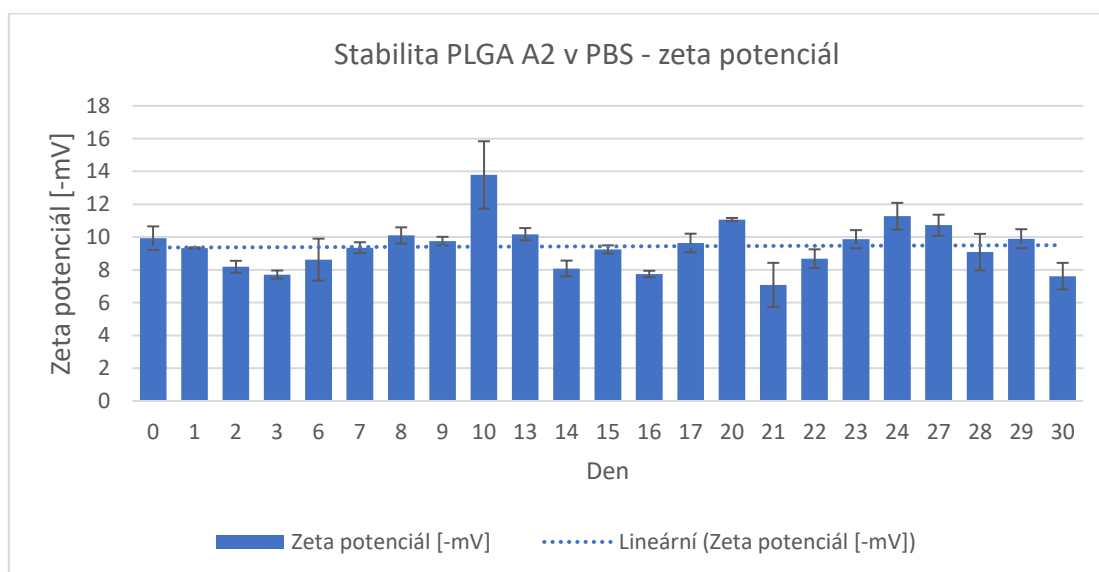
PDI zahrnoval hodnoty od 0,179 do 0,497. Rozdíl mezi minimem a maximem činil 0,318. Opět se jedná o největší rozsah z měřených vzorků. I v tomto případě se objevovaly velké rozdíly mezi jednotlivými měřeními. PDI je ve většině případů nad hodnotu 0,2, vzorek byl polydisperzní. Hodnoty znázorňuje Graf 15. Z grafu je patrný rostoucí trend, tedy zvyšující se PDI vzorku. Zdůvodněním tohoto jevu může být cyklické bobtnání a hydrolýza esterových vazeb PLGA uvedená výše. Zajímavé je také sledování korelace mezi hodnotami velikosti a PDI odpovídající cyklickému bobtnání. Např. ve dnech 6, 14, 21, 28 lze pozorovat vyšší hodnoty PDI a zároveň nižší hodnoty velikosti,

naopak ve dnech 7, 24, 30 korelují nižší hodnoty PDI s vyššími hodnotami velikosti. Tento fenomén vyžaduje hlubší objasnění s využitím elektronové mikroskopie a dalších pokročilých analytických metod, které je mimo rámec této studentské práce.[48]



Graf 15: Vývoj PDI nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii

Zeta potenciál se u tohoto vzorku příliš nelišil od ostatních vzorků, dosahoval hodnot od -7,08 do -13,79 mV. Rozsah mezi maximem a minimem činil 6,71 mV. Graf 16 zobrazuje vývoj zeta potenciálu. Trend v tomto grafu je stagnující, nicméně hodnoty zde cyklicky narůstají a klesají. Tento jev lze opět vysvětlit teorií cyklického bobtnání popsanou výše, viz velikost.



Graf 16: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu

4.3.3 Stabilita PLGA A2 v acetátovém pufru

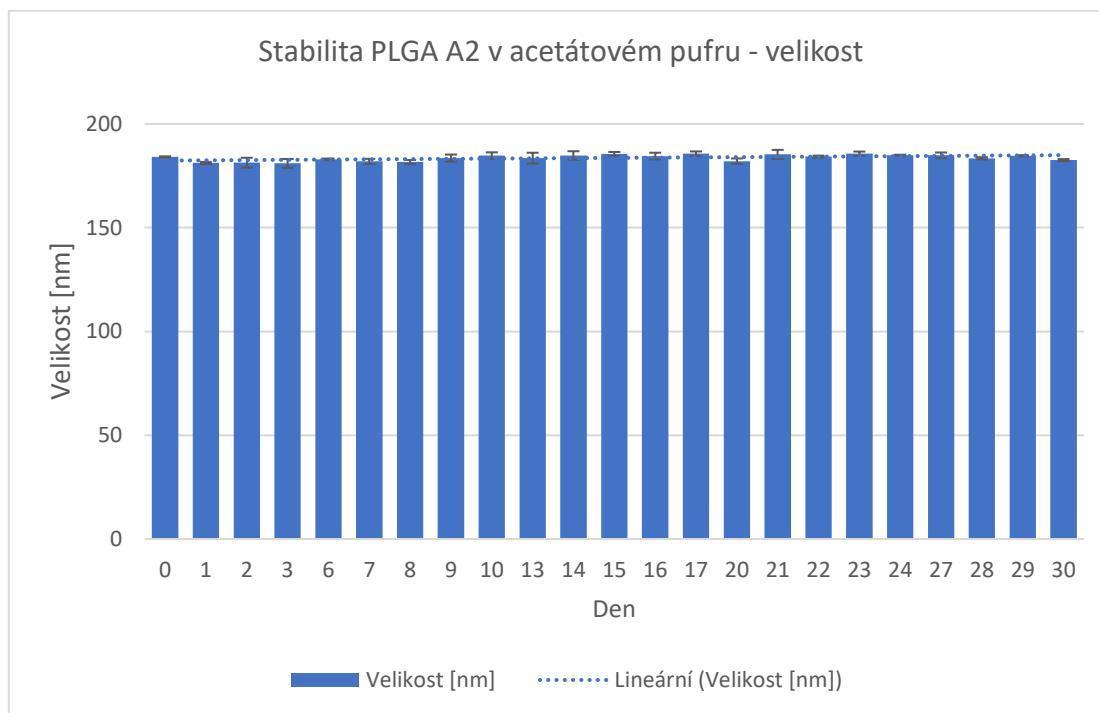
Poslední hodnocený vzorek z PLGA A2, se po odpaření ACE centrifugoval a redispersoval acetátovým pufrům, jenž má pH 4. Tabulka 7 uvádí průměrné hodnoty s jejich SD.

Tabulka 7: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii

Stabilita PLGA A2 v acetátovém pufru						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
0	184,1	0,294	0,048	0,011	-5,303	0,256
1	181,2	0,490	0,051	0,020	-8,950	0,291
2	181,3	2,370	0,046	0,016	-4,390	0,278
3	181,0	2,128	0,029	0,014	-5,370	0,305
6	182,9	0,432	0,035	0,022	-9,807	0,211
7	182,0	1,226	0,058	0,014	-6,033	0,283
8	181,6	0,981	0,050	0,014	-6,307	0,452
9	183,6	1,674	0,022	0,018	-8,957	0,351
10	184,7	1,597	0,028	0,010	-7,560	0,801
13	183,5	2,619	0,061	0,020	-8,973	0,272
14	184,8	2,081	0,025	0,017	-12,367	0,205
15	185,5	1,027	0,027	0,018	-8,880	0,128
16	184,5	1,603	0,033	0,007	-7,997	0,312
17	185,6	1,115	0,020	0,007	-8,823	1,389
20	182,1	1,297	0,037	0,027	-8,140	0,185
21	185,3	2,170	0,022	0,005	-7,750	0,163
22	184,2	0,499	0,044	0,007	-10,933	1,310
23	185,6	1,066	0,039	0,020	-10,690	0,628
24	185,0	0,205	0,032	0,012	-7,937	1,258
27	184,9	1,344	0,043	0,016	-8,650	0,812
28	183,4	0,544	0,033	0,020	-8,713	1,268
29	184,6	0,330	0,047	0,000	-10,767	0,249
30	182,6	0,492	0,068	0,014	-9,143	0,572

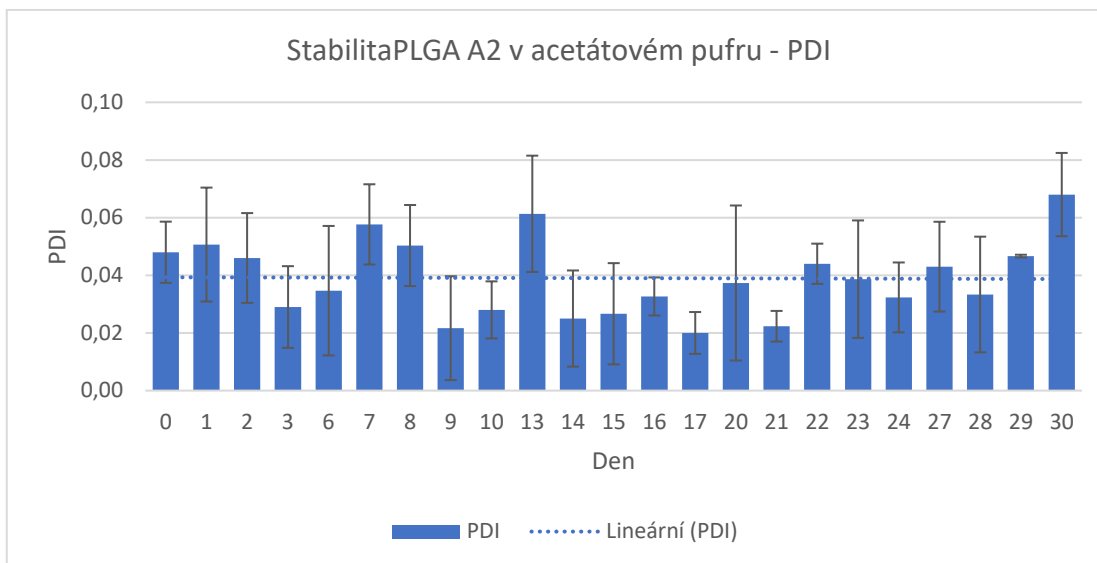
Velikost nanočástic nabývala hodnot od 181,0 do 185,6 nm, rozmezí hodnot tak činilo pouze 4,6 nm. Tento rozsah je nejnižší v rámci hodnocení velikostí všech vzorků. Graf 17 zobrazuje hodnoty velikosti, trend grafu je stagnující. Velikost tohoto vzorku se prakticky nezměnila, vlivem slabě kyselého pH nedochází k výrazné hydrolýze nebo

erozi nanočástic v průběhu uchovávání. S tímto výsledkem koreluje i vývoj PDI, viz polydisperzita. Vysvětlení může spočívat v protonizaci volných karboxylových skupin, a tím vystupňování lipofily částic. Tímto je potvrzeno, že cyklické bobtnání polyesterů je jev závislý na pH.[48]



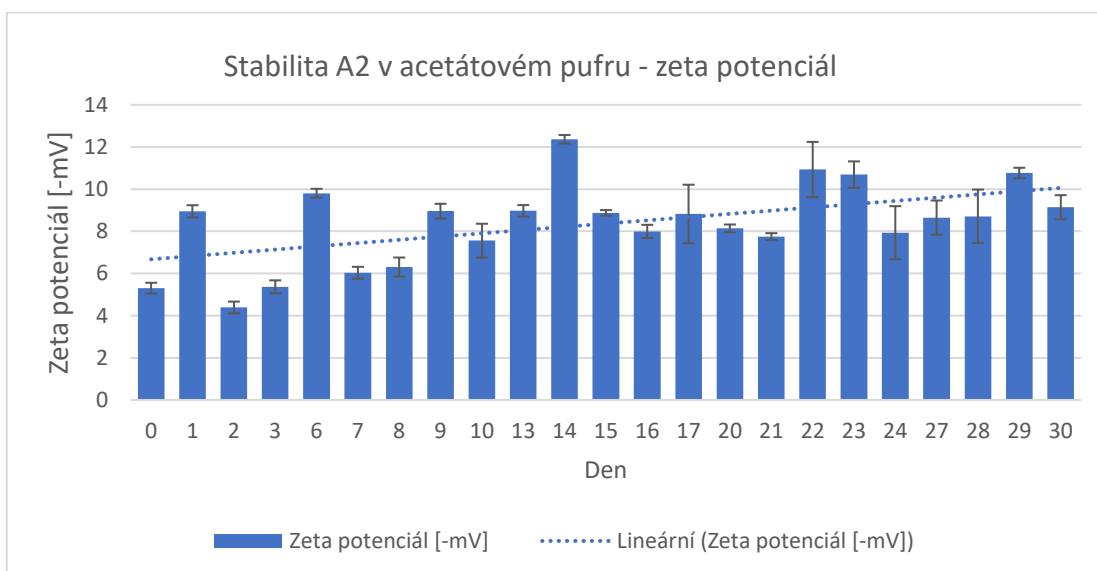
Graf 17: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii

Minimum PDI vzorku PLGA A2 v mírně kyselém pH činilo 0,020 a maximum 0,068. Rozsah PDI je tedy 0,048. Vzorek byl monodisperzní po celou dobu experimentu. Graf 18 zachycuje vývoj PDI, je neměnný v čase. Podobně jako velikost i PDI poukazuje na to, že při uchovávání nanočástic za snížené teploty a mírně kyselého pH dochází pouze k minimálním změnám.



Graf 18: Vývoj PDI nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii

Zeta potenciál nabýval hodnot od -4,39 do -12,37 mV, rozsah hodnot byl 7,98 mV. Graf 19 sleduje časový vývoj zeta potenciálu, v grafu je patrný rostoucí trend absolutních hodnot zeta potenciálu. Nárůst zeta potenciálu by bylo možné vysvětlit tím, že PVA adsorbovaný na povrch nanočástic částečně hydrolyzoval vlivem slabě kyselého pH, čímž docházelo k postupnému odkrytí vlastního náboje nanočástic.



Graf 19: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu

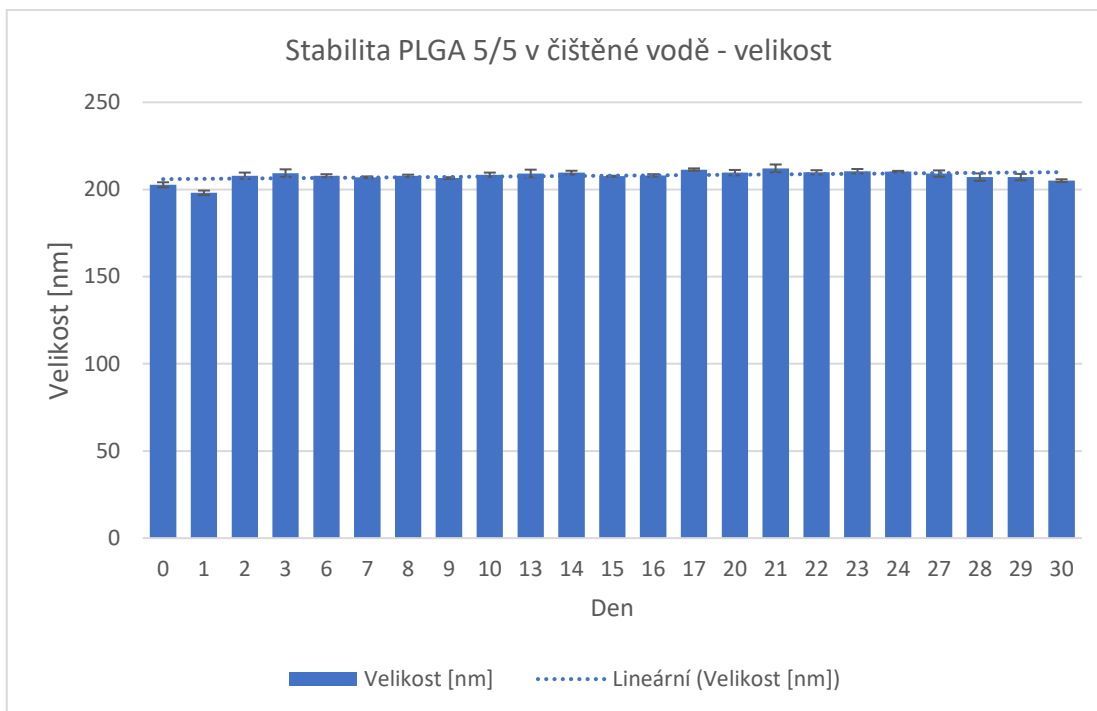
4.3.4 Stabilita PLGA 5/5 v čištěné vodě

Nanočástice připravené z polymeru PLGA 5/5 se uchovávaly v čištěné vodě. Stejně jako v případě nanočástic z PLGA A2 se po přípravě se neprovedla žádná úprava vzorku. Tabulka 8 zobrazuje přehled průměrných hodnot a SD.

Tabulka 8: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii

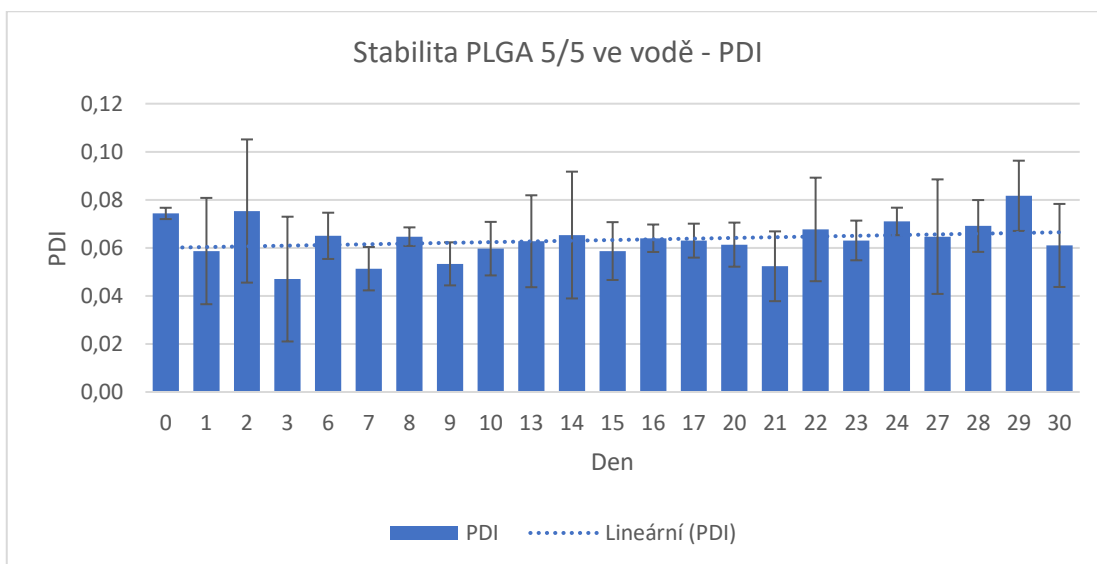
Stabilita PLGA 5/5 v čištěné vodě						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
0	202,7	1,445	0,074	0,002	-6,617	0,364
1	198,1	1,307	0,059	0,022	-4,863	0,289
2	207,9	1,791	0,075	0,030	-6,700	0,123
3	209,4	2,191	0,047	0,026	-7,833	0,379
6	207,9	0,896	0,065	0,010	-8,297	0,103
7	207,0	0,510	0,051	0,009	-6,820	0,467
8	207,8	0,712	0,065	0,004	-8,143	0,241
9	206,6	0,499	0,053	0,009	-4,913	0,082
10	208,5	1,228	0,060	0,011	-4,800	0,332
13	209,2	2,182	0,063	0,019	-8,980	0,187
14	209,6	1,115	0,065	0,026	-10,080	0,657
15	207,6	0,283	0,059	0,012	-8,287	0,401
16	208,1	0,668	0,064	0,006	-7,663	0,144
17	211,4	0,660	0,063	0,007	-11,223	1,440
20	209,7	1,541	0,061	0,009	-8,143	0,376
21	212,1	2,245	0,052	0,015	-8,520	0,311
22	209,8	1,228	0,068	0,022	-8,300	0,257
23	210,5	1,271	0,063	0,008	-5,567	0,548
24	210,3	0,403	0,071	0,006	-7,307	0,101
27	209,1	1,812	0,065	0,024	-7,827	0,144
28	207,1	2,131	0,073	0,011	-11,673	2,334
29	207,1	1,838	0,082	0,015	-7,997	0,338
30	205,1	0,776	0,061	0,017	-11,967	0,411

Velikost dosahovala hodnot od 198,1 do 212,1 nm. Rozdíl maxima a minima v tomto případě činí 14,0 nm. Hodnoty velikostí zobrazuje Graf 20. Stejně jako u PLGA A2 nebyl zjištěn ani rostoucí ani klesající trend, rozsah hodnot byl nižší než v PLGA A2. Opět tedy nedocházelo k výrazné hydrolyze nebo erozi PLGA 5/5 působením vodného prostředí, čemuž odpovídají i hodnoty PDI, viz polydisperzita.



Graf 20: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii

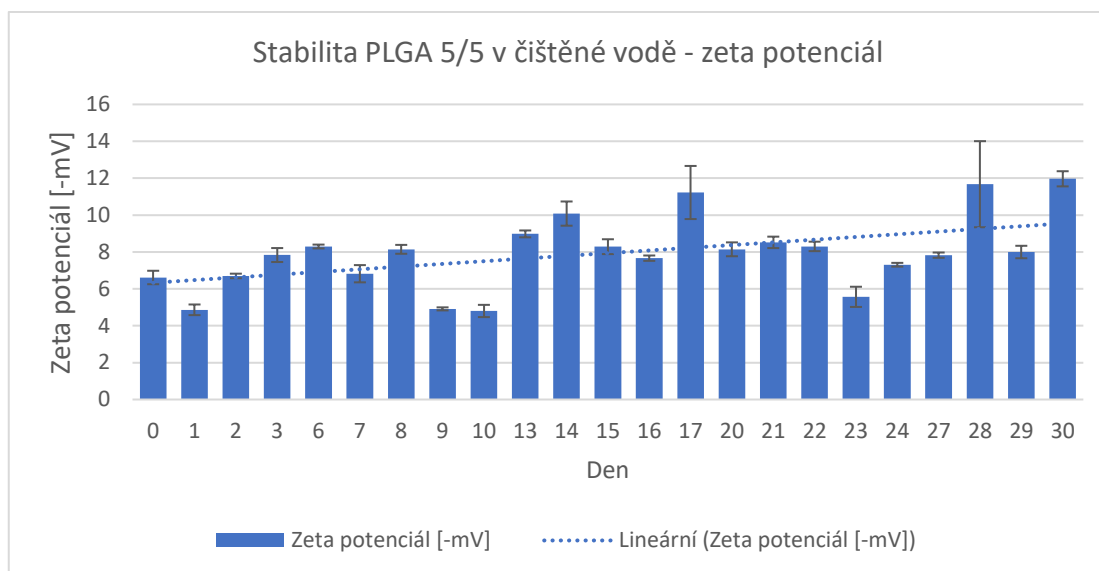
Hodnoty PDI dosahovaly hodnot od 0,047 do 0,082, rozsah hodnot tedy činil 0,035. Vzorek zůstával monodisperzní. Graf 21 sleduje vývoj PDI. Z grafu je patrné, že PDI stagnuje. Nedochozí tedy pravděpodobně k významné hydrolyze PLGA a/nebo erozi nanočástic.



Graf 21: Vývoj PDI nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii

Hodnoty zeta potenciálu se pohybovaly v rozmezí od -4,80 do -11,97 mV, tedy v rozsahu 7,17 mV. Graf 22 ukazuje časový vývoj zeta potenciálu. Z grafu je patrný

rostoucí vývoj zeta potenciálu. Postupný růst zeta potenciálu nastal u všech vzorků z PLGA 5/5. Možným vysvětlením by mohla nižší odolnost vazeb mezi PLGA 5/5 a PVA při skladování. Desorpce a následná hydrolyza PVA z povrchu lze pozorovat jako nárůst absolutních hodnot zeta potenciálu.



Graf 22: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu

4.3.5 Stabilita PLGA 5/5 v PBS pufru

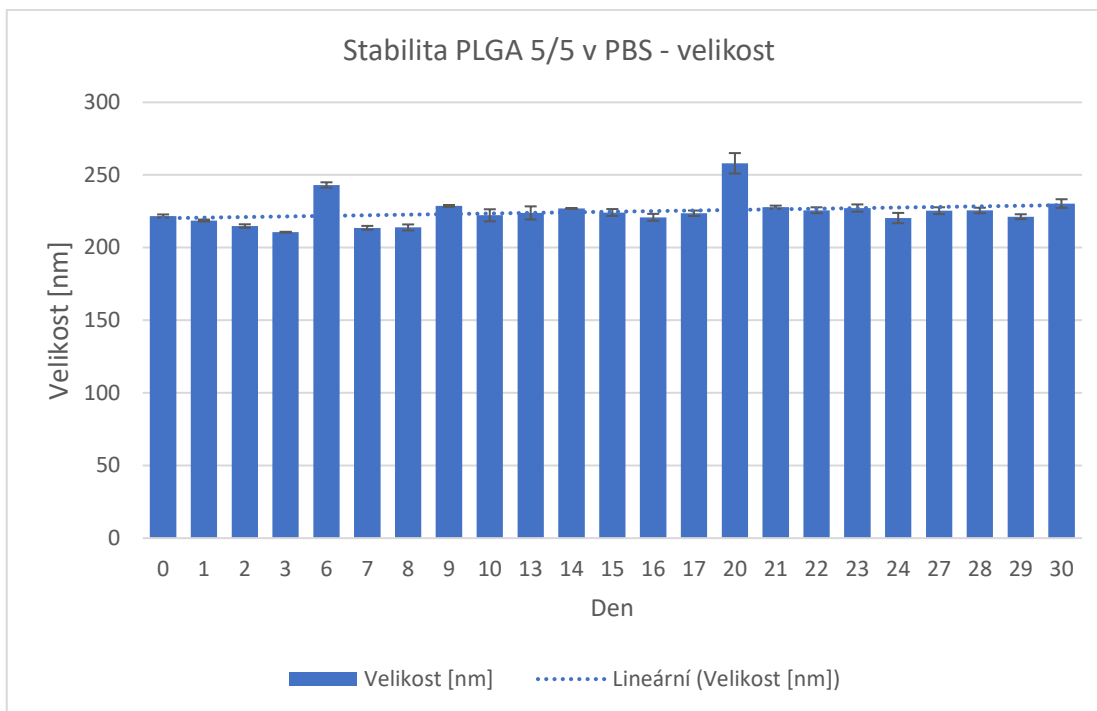
Nanočástice připravené z polymeru PLGA 5/5 se po přípravě centrifugovaly a redispergovaly v pufru PBS. Tabulka 9 zobrazuje průměrné naměřené hodnoty a jejich SD.

Tabulka 9: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii

Stabilita PLGA 5/5 v PBS						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
0	221,8	1,053	0,046	0,028	-2,700	0,653
1	218,7	0,655	0,055	0,018	-2,537	0,288
2	214,8	1,212	0,042	0,013	-2,663	0,533
3	210,6	0,283	0,044	0,012	-2,200	0,242
6	243,1	1,855	0,095	0,032	-2,980	0,396
7	213,6	1,344	0,038	0,019	-1,900	0,290
8	213,9	2,082	0,050	0,014	-2,080	0,261
9	228,6	0,694	0,038	0,008	-2,057	0,218

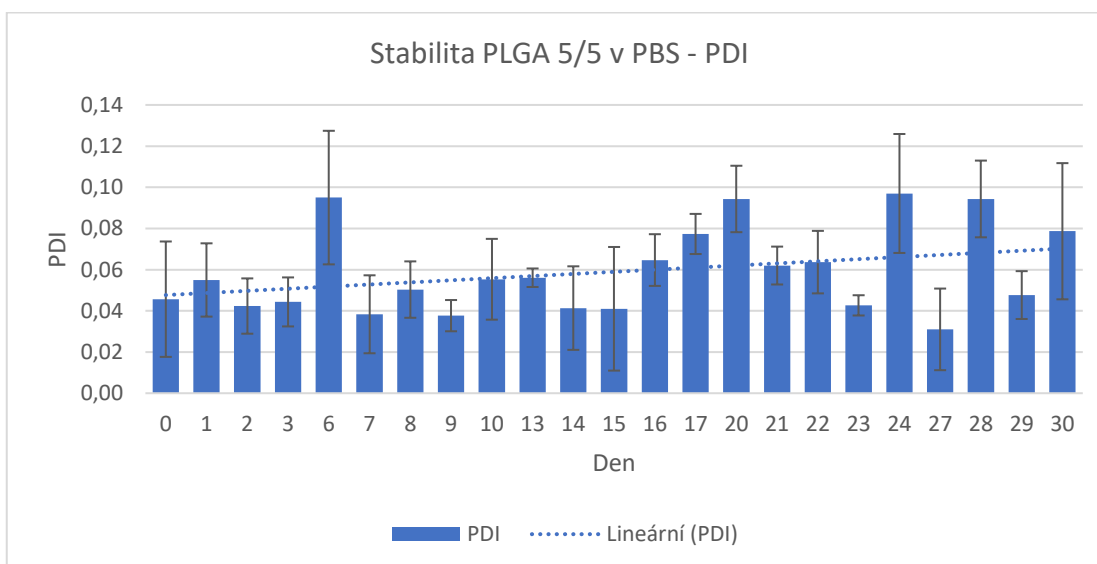
Stabilita PLGA 5/5 v PBS						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
10	222,2	4,156	0,055	0,020	-1,930	0,269
13	223,9	4,492	0,056	0,004	-2,133	0,097
14	227,0	0,047	0,041	0,020	-2,503	0,166
15	224,2	2,367	0,041	0,030	-3,070	0,765
16	220,8	2,398	0,065	0,013	-2,967	0,395
17	223,6	1,870	0,077	0,010	-6,527	0,743
20	258,0	7,014	0,094	0,016	-3,887	0,869
21	227,8	1,098	0,062	0,009	-3,957	1,437
22	225,7	2,040	0,064	0,015	-3,093	0,167
23	227,2	2,531	0,043	0,005	-3,020	0,239
24	220,3	3,554	0,097	0,029	-4,070	0,722
27	225,4	2,337	0,031	0,020	-4,977	1,173
28	225,5	1,914	0,094	0,019	-3,987	0,957
29	221,3	1,676	0,048	0,012	-3,727	0,989
30	230,3	2,980	0,079	0,033	-4,343	1,641

Minimální hodnota velikosti v tomto vzorku dosahovala 210,6 nm, maximální činila 258,0 nm. Rozsah hodnot tedy byl 47,4 nm. Graf 23 zachycuje vývoj velikosti v průběhu experimentu. Velikost dle grafu stagnuje. Nicméně při srovnání s PDI, která roste, lze vyvodit, že ve vzorku dochází ke změnám. Rostoucí PDI při zachovalé velikosti nanočástic lze vysvětlit částečnou hydrolyzou/ erozí nanočástic v PBS pufru. Tyto hydrolyzované části se poté mohly agregovat s jinými částicemi, čímž zůstala stejná průměrná velikost vzorků, ale zvýšil se podíl menších a větších částic. Toto se projevilo jako stoupající trend PDI.



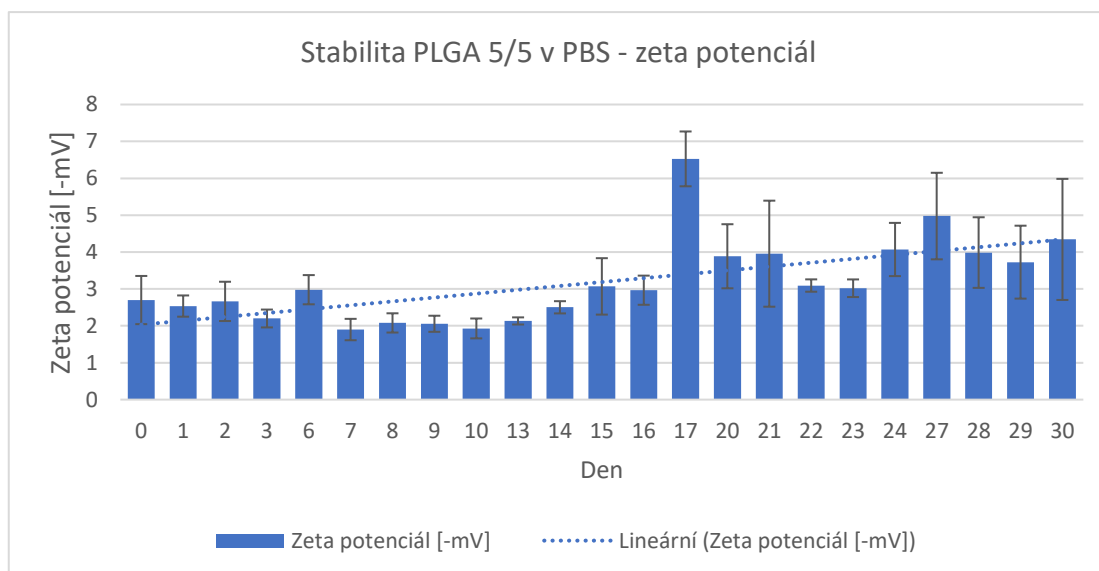
Graf 23: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii

PDI dosahoval hodnot od 0,031 do 0,097. Rozsah hodnot tedy činil 0,066. Vzorek byl monodisperzní po celou dobu experimentu. Graf 24 sleduje PDI v průběhu experimentu. Z grafu vyplývá, že PDI roste. Možným zdůvodněním může být částečná hydrolyza/ eroze nanočástic a následná agregace těchto hydrolyzovaných úseků s nanočásticemi, vysvětlení viz velikost.



Graf 24: Vývoj PDI nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii

Zeta potenciál v tomto případě nabýval hodnot od -1,90 do -6,53 mV. Rozdíl maxima a minima činil 4,63 mV. Vývoj zeta potenciálu uvádí Graf 25. V průběhu experimentu docházelo k nárůstu absolutních hodnot zeta potenciálu. Vysvětlením může být desorpce a hydrolýza PVA, viz Stabilita PLGA 5/5 v čištěné vodě – zeta potenciál.



Graf 25: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu

4.3.6 Stabilita PLGA 5/5 v acetátovém pufru

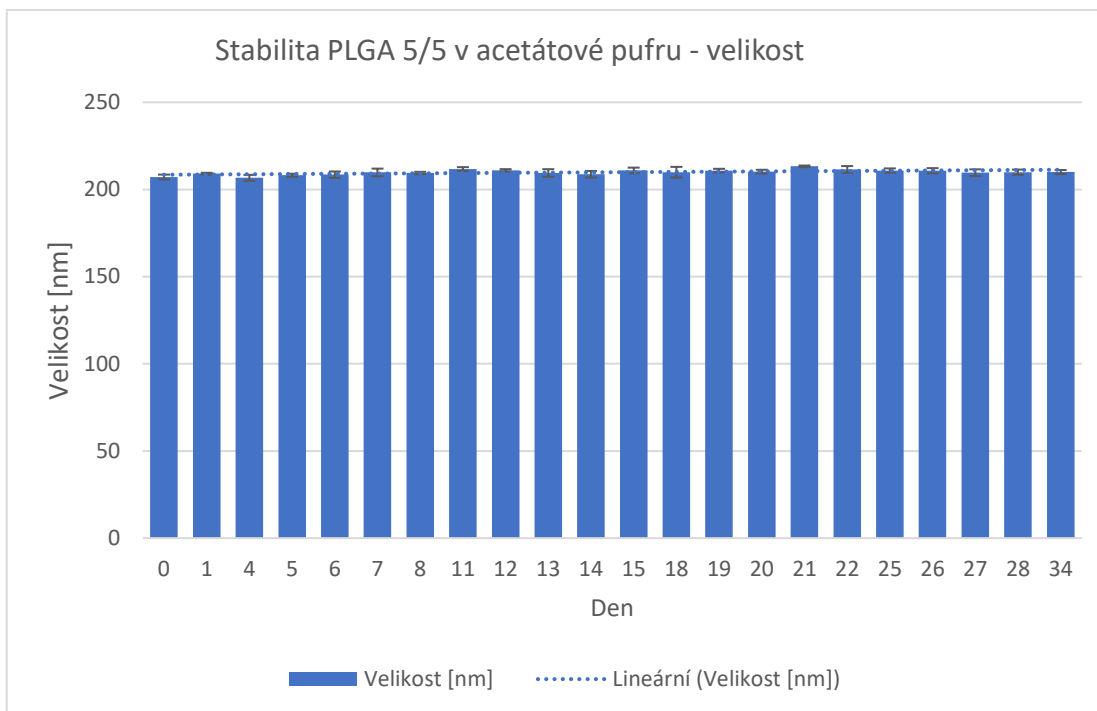
Nanočástice z polymeru PLGA 5/5 byly purifikovány jedním cyklem centrifugace, voda se nahradila acetátovým pufrům, jenž má pH 4. Tabulka 10 ukazuje průměrné hodnoty spolu se SD.

Tabulka 10: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii

Stabilita PLGA 5/5 v acetátovém pufru						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
0	207,2	1,349	0,022	0,007	-6,087	0,590
1	209,1	0,499	0,062	0,030	-10,277	1,007
4	206,7	1,697	0,016	0,014	-8,170	0,375
5	208,2	0,849	0,045	0,012	-6,417	0,282
6	208,5	1,840	0,030	0,007	-5,917	0,240
7	209,8	2,177	0,041	0,023	-8,943	0,437
8	209,5	0,660	0,035	0,007	-7,710	0,584
11	211,7	1,122	0,031	0,008	-10,293	0,225
12	211,0	0,694	0,026	0,010	-11,500	0,082

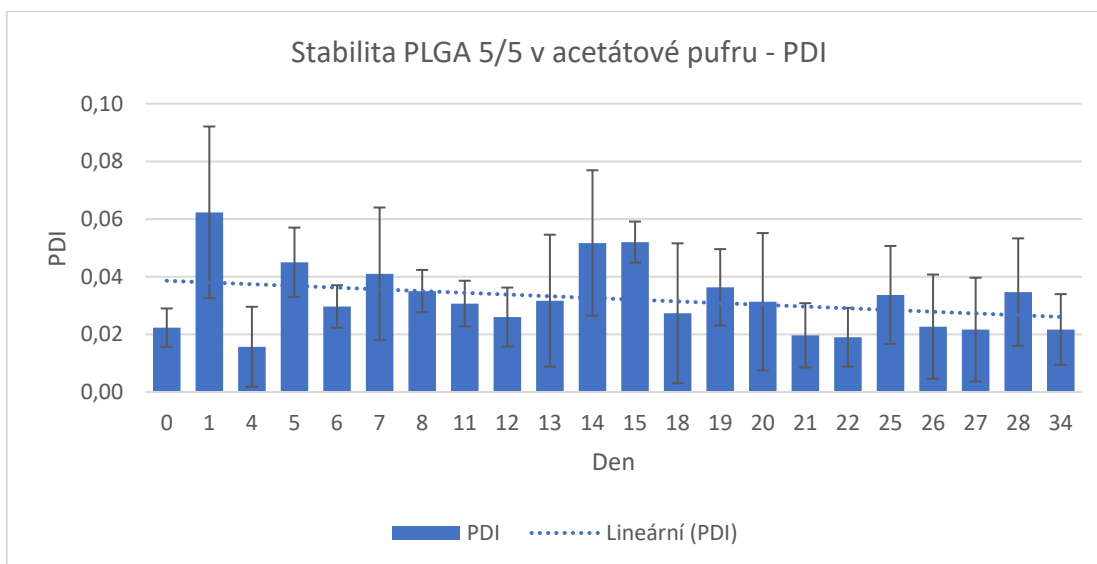
Stabilita PLGA 5/5 v acetátovém pufru						
Den	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
13	209,5	2,179	0,032	0,023	-8,530	0,099
14	208,8	1,880	0,052	0,025	-7,083	0,164
15	210,9	1,605	0,052	0,007	-10,963	1,092
18	209,9	3,035	0,027	0,024	-11,000	0,356
19	210,8	1,061	0,036	0,013	-9,123	0,219
20	210,2	1,084	0,031	0,024	-9,903	0,249
21	213,3	0,455	0,020	0,011	-9,577	0,281
22	211,5	1,960	0,019	0,010	-8,030	0,524
25	210,9	1,223	0,034	0,017	-9,653	0,883
26	210,8	1,484	0,023	0,018	-10,733	0,205
27	209,6	1,922	0,022	0,018	-10,767	1,543
28	209,9	1,497	0,035	0,019	-9,493	0,429
34	210,0	1,178	0,022	0,012	-9,000	0,630

Velikost nanočástic dosahovala hodnot od 206,7 do 213,3 nm. Rozmezí mezi minimem a maximem bylo tedy úzké, jeho hodnota činila 6,6 nm. Spolu se vzorkem s částicemi z PLGA A2 v kyselém pufru docházelo v těchto vzorcích pouze k minimálním změnám. Graf 26 zobrazuje jednotlivé hodnoty, z grafu vyplývá stagnující trend. Podobně jako u PLGA A2, ani v případě PLGA 5/5 v mírně kyselém pH nedocházelo k pozorovatelným změnám velikosti. PLGA 5/5 tedy opět zřejmě výrazně neerodoval, ani nehydrolyzoval v mírně kyselém pH.



Graf 26: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii

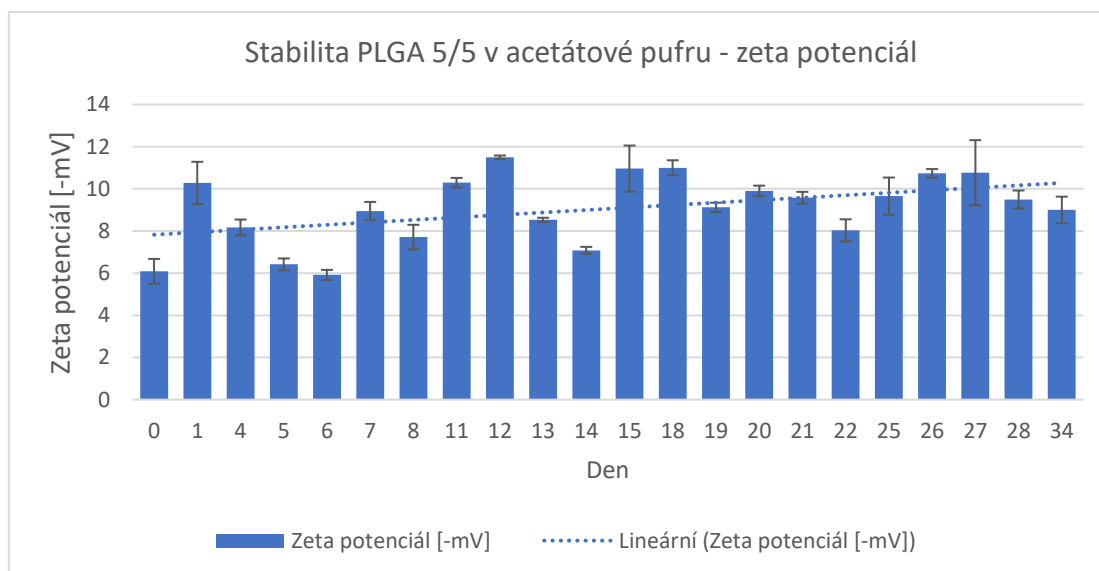
PDI se pohyboval od 0,016 do 0,062, jeho rozmezí tak bylo 0,046. Vzorek byl tedy po celou dobu hodnocení monodisperzní. Vývoj PDI v průběhu experimentu znázorňuje Graf č. 27. PDI mírně klesá, nicméně vzhledem k výsledkům prakticky neměnné velikosti, viz velikost, lze tento trend považovat za zanedbatelný.



Graf 27: Vývoj PDI nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii

Zeta potenciál v průběhu hodnocení nabýval hodnot od -5,92 do -11,50 mV. Rozsah měření tak činil 5,58 mV. Graf 28 sleduje vývoj zeta potenciálu, docházelo

k postupnému růstu absolutních hodnot zeta potenciál. Podobně jako u PLGA A2 lze tento fenomén vysvětlit kyselou hydrolyzou PVA. Dalším možným vysvětlením je nedostatečná odolnost vazeb mezi PVA a polymerem, viz Stabilita PLGA 5/5 v čištěné vodě, popř. kombinace obou.



Graf 28: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu

4.3.7. Stabilita shrnutí

Jako nejstabilnější z naměřených dat vycházejí nanočástice uchovávané v kyselých pufrch. Přestože se uvádí, že kyselé pH urychluje rychlost hydrolyzy PLGA, v této práci, při mírně kyselém pH to pozorováno nebylo. Mezi použitými polymery nebyl signifikantní rozdíl. U nanočástic ve vodném prostředí se sledované parametry měnily více, nicméně i tyto změny lze považovat za zanedbatelné. Nižší fluktuaci výsledků vykazoval PLGA 5/5 pravděpodobně díky nižšímu počtu ionizovatelných skupin. Největší změny v průběhu měření nastaly u nanočástic v slabě bazickém pH. V případě nanočástic z PLGA 5/5 v PBS měřené parametry vycházely o něco hůře (vyšší rozsah velikostí i PDI) než u nanočástic v ostatních prostředích a PDI vykazoval větší rozsah naměřených hodnot. U částic připravených z PLGA A2, které se projevovaly jako nejméně stabilní, docházelo ve vzorku k nárůstům a poklesům velikosti a PDI se podařilo popsat unikátní mechanismus cyklického bobtnání. Tento fenomén je silně závislý na míře interakcí okolního prostředí s PLGA. Volné karboxylové skupiny byly ve slabě bazickém pH ionizované a usnadnily flux molekul vody do materiálu. Svoji roli mohla

sehrát i iontová síla prostředí, ale k ověření je třeba dalších experimentů. PDI tohoto vzorku se pohyboval za hranicí 0,2. Z naměřených dat vyplývá velmi specifické chování nanočástic tvořených větvenými polymery jako je unikátní architektura PLGA A2.

Vysoká stabilita nanočástic svědčí o tom, že se léčivá látka se přednostně neuvolňuje z nanočástic erozí a hydrolyzou, protože k erozi a hydrolyze u nanočástic nedocházelo. Hlavním mechanismem uvolňování léčiva bude tedy pravděpodobně difúze. Protože PLGA A2 ve fyziologickém pH podléhala bobtnání, dá se u větveného polymeru předpokládat i tento mechanismus uvolňování léčiv.

Dalším výsledkem této studie je stabilita suspenzí nanočástic i přes nízký zeta potenciál. V literatuře se uvádí, že pro stabilní suspenze nanočástic je nutné, aby hodnota zeta potenciálu byla alespoň ± 30 mV. Nicméně v této práci jsou popsány stabilní suspenze s nižšími hodnotami zeta potenciálu. Za tuto stabilitu odpovídá PVA na povrchu nanočástic. PVA působí sterické oddálení nanočástic, zároveň vytváří solvatační obal. Působí tedy podobně jako PEG.

4.4 Vlastnosti nanočástic s kurkuminem

Tato kapitola se bude věnovat charakterizaci nanočástic obsahujících kurkumin. Nanočástice se hodnotily na Zetasizeru, kde se zjišťovala velikost, PDI a zeta potenciál. Tabulka 11 uvádí průměrné naměřené hodnoty a jejich SD.

Tabulka 11: Průměrné hodnoty velikosti, PDI a zeta potenciálu včetně směrodatných odchylek nanočástic z 2% PLGA 5/5 a PLGA A2 obsahujících 25 μ g kurkuminu

Vzorek	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
PLGA 5/5	205,8	1,327	0,076	0,005	-9,330	0,708
PLGA A2	191,3	1,533	0,054	0,015	-7,477	0,740

Naměřené velikosti byly podobné, v PLGA 5/5 byla 205,8 nm, v PLGA A2 191,3 nm, lišily se pouze nevýznamně. Tato velikost určuje pro nanočástice s kurkuminem distribuci do buněk MPS. Z hlediska PDI byly oba vzorky monodisperzní. Naměřený zeta potenciál opět dosahoval nízkých hodnot.

Dalšími hodnocenými parametry byly EE, DL a RY. Jejich hodnoty shrnuje Tabulka 12. Vyšší EE dosáhl vzorek z PLGA A2. Je to pravděpodobně způsobené

strukturou polymeru, která je větvená. Tato větvená struktura je zřejmě schopná zadržet větší množství léčiva než struktura lineární, kterou disponuje PLGA 5/5.

Tabulka 12: Hodnoty EE, DL a RY v % pro nanočástice z 2% polymeru a 1% PVA obsahující 25 µg kurkuminu

Vzorek	EE [%]	DL [%]	RY [%]
PLGA 5/5	31,0	0,12	33,6
PLGA A2	57,5	0,22	32,3

4.5 Vlastnosti nanočástic s prokainem

Pro charakterizaci nanočástic obsahujících prokain se také měřila velikost, PDI a zeta potenciál. Průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky zobrazuje Tabulka 13. Nanočástice vykazovaly téměř shodnou velikost, PDI a zeta potenciál v obou polymerech.

Tabulka 13: Průměrné hodnoty velikosti, PDI a zeta potenciálu včetně směrodatných odchylek nanočástic z 2% PLGA 5/5 a PLGA A2 obsahujících prokain

Vzorek	Velikost [nm]	SD	PDI	SD	Zeta potenciál [mV]	SD
PLGA 5/5	199,8	0,450	0,079	0,004	-10,300	0,216
PLGA A2	193,4	0,712	0,074	0,008	-10,967	0,340

Důležitými charakteristikami pro nanočástice s prokainem jsou EE, DL a RY. Vypočtené hodnoty ukazuje Tabulka 14. Vyšších hodnot dosahuje PLGA A2 u všech měřených veličin. Vyšší EE PLGA A2 je způsobena pravděpodobně opět větvenou strukturou, která vytváří méně organizovanou matici, která je lépe uzpůsobena pro akomodaci většího množství léčiva.

Tabulka 14: Hodnoty EE, DL a RY v % pro nanočástice z 2% polymeru a 1% PVA obsahující 250 µg prokain

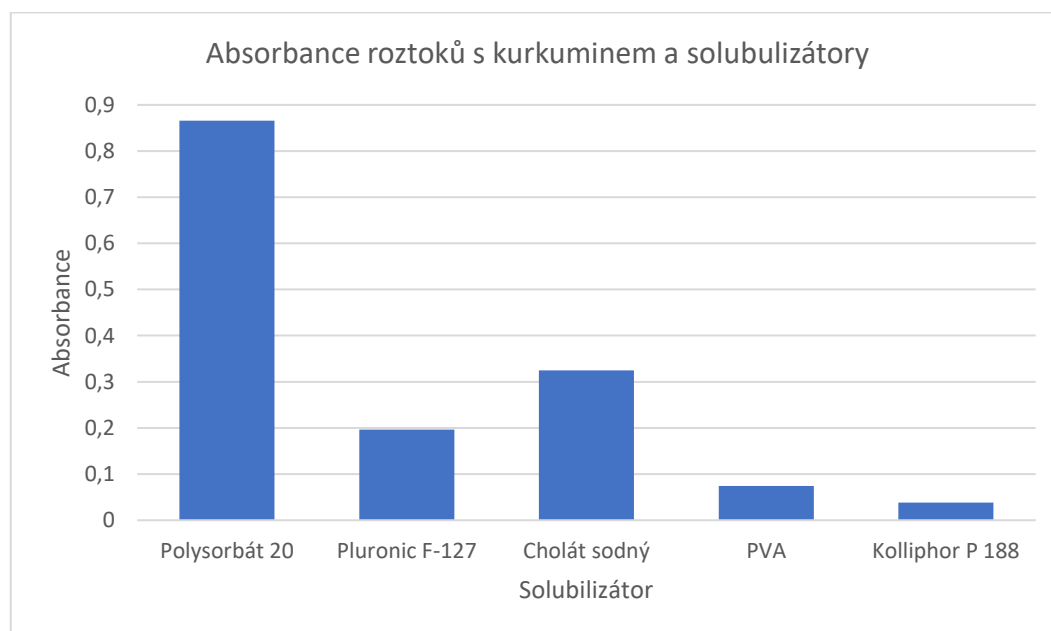
Vzorek	EE [%]	DL [%]	RY [%]
PLGA 5/5	43,6	2,00	27,2
PLGA A2	100,0	3,61	34,6

4.6 Solubilizace kurkuminu

Před provedením disolučních testů bylo nejprve potřeba zjistit, který roztok solubilizátoru se bude používat jako disoluční medium, aby se předešlo precipitaci uvolněného kurkuminu ve vodě. Tabulka 15 uvádí průměrné naměřené hodnoty absorbance jednotlivých vzorků, které obsahovaly stejnou navážku kurkuminu a stejnou koncentraci solubilizátoru. Hodnoty jsou uspořádány do Grafu 29. Tabulka a graf poukazují na to, že nejvyšší rozpustnost kurkuminu je v 1% roztoku Polysorbátu 20, proto byl pro disoluční testy vybrán právě tento solubilizátor.

Tabulka 15: Hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků kurkuminu s navážkou 0,25 mg s 25 ml 1% roztoků solubilizátorů změřených vůči čištěné vodě jako slepému vzorku

Vzorek	Absorbance
Polysorbát 20	0,8660
Pluronic F-127	0,1964
Cholát sodný	0,3249
PVA	0,0742
Kolliphor P 188	0,0382



Graf 29: Absorbance jednotlivých vzorků kurkuminu s navážkou 0,25 mg smíšených s 25 ml 1% roztoků solubilizátorů změřených po 30 minutách vůči čištěné vodě jako slepému vzorku

4.7 Disoluce

Disoluční testy byly provedeny se dvěma modelovými léčivy, kurkuminem a prokainem. Na přípravu nanočástic se opět použily 2% roztoky polymerů a 1% roztok PVA. Sledovalo se uvolňování v průběhu 48 hodin.

4.7.1 Disoluce kurkuminu

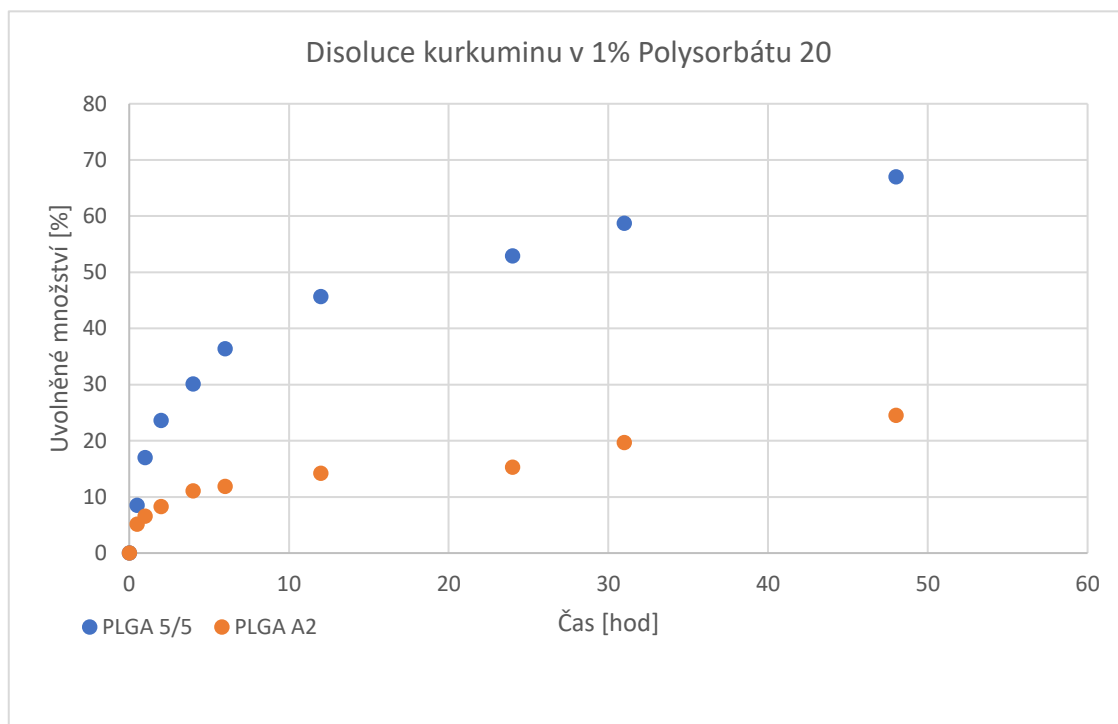
Tabulka 16 uvádí procentuální množství uvolněného kurkuminu z obou polymerů vztažené na EE. Z PLGA 5/5 se uvolnilo 67,0 % kurkuminu, zatímco z PLGA A2 pouze 24,5 %.

Tabulka 16: Disoluce kurkuminu z nanočástic z PLGA 5/5 a A2

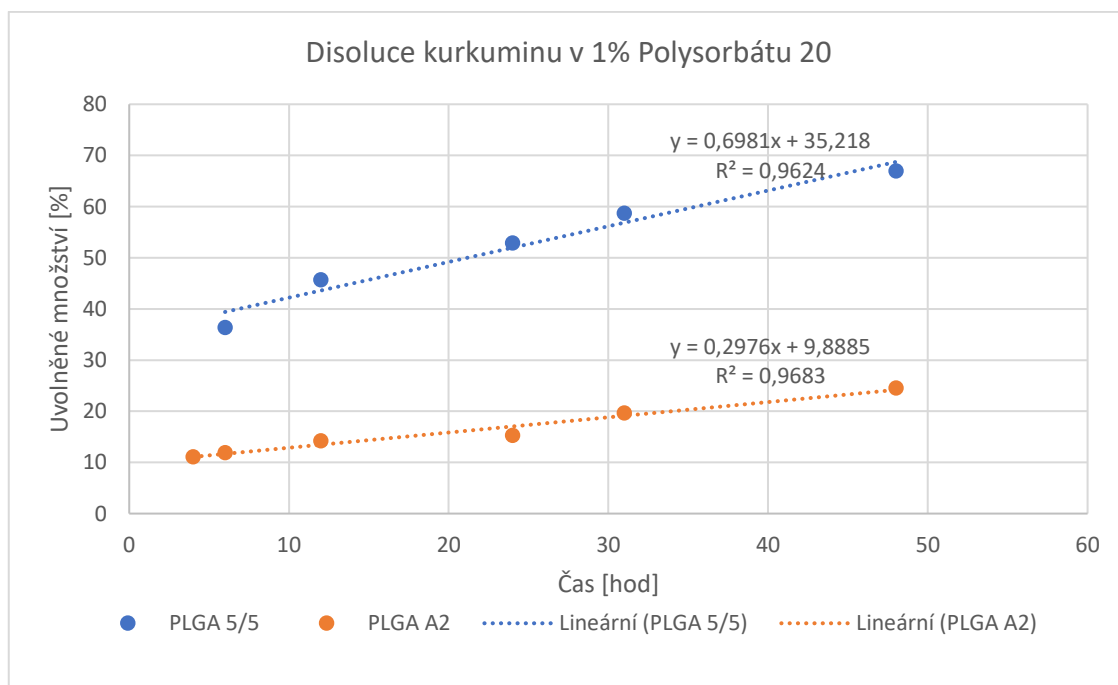
	PLGA 5/5	PLGA A2
Čas [hod]	% uvolněného kurkuminu	% uvolněného kurkuminu
0	0	0
0,5	8,5	5,1
1	17,0	6,5
2	23,6	8,2
4	30,1	11,1
6	36,4	11,9
12	45,7	14,2
24	52,9	15,3
31	58,7	19,7
48	67,0	24,5

Průběh disoluce dále zobrazují Grafy 30 a 31. Z grafu 30 je patrné, že z obou polymerů se kurkumin zpočátku uvolňuje tzv. burst efektem, na který navazuje kinetika nultého řádu. Uvolňování kurkuminu z PLGA A2 lze považovat za lineární od 4 hodin, viz Graf 31, zatímco u PLGA 5/5 dochází k lineárnímu uvolňování až od 6 hodin. Z uvedeného je patrné, že uvolňování kurkuminu probíhá výrazně rychleji z PLGA 5/5, kdy po 48 hodinách dojde k uvolnění téměř 70 % kurkuminu. To je v korelaci s hodnotami EE, které ukazují, že míra interakcí mezi PLGA 5/5 a kurkuminem je výrazně nižší než v případě PLGA A2. Tento větvený polymer je díky své rozvětvené struktuře podstatně lépe navržen pro akomodaci většího množství léčiv a jejich efektivního uchování v matrici. Proto bylo kurkuminu do PLGA A2 nanočástic enkapsulováno více a k jeho uvolňování dochází relativně pomaleji. Vysvětlením je méně organizovaná matrix prostá případných lineárně organizovaných jader krystalinity, které

podstatně snižují drug-load kapacitu daného materiálu. Tento fenomén byl popsán v případě lipidických nosičů.[49]



Graf 30: Disoluční křivky kurkuminu z nanočástic z PLGA 5/5 a A2



Graf 31: Lineární části disolučních křivek kurkuminu

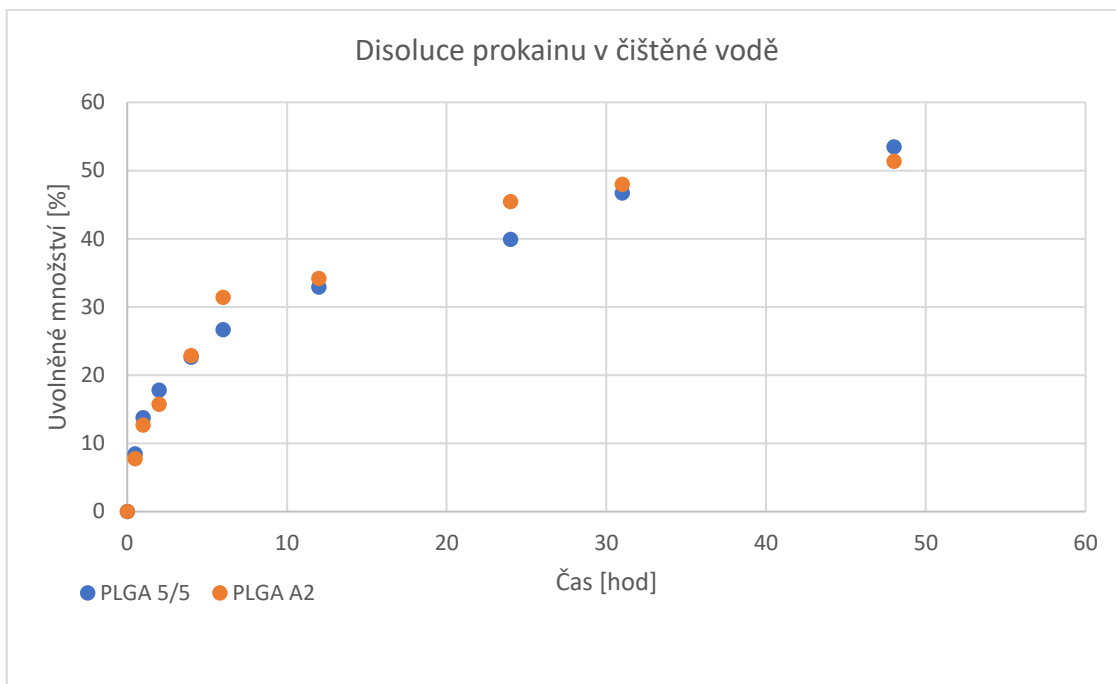
4.7.2 Disoluce prokainu

Tabulka 17 uvádí procentuální množství uvolněného prokainu z obou polymerů vztažené na EE. Z PLGA 5/5 se uvolnilo 53,5 % prokainu, zatímco z PLGA A2 pouze 51,3 %. V tomto případě se nejedná o statisticky významný rozdíl.

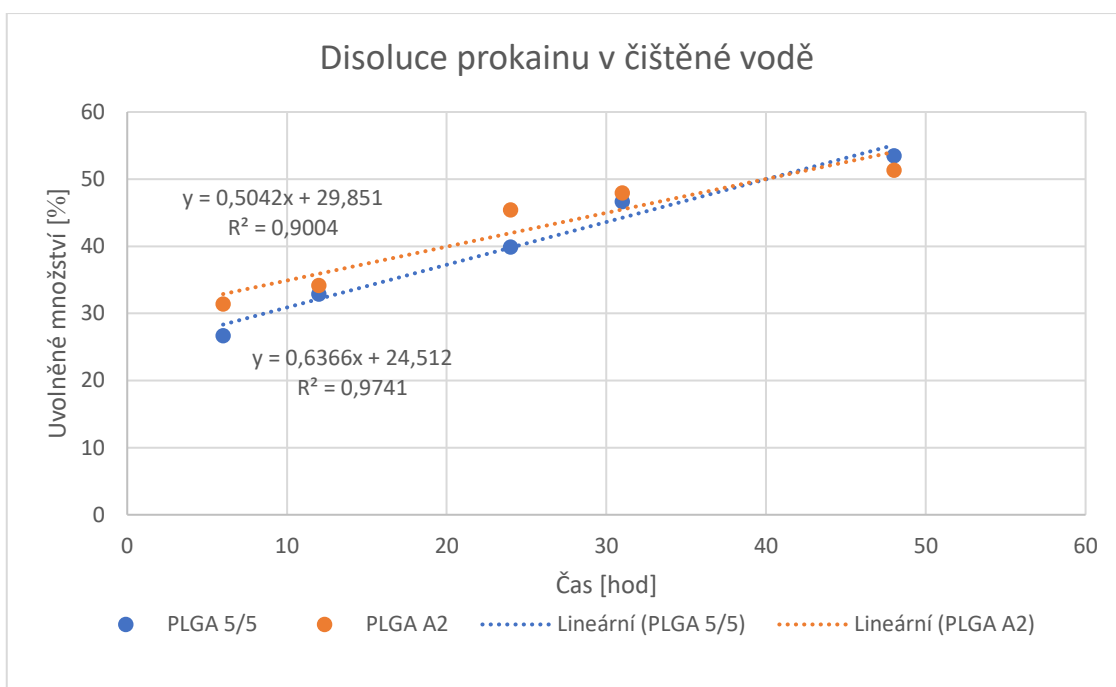
Tabulka 17: Disoluce prokainu z nanočástic z PLGA 5/5

	PLGA 5/5	PLGA A2
Čas [hod]	% uvolněného prokainu	% uvolněného prokainu
0	0	0
0,5	8,4	7,7
1	13,8	12,7
2	17,8	15,7
4	22,6	22,9
6	26,7	31,4
12	32,9	34,2
24	39,9	45,4
31	46,7	47,9
48	53,5	51,3

Průběh disoluce prokainu z PLGA 5/5 probíhal také s počátečním burst efektem, viz Graf 32. Od 6. hodiny lze pozorovat kinetiku nultého řádu. Lineární část křivky zobrazuje Graf 33. U disoluce prokainu z PLGA A2 má celá křivka tvar burst efektu a nedochází k uvolňování, které by bylo lineární. Je pravděpodobné, že k lineárnímu uvolňování by dále docházelo také, nicméně z časových důvodů byl experiment proveden pouze po dobu 48 h. Srovnatelné uvolňování z obou polymerů lze vysvětlit interakcemi mezi prokainem a polymerem. U PLGA 5/5 je míra interakcí mezi polymerem a léčivem nižší, u PLGA A2 je vyšší. Nicméně díky vyšší hydrofilitě se prokain snadněji uvolňuje než kurkumin, výsledkem je srovnatelné uvolňování prokainu z obou polymerů.



Graf 32: Disoluční křivky prokainu z nanočástic z PLGA 5/5 a A2



Graf 33: Lineární části disolučních křivek prokainu

5 ZÁVĚR

Zvolenou metodou přípravy byla nanoprecipitace. Vzorky byly připraveny z lineárního polymeru PLGA 5/5 a větveného kopolymeru PLGA A2. Jako surfaktant byl použit PVA. Vzniklé nanočástice byly hodnoceny z hlediska velikosti, PDI a zeta potenciálu. Porovnával se vliv koncentrace roztoku polymeru a PVA na uvedené parametry. Zjišťovala se výtěžnost nanoprecipitace. Dále byla provedena stabilitní studie. Vyhodnocoval se vliv pH a použitého polymeru na uchovávání nanočástic v průběhu jednoho měsíce. U dvou modelových léčiv byla hodnocena EE, DL a RY. Následně byly provedeny disoluční testy.

Bylo připraveno 24 vzorků nanočástic. Nanočástice dosahovaly velikosti v rozmezí od 140 nm do 542 nm, PDI byl od 0,057 do 0,254. Hodnoty zeta potenciálu se pohybovaly od nulového až po -16 mV. Bylo pozorováno, že s větší koncentrací polymeru vznikaly větší částice s větším PDI. Podobně u PLGA 5/5 s větší koncentrací PVA vznikaly větší nanočástice. Větší výtěžnost poskytl PLGA 5/5.

Nanočástice z obou polymerů v kyselém pH vykazovaly největší stabilitu, naopak nejméně stabilní byly nanočástice z větveného polymeru ve slabě bazickém pH, u kterého byl pozorován fenomén cyklického bobtnání.[48]

EE se pohybovala od 35,2 do 100,0 % v závislosti na použitém polymeru a léčivu. Lepší EE bylo v obou případech dosaženo použitím polymeru PLGA A2. DL dosahoval hodnot od 0,12 % do 3,61 %, RY od 27,2 % do 34,6 %.

Provedené disoluční testy ukázaly, že pro řízené uvolňování lipofilních léčiv je vhodnější polymer PLGA A2, ze kterého se léčivo uvolňovalo pozvolněji. Tento jev je způsoben méně organizovanou matrix nanočástic z PLGA A2, která v sobě dokáže efektivněji uchovat léčiva. V případě hydrofilního léčiva byl pozorován obdobný efekt obou polymerů.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační přímka kurkuminu v ACE měřena při 420 nm.....	34
Graf 2: Kalibrační přímka prokainu v čištěné vodě měřena při 290 nm	35
Graf 3: Kalibrační přímka kurkuminu v 1% roztoku Polysorbátu 20 měřena při 425 nm	37
Graf 4: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA 5/5 a koncentrace roztoku PVA na velikost nanočástic	40
Graf 5: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA A2 a koncentrace roztoku PVA na velikost nanočástic	40
Graf 6: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA 5/5 a koncentrace roztoku PVA na PDI nanočástic	41
Graf 7: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA A2 a koncentrace roztoku PVA na PDI nanočástic.....	42
Graf 8: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA 5/5 a koncentrace roztoku PVA na zeta potenciál nanočástic, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu	43
Graf 9: Vliv koncentrace roztoku polymeru PLGA A2 a koncentrace roztoku PVA na zeta potenciál nanočástic, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu	43
Graf 10: Výtěžnosti jednotlivých vzorků v % připravených z 2% roztoků polymerů s různými koncentracemi PVA.....	45
Graf 11: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii	47
Graf 12: Vývoj PDI nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii	47
Graf 13: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu	48
Graf 14: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii.....	50
Graf 15: Vývoj PDI nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii	51
Graf 16: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu.....	51
Graf 17: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii	53
Graf 18: Vývoj PDI nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii	54
Graf 19: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu.....	54

Graf 20: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii.....	56
Graf 21: Vývoj PDI nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii	56
Graf 22: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu	57
Graf 23: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii.....	59
Graf 24: Vývoj PDI nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii.....	59
Graf 25: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu.....	60
Graf 26: Vývoj velikosti nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii	62
Graf 27: Vývoj PDI nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii	62
Graf 28: Vývoj zeta potenciálu nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii, na ose y jsou uvedené absolutní hodnoty zeta potenciálu.....	63
Graf 29: Absorbance jednotlivých vzorků kurkuminu s navázkou 0,25 mg smísených s 25 ml 1% roztoků solubilizátorů změřených po 30 minutách vůči čištěné vodě jako slepému vzorku	66
Graf 30: Disoluční křivky kurkuminu z nanočástic z PLGA 5/5 a A2.....	68
Graf 31: Lineární části disolučních křivek kurkuminu	68
Graf 32: Disoluční křivky prokainu z nanočástic z PLGA 5/5 a A2	70
Graf 33: Lineární části disolučních křivek prokainu	70

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura fullerenu C ₆₀ a C ₇₀ (zleva)[7]	12
Obrázek 2: Struktura lipozomu a micely[15]	15
Obrázek 3: Struktura dendrimeru [20].....	17
Obrázek 4: Schéma emulzní odpařovací metody [24].....	19
Obrázek 5: Schéma emulzní-difúzní metody [24].....	20
Obrázek 6: Schéma nanoprecipitace [24]	21
Obrázek 7: Schéma vysolování [24].....	22
Obrázek 8: Součásti Zetasizeru měřící velikost: 1. laser, 2. kyveta se vzorkem, 3. detektor, 4. tlumič, 5. korelátor, 6. počítač [45].....	28
Obrázek 9: Součásti Zetasizeru měřící zeta potenciál: 1. laser, 2. kyveta, 3. detektor, 4. digitální signálový procesor, 5. počítač, 6. tlumič, 7. kompenzační optiky, A. dopadající paprsek, B. referenční paprsek, C. rozptýlený paprsek [45].....	29

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příprava organické fáze včetně vlastní navážky polymeru	31
Tabulka 2: Příprava vodné fáze včetně vlastní navážky surfaktantu.....	32
Tabulka 3: Přehled připravených vzorků a průměrných hodnot velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD (n. a. = not available).....	38
Tabulka 4: Přehled výtěžností jednotlivých vzorků s navážkou polymeru 20 mg	44
Tabulka 5: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA A2 v čištěné vodě při stabilitní studii.....	45
Tabulka 6: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA A2 v PBS při stabilitní studii.....	48
Tabulka 7: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA A2 v acetátovém pufru při stabilitní studii.....	52
Tabulka 8: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA 5/5 v čištěné vodě při stabilitní studii.....	55
Tabulka 9: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA 5/5 v PBS při stabilitní studii.....	57
Tabulka 10: Přehled průměrných velikostí, PDI a zeta potenciálů, včetně SD, nanočástic z PLGA 5/5 v acetátovém pufru při stabilitní studii.....	60
Tabulka 11: Průměrné hodnoty velikosti, PDI a zeta potenciálu včetně směrodatných odchylek nanočástic z 2% PLGA 5/5 a PLGA A2 obsahujících 25 µg kurkuminu	64
Tabulka 12: Hodnoty EE, DL a RY v % pro nanočástice z 2% polymeru a 1% PVA obsahující 25 µg kurkuminu	65
Tabulka 13: Průměrné hodnoty velikosti, PDI a zeta potenciálu včetně směrodatných odchylek nanočástic z 2% PLGA 5/5 a PLGA A2 obsahujících prokain.....	65
Tabulka 14: Hodnoty EE, DL a RY v % pro nanočástice z 2% polymeru a 1% PVA obsahující 250 µg prokain	65
Tabulka 15: Hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků kurkuminu s navážkou 0,25 mg s 25 ml 1% roztoků solubilizátorů změřených vůči čištěné vodě jako slepému vzorku	66
Tabulka 16: Disoluce kurkuminu z nanočástic z PLGA 5/5 a A2.....	67
Tabulka 17: Disoluce prokainu z nanočástic z PLGA 5/5.....	69

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] RABIŠKOVÁ, M. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia* [online]. 2007, **17**(5), 495–501. [cit. 2020-04-06]. ISSN 2336-3541. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Nanocastice-pro-lekove-formy/6-H-ix.magarticle.aspx>
- [2] KHAN, I., K. SAEED a I. KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, **12**(7), 908–931. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- [3] LETCHFORD, K. a H. BURT. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2007, **65**(3), 259–269. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009
- [4] TAMMAM, S. N., H. M. E. AZZAZY a A. LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, **11**(4), 555–577. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1550-7041. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017
- [5] RAO, J. P. a K. E. GECKELER. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2011, **36**(7), 887–913. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001
- [6] HANS, M. L. a A. M. LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, **6**(4), 319–327. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1359-0286. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1
- [7] MOUSAVI, S. Z., S. NAFISI a H. I. MAIBACH. Fullerene nanoparticle in dermatological and cosmetic applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2017, **13**(3), 1071–1087. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1549-9642. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2016.10.002
- [8] CAO, Y. a Y. LUO. Pharmacological and toxicological aspects of carbon nanotubes (CNTs) to vascular system: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2019, **385**(10), 114801. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1096-0333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2019.114801
- [9] HARISH, K. K., N VENKATESH, H. BHOWMIK a A. KUILA. Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* [online]. 2018, **4**(2), 3765–3775. [cit. 2020-04-06]. ISSN 2574-1241. Dostupné z: doi:10.26717/BJSTR.2018.04.0001011
- [10] COOPER, T. M. Silver Nanoparticles: From Silver Halide Photography to Plasmonics Tadaaki Tani. *Materials Research Society Bulletin* [online]. 2017, **42**(2), 162. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0883-7694. Dostupné z: doi:10.1557/mrs.2017.20

- [11] IQBAL, M., G. USANASE, K. OULMI, F. ABERKANE, T. BENDAIKHA, H. FESSI, N. ZINE, G. AGUSTI, E. S. ERRACHID a A. ELAISSARI. Preparation of gold nanoparticles and determination of their particles size via different methods. *Materials Research Bulletin* [online]. 2016, **79**, 97–104. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0025-5408. Dostupné z: doi:10.1016/j.materresbull.2015.12.026
- [12] TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2005, **4**(2), 145–160. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd1632
- [13] JESORKA, A. a O. ORWAR. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* [online]. 2008, **1**(1), 801–832. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1936-1327. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747
- [14] THURSTON, G., J. W. MCLEAN, M. RIZEN, P. BALUK, A. HASKELL, T. J. MURPHY, D. HANAHAN a D. M. MCDONALD. Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cells in Tumors and Chronic Inflammation in Mice. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1998, **101**(7), 1401–1413 [cit. 2020-04-06]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI965
- [15] VILLARREAL, M. R. Phospholipids aqueous solution structures. *Wikipedia* [online]. 2007 [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_polymorphism#/media/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg
- [16] AHMAD, Z., A. SHAH, M. SIDDIQ a H. B. KRAATZ. Polymeric micelles as drug delivery vehicles. *Royal Society of Chemistry Advances* [online]. 2014, **4**(33), 17028–17038. [cit. 2020-04-06]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c3ra47370h
- [17] AZIZ, Z. A. A., H. MOHD-NASIR, A. AHMAD, S. H. SITI, W. L. PENG, S. C. CHUO, A. KHATOON, K. UMAR, A. A. YAQOUB a M. N. MOHAMAD IBRAHIM. Role of Nanotechnology for Design and Development of Cosmeceutical: Application in Makeup and Skin Care. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2019, **7**, 739 [cit. 2020-04-06]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00739
- [18] BAYÓN-CORDERO, L., I. ALKORTA a L. ARANA. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. *Nanomaterials* [online]. 2019, **9**(3), 474. [cit. 2020-04-06]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano9030474
- [19] MEHNERT, W. a K. MÄDER. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2001, **47**(2–3), 165–196. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00105-3
- [20] HU, J., K. HU a Y. CHENG. Tailoring the dendrimer core for efficient gene delivery. *Acta Biomaterialia* [online]. 2016, **35**, 1–11 [cit. 2020-04-06]. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2016.02.031

- [21] SHERJE, A. P., M. JADHAV, B. R. DRAVYAKAR a D. KADAM. Dendrimers: A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, **548**(1), 707–720. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.07.030
- [22] KIM, K. T., J. Y. LEE, D. D. KIM, I. S. YOON a H. J. CHO. Recent progress in the Development of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy. *Pharmaceutics* [online]. 2019, **11**(6), 280. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11060280
- [23] KAMALY, N., Z. XIAO, P. M. VALENCIA, A. F. RADOVIC-MORENO a O. C. FAROKHZAD. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews* [online]. 2012, **41**(7), 2971–3010. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/c2cs15344k
- [24] WANG, Y., P. LI, T. TRUONG-DINH TRAN, J. ZHANG a L. KONG. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials* [online]. 2016, **6**(2), 26. [cit. 2020-04-24]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano6020026
- [25] MURAKAMI, H., M. KOBAYASHI, H. TAKEUCHI a Y. KAWASHIMA. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1999, **187**(2), 143–152. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(99)00187-8
- [26] ALSHAMSAN, A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2014, **22**(3), 219–222. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1319-0164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2013.12.002
- [27] TORRES-FLORES, G., G. T. NAZENDE a T. A. EMRE. Preparation of Fenofibrate loaded Eudragit L100 nanoparticles by nanoprecipitation method. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2019, **13**, 428–435. [cit. 2020-04-06]. ISSN 2214-7853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2019.03.176
- [28] SALATIN, S., J. BARAR, M. BARZEGAR-JALALI, K. ADIBKIA, F. KIAFAR a M. JELVEHGARI. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, **12**(1), 1–14. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1735-9414. Dostupné z: doi:10.4103/1735-5362.199041
- [29] KAMALY, N., B. YAMEEN, J. WU a O. C. FAROKHZAD. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews* [online]. 2016, **116**(4), 2602–2663. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346
- [30] ŠNEJDROVÁ, E. a M. DITTRICH. Poly(α -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické listy*. 2011, **105**(1), 27–33. ISSN 0009-2770.

- [31] Procaine. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Database* [online]. 2020 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Procaine>
- [32] Curcumin. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Database* [online]. 2020 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>
- [33] Curcumin. *DrugBank* [online]. 2020 [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11672>
- [34] PANYAM, J. a V. LABHASETWAR. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2003, **55**(3), 329–347. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: [doi:10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4)
- [35] SALAHPOUR A., F. Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures and Nano-Objects* [online]. 2019, **19**, 100370. [cit. 2020-04-06]. ISSN 2352-507X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.nanoso.2019.100370](https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100370)
- [36] BERGER, M. *How to characterize nanoparticles* [online]. 2019 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=52930.php>
- [37] STEFANIAK, A. B. *Principal Metrics and Instrumentation for Characterization of Engineered Nanomaterials* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017 [cit. 2020-05-09]. ISBN 9783527800308. Dostupné z: [doi:10.1002/9783527800308.ch8](https://doi.org/10.1002/9783527800308.ch8)
- [38] Scanning Electron Microscopy. *Nanoscience Instruments* [online]. 2020 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>
- [39] ANDERSON, H. Transmission Electron Microscope - Uses, Advantages and Disadvantages. *MicroscopeMaster* [online]. 2019 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://www.microscopemaster.com/transmission-electron-microscope.html>
- [40] KARLÍK, M. Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů. *Československý časopis pro fyziku*. 2005, **55**, 457–464. ISSN 1804-8536.
- [41] *Elektronová mikroskopie* [online]. [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: http://jointlab.upol.cz/soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html
- [42] ARYAL, S. Mass Spectrometry (MS)- Principle, Working, Instrumentation, Steps, Applications. *Microbiology Notes* [online]. 2018 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/mass-spectrometry-ms-principle-working-instrumentation-steps-applications/>
- [43] RAMALINGA, U., J. D. CLOGSTON, A. K. PATRI a J. T. SIMPSON. Characterization of Nanoparticles by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Methods in molecular biology* [online]. 2011, **697**, 53–61. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-60327-198-1_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_5)
- [44] MALDI–TOF MS. *VŠCHT PRAHA MINIATLAS VAD* [online]. 2016 [cit. 2020-

- 04-06]. Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/maldi-tof-ms/>
- [45] Zetasizer Nano User Manual. *Malvern Instruments* [online]. 2013 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: [https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.pdf](https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern_Zetasizer_ZS_DLS_user_manual.pdf)
- [46] SNEJDROVA, E., S. PODZIMEK, J. MARTISKA, O. HOLAS a M. DITTRICH. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2020, **70**(1), 63–75. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1846-9558. Dostupné z: doi:10.2478/acph-2020-0011
- [47] EL-SAY, K. M. Maximizing the encapsulation efficiency and the bioavailability of controlled-release cetirizine microspheres using Draper-Lin small composite design. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 2016, **10**, 825–839. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S101900
- [48] DITTRICH, M. a E. SNEJDROVA. Cyclic swelling as a phenomenon inherent to biodegradable polyesters. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, **103**(11), 3560–3566. [cit. 2020-04-06]. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.24146
- [49] MÜLLER, R. H., M. RADTKE a S. A. WISSING. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2002, **54**, 131–155. [cit. 2020-04-06]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(02)00118-7