

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Polymerní nanočástice s rifampicinem

Diplomová práce

Hradec Králové 2020

Karolína Hamplová

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

V Hradci Králové 15. 5. 2020

Karolína Hamplová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. a Mgr. Juraji Martiškovi za odborné vedení, trpělivost, čas věnovaný konzultacím a rady poskytnuté při finalizaci této práce. Poděkování za spolupráci patří Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. z katedry fyziky Přírodovědecké fakulty UHK a Elišce Macákové, diplomantce katedry farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří byli pro mne velkou oporou po čas celého studia.

1 OBSAH

1	Obsah	4
2	Abstrakt.....	6
3	Abstract.....	7
4	Zadání	8
5	Úvod.....	9
6	Seznam zkratek	10
7	Teoretická část	12
7.1	Enkapsulace léčivých látek do nanočástic	12
7.2	Stabilita nanočástic.....	13
7.2.1	Fyzikální stabilita.....	13
7.2.2	Chemická stabilita.....	14
7.3	Lyofilizace nanočástic.....	15
7.3.1	Proces lyofilizace	16
7.3.2	Funkce kryoprotektantů a lyoprotektantů	17
7.4	Hodnocení lyofilizovaných nanočástic	20
7.4.1	Mikroskopické hodnocení.....	20
7.4.2	Termická analýza	23
7.4.3	Doba redispergace.....	23
7.4.4	Zeta potenciál.....	24
7.5	Nanočástice s rifampicinem	24
7.5.1	Rifampicin	24
7.5.2	PLGA	27
7.5.3	Dimethylsulfoxid	28
7.5.4	Poloxamer 407	29
7.5.5	Didodecyldimethylammonium bromide	31
8	Experimentální část.....	33
8.1	Přístroje	33
8.2	Pomůcky.....	33

8.3	Chemické sloučeniny	34
8.4	Příprava nanočástic	35
8.4.1	Příprava vnitřní fáze.....	35
8.4.2	Příprava vnější fáze.....	35
8.4.3	Nanoprecipitace	35
8.5	Měření velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu.....	36
8.6	Kalibrační přímka.....	36
8.7	Stanovení enkapsulační účinnosti	38
8.8	Disoluce rifampicinu z nanočástic	38
8.9	Příprava nanočástic pro SEM a lyofilizaci.....	40
9	Výsledky	41
9.1	Velikost nanočástic, zeta potenciál, polydisperzita.....	41
9.2	Enkapsulační účinnost a množství léčiva v nanočásticích.....	46
9.3	Liberace rifampicinu z nanočástic	48
9.4	Charakteristiky rekonstituovaných lyofilizátů	49
10	Diskuze	51
10.1	Vliv formulačních faktorů na velikost a polydisperzitu nanočástic	52
10.2	Vliv formulačních faktorů na zeta potenciál nanočástic	55
10.3	SEM nanočástic s rifampicinem.....	57
10.4	Enkapsulační účinnost a množství léčiva v nanočásticích	58
10.5	Liberace rifampicinu z nanočástic.....	61
10.6	Charakteristiky rekonstituovaných lyofilizátů	63
11	Závěry	66
12	Literatura.....	68

2 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autorka: Karolína Hamplová

Název práce: Polymerní nanočástice s rifampicinem

Školitelka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Cílem práce bylo připravit nanočástice (NP) s rifampicinem nanoprecipitační metodou za využití polyesterů kyseliny mléčné a glykolové lineární nebo větvené struktury. NP byly charakterizovány velikostí, polydisperzitou, zeta potenciálem a skenovací elektronovou mikroskopií. Byla stanovena enkapsulační účinnosti (EE), kapacita polymeru pro léčivo (LC) a disoluční profil rifampicinu. NP byly stabilizovány lyofilizací, byla testována účinnost kryoprotektiv a charakterizovány NP po rekonstituci. Velikost nanočástic lze modifikovat celou řadou formulačních faktorů, ale zásadní vliv má koncentrace polymeru ve vnitřní fázi a molární hmotnost polymeru. Překvapivě perspektivní pro formulaci nanočástic s rifampicinem nanoprecipitační metodou se ukázal polymer PLGA 70:30. Pro sterickou stabilizaci nanočástic se za daných formulačních podmínek ukázal jako nejúčinnější 0,5% roztok poloxameru, pro elektrostatickou stabilizaci 0,01% roztok didodecyldimethylamonium bromidu. Skenovací elektronová mikroskopie prokázala sférický tvar nanočástic. Softwarově stanovená velikost NP potvrdila výsledky získané metodou dynamického rozptylu světla. Doba liberace rifampicinu z polyesterových nanočástic byla 7 dnů. Po pětihodinovém burst efektu ve výši 25 % probíhala liberace do šestého dne lineární kinetikou.

Klíčová slova: rifampicin, polymerní nanočástice, PLGA, zeta potenciál, polydisperzita, enkapsulační účinnost, SEM, lyofilizace, kryoprotektiva.

3 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Karolína Hamplová
Title of thesis: Polymer nanoparticles with rifampicin
Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

The aim of the work was to formulate nanoparticles (NPs) with rifampicin by nanoprecipitation using polyesters of lactic acid and glycolic acid of linear or branched architecture. NPs were characterized by size, polydispersity, zeta potential, and scanning electron microscopy (SEM).

Encapsulation efficacy (EE), loading capacity (LC), and dissolution profile of rifampicin were determined. NPs were stabilized by lyophilization, the effectiveness of cryoprotectants was tested and NPs were characterized after reconstitution. Although the size of the NP can be modified by a number of formulation factors, the concentration of the polymer in the internal phase and the molar weight of the polymer play a crucial role. Surprisingly promising for the formulation of nanoparticles with rifampicin by the nanoprecipitation method was the polymer PLGA 70:30. A 0.5% poloxamer solution was the most effective for steric stabilization of nanoparticles under given formulation conditions, and a 0.01% solution of didodecyldimethylammonium bromide was the most effective for electrostatic stabilization. SEM demonstrated the spherical shape of the nanoparticles and the software-determined size of the NPs confirmed the results obtained by the dynamic light scattering method. The time of rifampicin release from polyester nanoparticles was 7 days. After a five-hour burst effect of 25 %, liberation was performed by linear kinetics until day 6.

Key words: rifampicin, polymer nanoparticles, PLGA, zeta potential, polydispersity, encapsulation efficiency, SEM, lyophilization, cryoprotectants.

4 ZADÁNÍ

Zadáním diplomové práce byla příprava nanočástic s rifampicinem, jejich charakterizace, stanovení enkapsulační účinnosti, množství léčiva v nanočásticích a studium liberace rifampicinu.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Příprava nanočástic enkapsulovaných rifampicinem za použití polyesterů kyseliny mléčné a glykolové lineární nebo větvené struktury.
2. Charakterizace nanočástic (velikost, zeta potenciál, polydisperzita).
3. Stanovení enkapsulační účinnosti a množství rifampicinu v nanočásticích.
4. Příprava nanosuspenzí pro mikroskopické hodnocení nanočástic s rifampicinem.
5. Testování kryoprotektantů pro stabilizaci nanosuspenze lyofilizací a charakterizace nanočástic po redispergaci.
6. Disoluce rifampicinu z nanočástic.

5 ÚVOD

Tuberkulóza (TBC) je stále jednou z hlavních příčin úmrtí dospělých a dětí na celém světě. Je způsobena *Mycobacterium tuberculosis*, bakterií, která většinou infikuje plíce, ale může postihnout rovněž slezinu, mozek, ledviny a další orgány v celém těle. I když účinná farmakoterapie tuberkulózy existuje, vážné vedlejší účinky a vysoké dávky léčiv značně zatěžují organismus. Lékem první volby je rifampicin, a to díky své jedinečné schopnosti rychle zabít bakterie TBC. Léčba je však komplikována nízkou a variabilní biologickou dostupností rifampicinu, krátkým biologickým poločasem a vyvolanou těžkou hepatotoxicitou. Jedním z cílů léčby TBC je proto formulace biokompatibilního, biodegradovatelného terapeutického systému, který zajistí cílenou distribuci a řízené uvolňování inkorporovaných léčiv. Takovým systémem mohou být dostatečně stabilní PLGA nanočástice s inkorporovaným rifampicinem vhodných vlastností, zejména s optimální velikostí a s dostatečnou kapacitou pro léčivo.

V předložené diplomové práci byly nanoprecipitační metodou připraveny nanočástice s rifampicinem. Použity byly lineární PLGA s nižší molární hmotností nebo větvenou strukturou, syntetizované na Katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK. Byl studován vliv formulačních faktorů na charakteristiky nanočástic. Experiment tematicky navazuje na řadu kvalifikačních prací, realizovaných na zmíněném pracovišti, metodicky pak zejména na diplomové práce Balciarové¹ a Maška.² Nově se předložená práce zabývá disolucí rifampicinu z nanočástic, stabilizací nanočástic lyofilizací a použitím kryoprotektiv, charakterizací rekonstituovaných lyofilizátů a charakterizací morfologie nanočástic skenovací elektronovou mikroskopií.

6 SEZNAM ZKRATEK

$[\eta]_w$	vnitřní viskozita (mL/g)
ACN	acetonitril
AFM	mikroskopie atomárních sil
API	active pharmaceutical ingredient (léčivá látka, aktivní složka, účinná látka, léčivo, účinná farmaceutická složka)
DAR	25-desacetyltrifampicin
DDAB	didodecyldimethylamonium bromid
DMSO	dimethylsulfoxid
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
EE	encapsulation efficiency (enkapsulační účinnost)
ESCA	(foto)elektronové spektroskopie pro chemickou analýzu
ESEM	enviromentální rastrovací elektronová mikroskopie
F127	Pluronic [®] F-127 (BASF), poloxamer 407 (ČL 2017)
g'	stupeň větvení PLGA
GA	kyseliny glykolová
LA	kyselina mléčná
LC	loading capacity (množství léčiva v nanočásticích; kapacita polymeru pro léčivo)
M_n	číselně střední molární hmotnost (g/mol)
MPEO	monomethoxy poly(ethylenoxid)
M_w	hmotnostně střední molární hmotnost (g/mol)
NP	nanočástice
PBS	phosphate buffered saline - fosfátový pufr
PCL	poly(ϵ -kapronolakton)
PDI	polydispersity index (index polydisperzity)
PEG	polyethylenglykol
PLA	poly(D,L-laktid)
PLA-PEO	poly(D,L-laktid)- <i>ko</i> -ethylenoxid
PLGA	poly(D,L-laktid)- <i>ko</i> -glykolid)
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidin
RIFA	rifampicin

RQU	rifampicin chinon
RSV	3-fyromylrifamicyn SV
SEM	rastrovací (skenovací) elektronová mikroskopie
SLNs	pevné lipidické nanočástice
T	tripentaerythritol
T_c	teplota kolapsu (°C)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
T_g	teplota skelného přechodu (°C)
ZP	zeta potenciál

7 TEORETICKÁ ČÁST

7.1 Enkapsulace léčivých látek do nanočástic

Enkapsulace je technologická metoda, při které jsou léčivé látky (API) v pevné, tekuté nebo plynné formě inkorporovány do polymeru, obaleny polymerním filmem, případně adsorbovány na povrch polymeru za vzniku částic řádově o velikosti mikrometrů nebo nanometrů. Důvodů pro enkapsulaci je celá řada, zejména stabilizace léčivých látek, pasivní nebo aktivní cílení do určitého místa v organismu, modifikace liberace enkapsulovaného léčiva aj.^{3,4}

Technologie výroby nanočástic (NP) lze rozdělit na metody *top-down*, při kterých mechanickým způsobem (např. mletím, vysokotlakou homogenizací) dochází k redukci velikosti tuhých částic na úroveň nanometrů. Dále na metody *bottom-up*, při kterých po dostatečném přesycení roztoku dochází ke vzniku drobných pevných částic z kapalné fáze.⁵ V literatuře jsou *bottom-up* metody prezentované jako vhodné a validované pro průmyslové použití, značný problém však představuje tendence k vyšší polydisperzitě a neefektivita pro přípravu nanočástic menších než 50 nm. *Bottom-up* metody umožňují řízenou přípravu částic požadovaných rozměrů díky relativně snadno ovlivnitelným formulačním faktorům. Efektivita metody *bottom-up* je výrazně ovlivněna hydrofilitou, resp. lipofilitou enkapsulované látky.⁶

Jednou z prvních metod vyvinutých pro enkapsulaci léčiv byla nanoprecipitační metoda patentována *Fessi et al.* Principem metody je depozice polymerního nosiče na mezipovrchovém rozhraní při přechodu rozpouštědla z vnitřní organické fáze do vnější vodné fáze. Metoda je relativně jednoduchá a původně byla vyvinuta pro enkapsulaci hydrofobních léčivých látek.⁷ Původní koncept nanoprecipitační metody prošel vývojem a doznal celou řadu modifikací.⁸

Při nanoprecipitační metodě se polymerní nosič a léčivo rozpustí v organickém rozpouštědle, které je mísitelné s vodou (methanol, ethanol, aceton, dimethylsulfoxid, dichlormethan). Následně se tento roztok přidá do vodné fáze. Nastane rychlá spontánní difúze organického rozpouštědla do vodné fáze. Tím, jak se změní podmínky pro rozpuštění polymeru a léčiva, dochází k okamžité precipitaci za vzniku nanočástic. Do vodné fáze se často přidávají tenzidy, i když pro samotnou tvorbu nanočástic to není nezbytné. Pokud zůstanou zachovány podmínky pro rozpustnost polymeru a léčiva a podmínka mísitelnosti fází, mohou být organická i vodná fáze tvořeny směsí

rozpouštědel. Kvalita finálního produktu je dána formulačními faktory přípravy, a to zejména vlastnostmi a koncentrací polymeru, poměrem organické a vodné fáze, způsobem smísení fází („*one pot*“ nebo „*drop-wise*“) nebo rychlostí míchání.⁹

7.2 Stabilita nanočástic

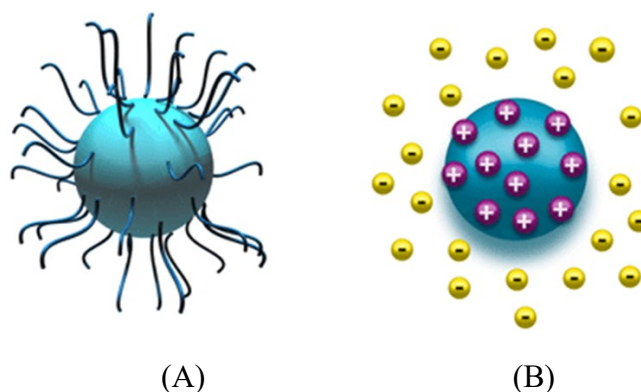
Ve vodném médiu dochází k projevům nestability nanočástic. Fyzikální nestabilita se projevuje zejména agregací a fúzí částic, chemická nestabilita degradací polymeru nebo únikem léčiva z nanočástic.¹⁰

7.2.1 Fyzikální stabilita

V kapalném médiu vykazují nanočástice Brownův pohyb. Difundují z oblasti vyšší koncentrace do oblastí s nižší koncentrací do doby, dokud se koncentrace nevyrovnejí. Brownův pohyb působí proti gravitačním silám, které způsobují sedimentaci nanočástic. Teoreticky není pro tvorbu stabilní nanosuspenze precipitační metodou použití stabilizátorů nutné, přesto se v praxi stabilizátory používají.

Stabilizace může být stérická, elektrostatická (Obr. 1), nebo se využívá obou mechanismů současně. Polymery bez ionogenních skupin mohou stabilizovat NP pouze stéricky. Polyelektrolyty stabilizují NP jak stéricky, tak elektrostaticky. Elektrostatická stabilizace je založena na přítomnosti kyselých a bazických ionogenních skupin. Pokud jsou disociovány, vytváří elektrostatické pole indukující repulsi nanočástic, a tím se zamezí agregaci. Možnost stabilizace oběma zmíněnými mechanismy představuje hlavní výhodu použití polyelektrolytů jako stabilizátorů. Přidání další složky do stabilizované nanosuspenze může vést k destabilizaci z důvodu přemístění části sférické vrstvy stabilizujícího surfaktantu. Tento proces byl zaznamenán např. u PLA nanočástic s inkorporovaným a povrchově adsorbovaným nifedipinem.¹¹

Obr.1: Schéma stérické (A) a elektrostatické (B) stabilizace nanočástic ¹²



Polyvinylalkohol (PVA) byl použit jako stabilizátor při přípravě nanočástic griseofulvinu metodou interakce mezi rozpouštědlem a antisolventem.¹³ Bylo zjištěno, že určité množství PVA zůstává adsorbováno na povrchu nanočástic i po opakovaném promývání nanosuspenze. Takto povrchově modifikované částice se vyhýbají mononukleárnímu fagocytárnímu systému a doba cirkulace v krvi je delší.¹⁴

V experimentu byly nanoprecipitační metodou připraveny PLGA nanočástice s inkorporovaným resveratolem a quercetinem. Jako stabilizátory byly použity D- α -tokoferyl polyethylen glykol sukcinát a folát-modifikovaný distearoylfosfatidyl etanolamin-polyethylen glykol. Modelovými léčivými látkami byly resveratrol a quercetin.¹⁵ PLGA s různým poměrem glykolidu a laktidu byly použity pro formulaci nanočástic s inzulínem. K rozpuštění PLGA byl použit dichloromethan a ve funkci stabilizátorů byly použity tři různé povrchově aktivní látky (PVA, poloxamer a polysorbát 80) v koncentraci 1 % nebo 2 %.¹⁶ Chitosanové nanočástice byly připraveny iontovou gelací pomocí tripolyfosfátu jako zesilujícího činidla. K připravené nanosuspenzi byla přidána kyselina hyaluronová a alginát sodný.¹⁷

7.2.2 Chemická stabilita

Chemická stabilita polymerních nanočástic závisí zejména na typu a molární hmotnosti polymerního nosiče, na teplotě, na pH média. Nanočástice tvořené hydrolyticky degradovatelnými polymery degradují ve vodném prostředí i při nízké teplotě a řízené hodnotě pH. Stabilita polyesterových nanočástic roste v pořadí PLGA50:50 \rightarrow PLGA75:25 \rightarrow PLA/PCL50:50.¹⁸

Zásadní vliv na dlouhodobou stabilitu nanočástic má teplota skladování. Polyesterové nanočástice uchovávané 350 dní při 4 °C vykazovaly pouze malé změny v molární

hmotnosti polymeru i velikosti nanočástic. Při 25 °C byly detekovány změny v molární hmotnosti polymeru již po 4 měsících, při 37 °C byla degradace polyesterů rychlá. Pro zachování požadovaných vlastností je doporučeno skladovat nanočástic tvořené deriváty PLGA při 4 °C.¹⁹ Přítomnost aniontových povrchově aktivních látek v disperzi způsobuje rychlejší degradaci PLA nanočástic. V kyselém prostředí dochází k náhodnému štěpení polymerního řetězce uvnitř náhodného klubka, což vede k tvorbě nerozpustných oligomerů a nízké produkci volných karboxylových skupin. Naopak v zásaditém prostředí převládá náhodné štěpení esterové vazby na konci polymerních řetězců a tvorbě rozpustných derivátů.²⁰

Při studiu stability polymerních nanočástic je důležité analyzovat nejen velikost částic a molární hmotnost polymeru, ale také eventuální únik léčiva z nosiče během skladování. Důležitou roli v tom hraje chemická stabilita léčiv inkorporovaných v nanočásticích. Pokud léčivo ve vodném prostředí degraduje, doba kontaktu nanočástic s vodou ovlivní množství léčiva inkorporovaného v nanočásticích. Řada cytotoxických léčiv je citlivá na světlo. Inkorporací do nanočástic je eliminována světlem indukovaná degradace.²¹ Během enkapsulace hydrofobního léčiva dochází ve vodné fázi k jeho precipitaci a tvorbě nanokrystalů, které jsou mohou být chybně interpretovány jako nanočástice. Při skladování může dojít k růstu nanokrystalů.²²

7.3 Lyofilizace nanočástic

Nejčastěji používaná metoda, která umožňuje převést nanosuspenzi do pevného skupenství, je lyofilizace.²³ Lyofilizace neboli sušení mrazem je proces relativně pomalý, energeticky a ekonomicky náročný, ale široce používaný pro sušení, formulaci tuhých částic, stabilizaci různých farmaceutických produktů jako vakcín, proteinů, peptidů, koloidních nosičů, lipozomů, nanočástic, nanoemulzí. Lyofilizace spočívá v odstranění vody ze zmrzlého materiálu sublimací s následnou desorpcí vody v podmínkách vakua. Tento proces generuje během jednotlivých kroků řadu stresových faktorů. Proto se k nanosuspenzi přidávají látky, které je před těmito faktory chrání.²⁴

Mezi základní požadavky na lyofilizáty patří:²⁵

- rychlá rekonstituce (redispergace)
- zachování fyzikálně-chemických vlastností
- obsah zbytkové vlhkosti nižší než 2 %
- dlouhodobá stabilita lyofilizovaného produktu

7.3.1 Proces lyofilizace

Proces lyofilizace probíhá ve třech fázích: zmrazení, primární sušení a sekundární sušení.²⁶ V první fázi se vlhký materiál zmrazí pod teplotu, při které nemůže existovat v kapalném skupenství. Při tuhnutí vody může dojít k mikroskopickému poškození materiálu. Proto je nutné tuto fázi provádět velmi opatrně. Obvykle se materiál zmrazí na teplotu mezi -20 °C a -50 °C. Během zmrazení se formují krystaly ledu a zvyšuje se koncentrace suspenze. Rostoucí viskozita suspenze způsobí inhibici další krystalizace. Malé procento vody zůstává ve viskózní kapalině v nezmrzlé formě jako vázaná voda.²⁴ V momentu krystalizace ledu dochází k mechanickému stresu, který vede k destabilizaci nanočástic. Důležitá je rychlost mrazení. Obecně pomalé mrazení vytváří velké nejednotné ledové krystaly, zatímco rychlé mrazení tvoří malé ledové krystaly, které tvoří rozsáhlou ledovou plochu.

V průběhu druhé fáze lyofilizace, primárního sušení, je udržován v lyofilizátoru tlak nižší, než je tlak vodní páry v trojném bodu (610,5 Pa). Vedením nebo zářením, prouděním se prakticky neuplatňuje, je dodáno tolik tepla, aby led mohl začít sublimovat. Takto se z materiálu odstraní asi 95 % vody. Při sublimaci nesmí dojít k narušení sušeného materiálu. Teplota během primárního sušení musí být pod teplotou kolapsu (T_c) vzorku. Primární sublimace je nejdelší fáze v procesu lyofilizace. Určení konce primárního sušení je zásadní pro pochopení celého procesu sušení a pro kvalitu výsledného produktu.²⁷

Sekundární sušení zahrnuje odstranění vázané vody, které se drží na povrchu pevných látek díky adsorpci. Jedná se o vodu, která se neoddelila jako led během zmrazení a nesublimovala. Teplota v sušící komoře se zvýší, někdy až nad 0 °C, což naruší vazby mezi vodou a pevným materiálem. Tlak se obvykle ještě více sníží, až na zlomky Pascalu. Délku sekundárního sušení určuje požadavek na zbytkový obsah vlhkosti produktu. Po sekundárním sušení v materiálu zůstává okolo 1 až 4 % vody. Vysoký obsah zbytkové vlhkosti by mohl způsobit krystalizaci kryoprotektantů během skladování, a tím destabilizaci nanočástice.²⁴

7.3.2 *Funkce kryoprotektantů a lyoprotektantů*

Lyofilizace může vyvolat mnoho stresových faktorů negativně ovlivňujících stabilitu nanočástic. Během zmrazení dochází v lyofilizovaném materiálu k fázové separaci na led a koncentrovaný roztok. Koncentrovaná fáze se skládá z nanočástic a dalších složek přípravku jako jsou povrchově aktivní látky, pufrů a neenkapsulované léčivo. Tato vysoká koncentrace částicového systému může vyvolat agregaci a v některých případech nevratnou fúzi nanočástic. Krystalizace ledu může mechanicky působit na nanočástice a vést k jejich destrukci.

Z těchto důvodů se k suspenzi nanočástic před začátkem lyofilizace přidávají pomocné látky, které chrání produkt v průběhu fáze mrazení (kryoprotektanty) nebo v průběhu sušení (lyoprotektanty). Tyto látky zvyšují stabilitu nanočástic, brání agregaci a usnadňují rekonstrukci lyofilizátu. Kryoprotektanty chrání produkt před mechanickým působením ledových krystalů. V průběhu lyofilizace je sublimací odstraněna voda ve formě ledu, nezmrzlá voda zůstává adsorbovaná na pevné fázi a může destabilizovat nechráněné nanočástice. Tomu mohou zabránit pomocné látky sloužící jako lyoprotektanty. Předpokládá se že, mechanismus jejich účinku spočívá v tvorbě vodíkových vazeb mezi lyoprotektantem a polární skupinou na povrchu nanočástic. Krystalizace lyoprotektantu může tvorbu vodíkových vazeb omezit.²⁴ Lyoprotektanty nemusí účinně stabilizovat nanočástice během zmrazení, stejně tak kryoprotektanty nemusí stabilizovat nanočástice během sušení. V případě, že stabilizátor neplní zároveň funkci lyoprotektantu a kryoprotektantu, je nutné při lyofilizaci použít dva stabilizátory.²³

Ve funkci kryoprotektiv a lyoprotektiv se využívají tyto pomocné látky:

- sacharidy
- glycin: účinný kryoprotektant, ale nevykazuje lyoprotektivní účinky, využívá se především v kombinaci se sacharidy
- polymery: polyvinylpyrrolidon, albuminu z hovězího séra (BSA)
- glycerol
- tenzidy: PEG, PEI, polyethylenglycollaurylether, polysorbát 80
- soli: KCl, NaCl, MgSO₄, Na₂SO₄, CH₃COONa

Jedny z nejúčinnějších stabilizátorů, které většinou plní funkci kryoprotektiva i lyoprotektiva, jsou obecně sacharidy: glukosa, trehalosa, sacharosa, maltosa, laktosa, mannitol, inositol, hydroxypropyl-P-cyklodextrin, polyethylenglykol. Používají se jak samostatně, tak v kombinaci, např. komplex glukosa/mannitol, glukosa/PEG.²⁸ Trehalosa má ve srovnání s ostatními cukry řadu výhod jako je menší hydroskopičnost, flexibilnější tvorba vodíkových vazeb s nanočásticemi během lyofilizace, nízká chemická reaktivita, vyšší teplota skelného přechodu (T_g).²⁹

Sacharidy mají významný vliv i na stabilitu lyofilizovaných nanočástic během dlouhodobého skladování. Jejich stabilizační účinek závisí především na jejich koncentraci.³⁰ Se zvyšující se koncentrací sacharidů stabilita nanočástic roste³¹, ale mohou mít i destabilizační vliv. Při vyšší koncentraci mohou ztratit účinnost vlivem vysrážení nebo krystalizace při zmrazení.³²

Mechanismu stabilizace nanočástic kryoprotektanty během kroku zmrazení může být vysvětlen hypotézou o izolaci částic. Cukry izolují jednotlivé částice v nezmrzlé frakci, čímž zabrání agregaci během zmrazování.³³ Účinnost některých kryoprotektantů je závislá na způsobu zmrazení. Nebyly zjištěny významné rozdíly ve velikosti PCL nanočástic připravených s kryoprotektivem a bez kryoprotektiva při rychlém zmrazení. PCL nanočástice mohou být lyofilizovány bez kryoprotektantu jen pokud je stabilizátor, v této studii PVA v koncentraci 5 %, použit v dostatečné koncentraci. Pokud se PVA nepoužije, přídavek kryoprotektantu je nezbytný. Typ použitého kryoprotektantu měl prakticky zanedbatelné účinky na velikost a rehydrataci lyofilizovaných nanočástic.³⁴

Pro stabilizaci nanočástic s monensinem byl použit mannitol v koncentraci 2,4 %. Při rychlém zmrazení nanosuspenze byla zjištěna menší změna velikosti nanočástic po lyofilizaci (26,1 %) než při pomalém zmrazování (57,3 %).³⁵ Pokud je k suspenzi nanočástic přidána trehalosa, různý způsob zmrazení nemá na velikost nanočástic vliv. Rozdíl v účinku těchto kryoprotektantů na změnu velikosti nanočástic po lyofilizaci může být vysvětlen schopností mannitolu při pomalém zmrazení krystalizovat. Naopak rychlé zmrazení může produkovat více amorfního mannitolu, který je schopen nanočástice lépe chránit.

Nanoprecipitační metodu byly připraveny PLGA nanočástice s inkorporovaným resveratrolem a quercetinem. Byly testovány čtyři kryoprotektanty: mannitol, trehalosa, laktosa a sacharosa v koncentracích 1 %, 3 %, 5 %, 7 %, 10 %. Výsledné lyofilizáty byly redispergovány přidáním 10 ml destilované vody.¹⁵ Byly hodnoceny účinky pěti kryoprotektantů na stabilitu PLGA nanočástic s inkorporovaným inzulínem. Použité

kryoprotektanty byly trehalosa, sacharosa, fruktosa, glukosa a sorbitol v koncentraci 10 %.¹⁶ Chitosanové nanočástice byly připraveny iontovou gelací pomocí tripolyfosfátu jako zesilujícího činidla. K připravené nanosuspenzi byla přidána kyselina hyaluronová a alginát sodný. Jako kryoprotektanty byly použity glukosa, sacharosa, trehalosa, mannitol, PEG 2000 a PEG 10 000 v koncentracích 5 %, 10 %, 20 % a 50 %. Lyofilizát byl redispergován deionizovanou vodou.¹⁷

Lecitino-chitosanové nanočástice s melatoninem byly před lyofilizací stabilizovány trehalosou nebo glukosou v koncentracích 1 %, 2,5 %, 5 % a 10 %. Na redispergaci lyofilizátu byla použita deionizovaná voda. Nebyly zjištěny významné rozdíly ve velikosti částic, polydisperzitě, zeta potenciálu nebo obsahu melatoninu před lyofilizací, bezprostředně po lyofilizačním procesu a po 7 měsících skladování při 4 ° C.³⁶

Tab. 1 ukazuje některé příklady úspěšného použití kombinace polymerního nosiče, stabilizátoru a kryoprotektantu při formulaci nanočástic a jejich stabilizaci lyofilizací.

Tab. 1: Vliv stabilizátorů na změnu velikosti nanočástic ²⁵

Metoda přípravy NP	Polymer	Stabilizátor	Kryo/lyoprotektant	S ₂ /S ₁
nanoprecipitace	PCL	poloxamer	glukosa/sacharosa 10%	1,2
nanoprecipitace	PCL, PLGA	poloxamer	glukosa/sacharosa 20%	1,5
vysolování	PLA, PLA/PEO	PVA	trehalosa poměr Tr:NP 1:1; 2,5:1	1
dvojitá emulzní	MPEO/PLA	PVA	Sacharosa 0,5-8%	1
mikroemulzní	emulgující cetostearylalkohol	cetrimonium bromid	laktosa/sacharosa 1-5%	1
emulzně evaporační	PCL/dextran	cholát sodný (0,1%) poloxamer (1%) PVA (1%)	glukosa 5%	1
polymerace	poly(methyliden malonat)	dextran 1%	dextran 1%	1,07
tavení	trikaprin	polysorbát 80 vaječný fosfatidylcholin	sacharosa 5%	1,45

S₂/S₁ poměr velikosti NP po a před lyofilizací

7.4 Hodnocení lyofilizovaných nanočástic

Kritická analýza kvality lyofilizátu obecně zahrnuje makroskopické a mikroskopické hodnocení, hodnocení objemu, hodnocení doby redispergace, termickou analýzu lyofilizátu, měření velikosti redispergovaných nanočástic a stanovení polydisperzity, stanovení zeta potenciálu a množství léčivé látky v nanočásticích (*loading capacity* LC).

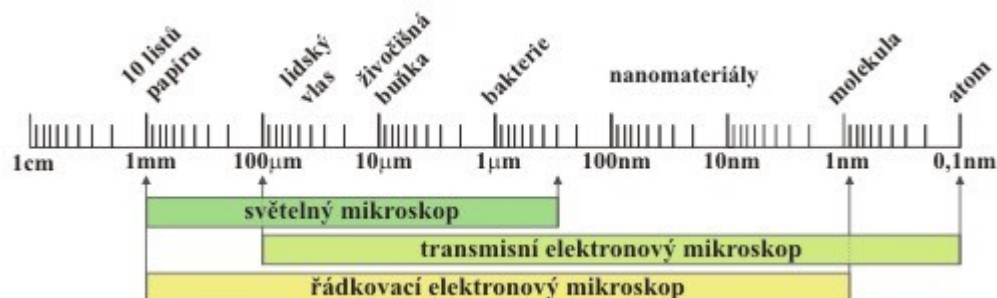
7.4.1 Mikroskopické hodnocení

Pro mikroskopické hodnocení nanočástic se používá několik technik s možností různě vysokého rozlišení:

- transmisní elektronová mikroskopie (TEM)
- kryo-transmisní elektronová mikroskopie (kryo-TEM)
- mikroskopie atomárních sil (AFM)
- rastrovací (skenovací) elektronová mikroskopie (SEM)
- enviromentální rastrovací elektronová mikroskopie (ESEM)

Elektronové mikroskopy umožňují přímý způsob pozorování mikrostruktury nanočástic. Ukazují zachování integrity nanočástic nebo různé změny v morfologii nanočástic. Jednou z hlavních charakteristik mikroskopů je mezní rozlišovací schopnost, jež je úměrná vlnové délce použitého záření. Elektronové záření s podstatně kratší vlnovou délkou ($\sim 0,01\text{--}0,001\text{ nm}$), než má viditelné světlo (400-700 nm), umožňuje dosáhnout mnohem vyššího rozlišení. Typická velikost objektů, které lze pomocí elektronových mikroskopů sledovat je znázorněna na Obr. 2.³⁷

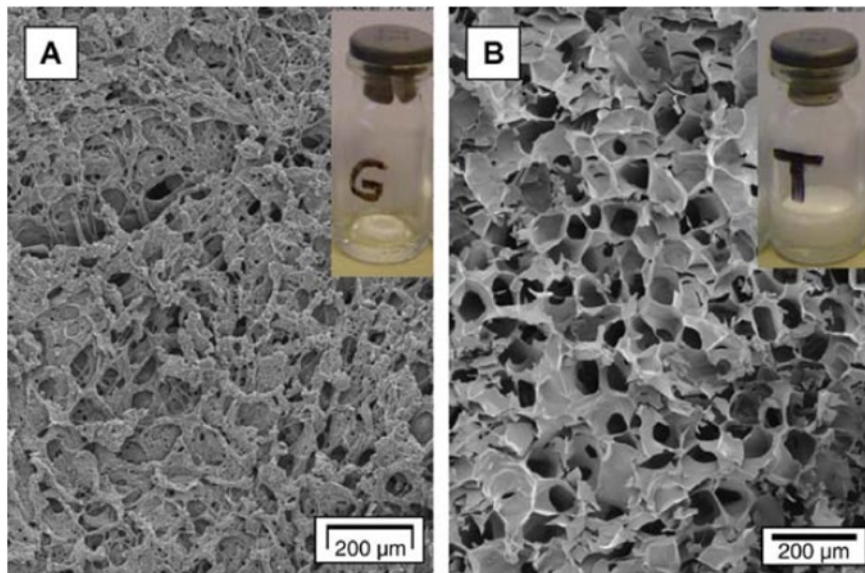
Obr. 2: Typická velikost objektů, které lze pozorovat elektronovým mikroskopem a srovnání s rozsahem světelného mikroskopu³⁷



Elektronové mikroskopy se dají zjednodušeně rozdělit do dvou kategorií, pro které se vžilo označení řádkovací elektronové mikroskopy neboli SEM (*scanning electron microscope*) a transmisní elektronové mikroskopy, označované zkratkou TEM (*transmission electron microscope*). TEM se využívají pro zobrazení a analýzu povrchů téměř libovolně velkých vzorků, je-li dostatečně velká vakuová komora pro jejich umístění. Nacházejí využití při pozorování a analýze vnitřní struktury vzorku a pro zobrazení jednotlivých atomů.³⁸ Nutnou podmínkou pro použití TEM je, že vzorek musí být dostatečně tenký (10-500 nm), aby jím svazek elektronů prošel. Zjednodušeně lze říci, že TEM vidí více než SEM, ale na úkor složitější přípravy vzorků a obtížnější interpretace získaných snímků.

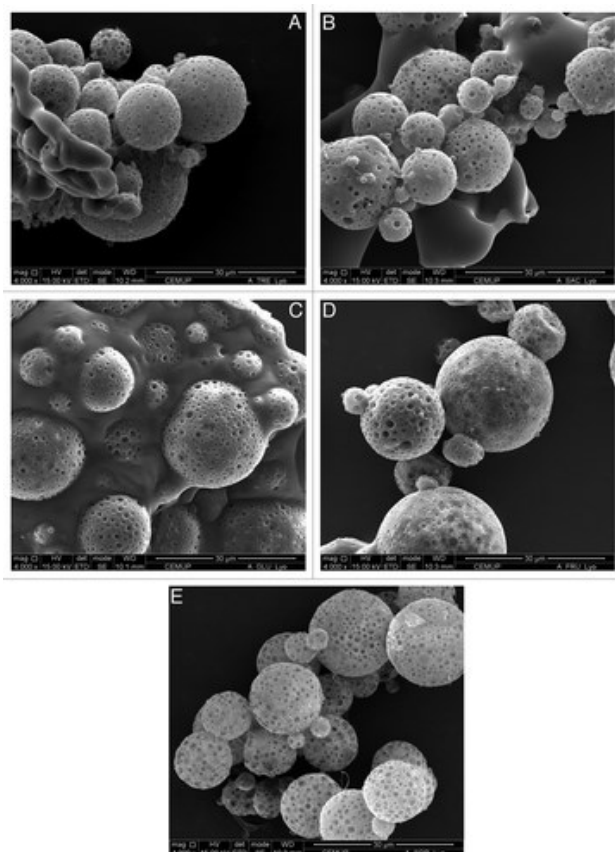
SEM byla použita k pozorování mikrostruktury lyofilizovaného PVP a sacharosy. Obr. 3A ukazuje otvory ve struktuře sacharosy, vytvořené v průběhu lyofilizace, které indukovaly kolaps sušeného produktu, zatímco PVP vytvořil při sušení intaktní plochy, které stabilizovaly strukturu lyofilizátu (Obr. 3B).²⁴

Obr. 3: Makrostruktura a mikrostruktura lyofilizátu: kolaps při stabilizaci sacharosou (A), strukturovaný lyofilizát při stabilizaci PVP (B)²⁴



PLGA nanočástice s inzulínem byly vizualizovány bezprostředně po přípravě a po lyofilizaci bez kryoprotektiv a po lyofilizaci pomocí kryoprotektantů. SEM snímky jsou uvedeny na Obr. 4.¹⁶

Obr. 4: SEM snímky PLGA nanočástic s inzulínem po lyofilizaci s kryoprotektantem:¹⁶
10% trehalosy (A); 10% sacharosy (B); 10% glukosy (C); 10% fruktosy (D); 10% sorbitolu (E)



ESEM nabízí možnost měnit hydrataci vzorku postupným snižováním tlaku a teploty v komoře. Tato technika má navíc schopnost zobrazovat hydratované systémy bez předchozí úpravy vzorku. ESEM je považována za techniku vhodnou pro pozorování lyofilizovaných nanočástic v hydratované formě. Výhodou ESEM oproti SEM je možnost pozorování koloidních částic s minimální chybou, hydratovaných vzorků v jejich nativním stavu bez nutnosti složité přípravy vzorku k měření. Metodou ESEM byly pozorovány čištěné redispergované lyofilizáty nanotobolek stabilizované cyklodextrinem.²⁴

TEM umožňuje pozorování lyofilizovaných nanočástic po zředění vzorku. Metoda byla použita k charakterizaci lyofilizovaných nanotobolek tvořených PCL s inkorporovaným itrakonazolem, stabilizovaných PVP ve funkci kryoprotektantu. Polymerní PCL vrstva

kolem hydrofobního jádra tobolky byla neporušená. Amorfni PVP film byl dobře patrný na vnějším povrchu nanočástic.³⁹

AFM byla použita pro charakterizaci kationicky modifikovaných křemičitých nanočástic lyofilizovaných s 5 % trehalosy ve funkci kryoprotektiva. Z AFM obrázku bylo zjištěno, že trehalosa tvořila matici, ve které byly nanočástice interdispergovány. Hodnocení nanočástic metodami SEM a AFM bývá obtížnější, pokud je koncentrace ochranného činidla větší než 5%.³²

7.4.2 Termická analýza

Lyofilizát musí být uchováván při nižší teplotě, než je teplota skelného přechodu jednotlivých složek, aby se zabránilo kolapsu nebo destabilizaci nanočástic v důsledku krystalizace lyoprotektantu. Teplota skelného přechodu může být stanovena diferenční skenovací kalorimetrií (DSC).

Tato technika byla použita pro studium interakce mezi lyoprotektantem a nanočásticemi. U tuhých lipidových nanotobolek poukázala na komplexaci mezi lecitinem tvořícím obal nanotobolek a trehalosou.⁴⁰ Metodou DSC lze zjistit fyzikální stavu léčivé látky v nanočásticích. Byla provedena termická analýza PLGA nanočástic s cisplatinou. Na termogramu PLGA byla detegována teplota skelného přechodu při teplotě 51 °C, ale tento přechod nebyl pozorován ve formulacích nanočástic s obsahem léčiva. Při 281 °C byl zjištěn exotermický pík samotného léčiva. Nepřítomnost tohoto píku v nanočásticích s cisplatinou naznačuje, že léčivo je molekulárně dispergováno v amorfni formě.⁴¹

7.4.3 Doba redispergace

Doba redispergace je důležitým ukazatelem kvality lyofilizátu. Optimálně se lyofilizovaný produkt rehydratuje ihned po přidání vody. Dlouhá doba rekonstrukce může značit jeho kolaps. K opětovné redispergaci lze použít několik metod jako ruční třepání, míchání, víření a sonifikaci ultrazvukem. Po redispergaci může být velikosti částic měřena fotonovou korelační spektroskopií nebo jinou vhodnou technikou. Vyjadřuje se poměr velikosti nanočástic po lyofilizaci a před lyofilizací, který by měl být v ideálním případě roven jedné. Pokud nedojde ke změně hodnoty indexu polydisperzity (PDI), byl proces lyofilizace úspěšný.²⁴

7.4.4 Zeta potenciál

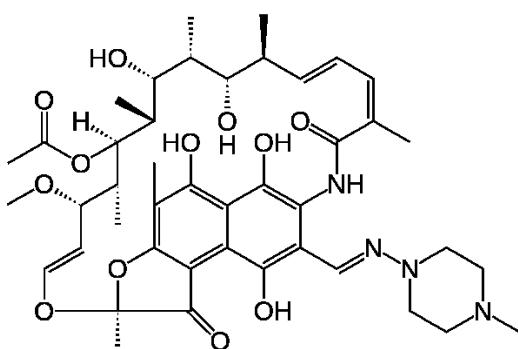
Změny povrchu nanočástic po lyofilizaci a interakce s kryoprotektivy lze detegovat měřením zeta potenciálu. U polykaprolaktonových nanočástic s enkapsulovaným itrakonazolem, stabilizovaných 10 % sacharosy ve funkci kryoprotektiva, byla zjištěna změna zeta potenciálu po lyofilizaci z -40,9 mV na -20,4 mV.⁴² Autoři to vysvětlili maskováním povrchu nanosfér v důsledku tvorby vodíkových vazeb mezi OH skupinami kryoprotektivního činidla a povrchu nanosfér. Po lyofilizaci se snížil negativní povrchový náboj, který poukazuje na přeskupení povrchově aktivních látek (poloxamer) na povrchu nanosfér, což vedlo k možné desorpci intrakonazolových molekul.¹⁶

7.5 Nanočástice s rifampicinem

V rámci experimentální části předložené diplomové práce byly připraveny nanočástice tvořené PLGA různé molární hmotnosti a konstituce s inkorporovaným rifampicinem. V průběhu nanoprecipitační metody byl použit dimethylsulfoxid jako rozpouštědlo polymerů a léčiva, poloxamer 407 a didodecyldimethylamonium bromid pro stérickou, resp. elektrostatickou stabilizaci nanočástic. Tyto složky jsou charakterizovány v následujících kapitolách.

7.5.1 Rifampicin

Obr.5: Strukturální vzorec rifampicinu⁴³



Registrační číslo CAS: 13292-46-1

Molární hmotnost: 822,94 g/mol

Bod tání: 183 °C

Vazba na bílkoviny: 80%

Sumární vzorec: C₄₃H₅₈N₄O₁₂

Rifampicin (Obr.5)⁴³ patří do skupiny ansamycinových antibiotik. Je to polosyntetický derivát, který byl uveden na trh již v roce 1952. Z chemického hlediska patří do skupiny makrocyclických laktamů. Pro rifampicin je typické oranžovo-hnědé až červeno-hnědé zbarvení díky přítomnosti konjugovaného systému dvojných vazeb aromatické části

molekuly.⁴⁴ Rifampicin má široké spektrum účinku, působí na grampozitivní i negativní bakterie, chlamydie, anaeroby a rickettsie. Brání syntéze RNA inhibicí DNA-dependentní RNA polymerasy mykobakterií.⁴⁵ Rifampicin vykazuje vysokou účinnost proti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* a *Mycobacterium leprae*. Rifampicin je induktor izoenzymu CYP3A4, ovlivňuje metabolismus léčiv, které jsou metabolizovány touto cestou.⁴⁶ Eliminační poločas je 2,5 hodiny a je vylučování ledvinami a stolicí. Rifampicin se absorbuje do 2 hodin s přibližnou plazmatickou koncentrací 10 µg/ml po standardní jednorázové dávce 600 mg. Přehled léčivých přípravků s rifampicinem uvádí Tab. 2.

Tab. 2: Léčivé přípravky s rifampicinem⁴⁷

NÁZEV	OBSAH LL	LÉKOVÁ FORMA
Rifadin	150; 300 mg	tobolky
Rifadin IV	600 mg /10 ml	prášek pro přípravu infuze
Rifampin	150; 300 mg	tobolky
	600 mg /10 ml	prášek pro přípravu infuze
Benemicin ¹⁾	150; 300 mg	tobolky
Eremflat ²⁾	300; 600 mg	prášek pro přípravu infuze
IsonaRif rifampicin/isoniazid	300/150 mg	tobolky
Rifamate rifampicin/isoniazid	300/150 mg	tobolky
Rifater rifampicin/isoniazid/pyrazinamid	120/50/300 mg	tablety

¹⁾ Registrovaný léčivý přípravek v ČR

²⁾ Specifický léčebný program povolený MZ ČR na základě SÚKL

Rifampicin je amfoterní sloučenina s pKa1 1,7 (4-hydroxylová skupina) a pKa2 7,9 (3-piperazinový dusík). Je hydrofilní (Log P 3,179) s nízkou rozpustností a vysokou permeabilitou.⁴⁸ Chemická stabilita rifampicinu a jeho rozpustnost je závislá na pH, což přispívá k jeho nízké biologické dostupnosti a špatným terapeutickým výsledkům.⁴⁹ Rifampicin existuje ve vodných roztocích jako zwitterion s isoelektrickým bodem 4,8. Při zásaditých hodnotách pH se zwitteriontové činidlo chová primárně jako kyselina, zatímco při kyselých hodnotách pH se chová jako báze. Rozpustnost rifampicinu při 37 °C v různých pufovaných médiích o různém pH uvádí Tab. 3

Je známo, že rifampicin tvoří v rozpuštěném stavu řadu degradačních produktů. Mezi dva hlavní produkty rozkladu řadíme: 3-fyromylrifamicyn SV (RSV) a rifampicin chinon (RQU) vytvořené hydrolýzou a oxidací. RSV je nerozpustný a má špatnou absorpci. Vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu *in vitro*, bohužel tuto aktivitu nevykazuje *in vivo*. RQU, který se tvoří v alkalickém prostředí za přítomnosti kyslíku, je neaktivní, ale jeho volné hydroxylové skupiny jsou nezbytné pro vazbu léčiva na bakterie. Třetí produkt rozkladu 25-desacetyl rifampicin (DAR) se tvoří v alkalickém prostředí bez přítomnosti kyslíku a je acetylován na produkty se zanedbatelnou antimikrobní aktivitou.^{50,51}

Tab. 3: Literární data rozpustnosti rifampicinu při 37 °C⁵¹

pH	Médium	Rozpustnost (mg/ml)
1,0	HCl, NaCl, H ₂ O	127,21
1,5	HCl, kyselina citrónová, NaOH, NaCl, H ₂ O	42,68
2,0		19,21
2,5		3,19
5,5	NaCl, Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O	0,64
7,0		0,85
1,4	roztok HCl	125,54
2,3		11,40
3,0	citrátový pufr	1,15
4,0		0,99
4,5		1,25
5,2	fosfátový pufr	1,53
6,0		1,65
6,8		2,54
7,4		3,35
8,0		5,44

7.5.2 PLGA

Pro přípravu nanočástic s rifampicinem nanoprecipitační metodou byly použity polyestery kyseliny mléčné a glykolové s různou konstitucí polymerního řetězce, poměrem monomerů a molární hmotností (Tab. 4). Jedná se o biodegradovatelné, biokompatibilní homopolymery nebo kopolymery odvozené od α -hydroxykyselin, kyseliny mléčné (LA) a glykolové (GA). Mají široké využití nejen v chirurgii, ortopedii, tkáňovém inženýrství a při formulaci léčivých přípravků, ale také při výrobě biodegradabilních předmětů s ekologickým akcentem.

Lineární polyestery s nižší molární hmotností a větvené polyestery estery byly syntetizovány stupňovou kopolymerací ze směsi kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné v poměru 50:50 nebo 70:30, popř. doplněné tripentaerythritolem (T) ve funkci větvičího monomeru.⁵² Označení 3T znamená, že v reakční směsi byla koncentrace tripentaerythritolu 3 %. Polyester 3T má koncové esterové skupiny, což se projeví vyšší hydrofobicitou a odolností vůči hydrolytické degradaci oproti větveným polyesterům stejné molární hmotnosti s koncovými karboxyly. Ve srovnání s lineárními polyestery s vysokou molární hmotností mají tyto struktury lepší zpracovatelnost díky nižší viskozitě v tavenině či v roztoku.⁵³ Kontinuální průběh degradace mechanismem hydrolyzy esterových vazeb významně ovlivňuje kinetiku uvolňování inkorporovaných léčivých látek. Důležitými charakteristikami je poměr LA a GA, molární hmotnost (M_w , M_n), stupeň větvení, krystalinita a teplota skelného přechodu (Tab. 4).

Resomer[®] je obchodní název pro PLGA polymery firmy Evonik. Řada RG je platforma biologicky vstřebatelných pomocných látek na bázi PLGA pro řízené uvolňování léčiv, s vlastnostmi vhodnými pro parenterální aplikaci. Jedná se o amorfní polymery s koncovými esterovými nebo karboxylovými skupinami. Standardní molární poměry LA a GA zahrnují 50:50, 65:35, 75:25 a 85:15. Doba degradace je 18 měsíců a více. Vnitřní viskozita se může pohybovat od 0,09 do 1,7 mL/g a molární hmotnost mezi 7 000 a 240 000 g/mol. Vlastnosti polymeru včetně krystalinity lze snadno modifikovat tak, aby odpovídaly specifickým požadavkům na složení a profil uvolňování.⁵⁴

Tab. 4: Charakteristiky polyesterů použitých pro přípravu nanočástic s rifampicinem

Označení	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	$[\eta]_w$ (mL/g)	$g'(M_w)$	T_g (°C)
3T	5 300	17 400	7,7	0,43	27,6
PLGA 70:30	2 500	3 300	6,5	1,0	25,7
PLGA 50:50	5 400	7 500	12,2	1,0	38,4
Resomer [®] RG 503 ⁵⁵	-	24 000 - 38 000	0,32-0,44*	1,0	42-46

M_n (g/mol) číselně střední molární hmotnost

M_w (g/mol) hmotnostní průměr vnitřní viskozity a větvicí poměr g'

$[\eta]_w$ (mL/g) vnitřní viskozita

$g'(M_w)$ větvicí poměr daný vnitřní viskozitou větveného a lineárního polymeru shodné molární hmotnosti

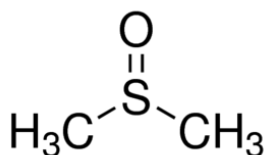
T_g (°C) teplota skelného přechodu

* viskozita 0,1 % roztoku v chloroformu (Ubbelohdeho viskozimetr)

7.5.3 Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) je nepolární protické rozpouštědlo. Je monografován v ČL (Dimethylis sulfoxidum, synonymum. Dimethylsulfoxidum). Jedná se o bezbarvou kapalinu nebo bezbarvé krystaly. DMSO je hygroskopický, mísitelný s vodou, s lihem 96% a s etherem.

Obr. 6: Dimethylsulfoxid⁵⁶



Bod varu: 189 °C

Hustota: 1,1 g/cm³

Vzorec: C₂H₆OS

Bod tání: 19 °C

Molární hmotnost: 78,13 g/mol

Identifikátor IUPAC: Dimethyl sulfoxide

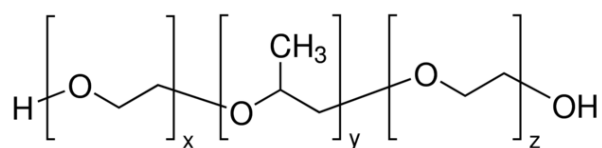
DMSO zvyšuje penetraci a permeaci hydrofilních i lipofilních léčivých látek do kůže. V praxi se používá např. roztok diklofenaku sodného k topické aplikaci, schválený v USA k léčbě osteoartrózy, nebo idoxuridinový roztok schválený v Evropě pro léčbu Herpes zoster. V literatuře je popsán mechanismus působení DMSO jako urychlovače transdermální penetrace a prezentovány studie účinnosti a bezpečnosti.^{57,58,59}

DMSO je používán při přípravě polymerních nanočástic jako organická fáze, ve které se rozpustí polymer a léčivá látka. V literatuře je popsána celá řada studií, ve kterých byl DMSO použit. Byl studován vliv použitého rozpouštědla na fyzikálně chemické vlastnosti PLGA nanočástic s norfloxacinem. Použité rozpouštědlo má vliv zejména na velikost nanočástic a obsah léčiva. Velikost PLGA nanočástic připravených z dimethylacetamidu, dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu byla menší než při použití acetonu. Enkapsulační účinnost a množství léčiva v NP byly nejnižší při použití DMSO a acetonu (7,73 % resp. 8,4 %).⁶⁰

Pevné lipidové nanočástice (SLN) s doxorubicinem byly připraveny emulzní metodou za evaporace rozpouštědla. Jako lipidové jádro byl použit glycerylkaprát a jako obal curdolan, ve vodě nerozpustný lineární beta-1,3-glukan, vysokomolekulární polymer glukosy. DMSO byl použit k rozpuštění lipidů a léčiva. Byl studován vliv formulačních faktorů na charakteristiky SLN s cílem snížit velikost nanočástic a zvýšit enkapsulační účinnost.⁶¹

7.5.4 Poloxamer 407

Obr. 7: Chemická struktura poloxameru⁶²



Poloxamery jsou syntetické neiontové blokované kopolymery ethylenoxidu a propylenoxidu obecného vzorce $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_y(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_z\text{H}$ (Obr. 7, Tab. 5). Jsou monografovány v ČL (Poloxamera, Poloxamery).⁶²

Tab. 5: Typy poloxamerů⁶²

Typ poloxameru	Oxyethylenové jednotky <i>a</i>	Oxypropylenové jednotky <i>b</i>	Obsah oxyethylenu (%)	Průměrná relativní molekulová hmotnost
124	10–15	18–23	44,8–48,6	2090–2360
188	75–85	25–30	79,9–83,7	7680–9510
237	60–68	35–40	70,5–74,3	6840–8830
338	137–146	42–47	81,4–84,9	12 700–17 400
407	95–105	54–60	71,5–74,9	9840–14 600

Polyoxyethylenový segment je hydrofilní, zatímco polyoxypropylenový segment hydrofobní. Fyzikální a povrchově aktivní vlastnosti poloxamerů se liší v širokém rozmezí a komerčně dostupná je celá řada různých typů. Poloxamery obsahují méně než 0,5 % vody a jsou hygroskopické pouze při relativní vlhkosti vyšší než 80 %. Hodnota pH 10% (w/v) vodného roztoku je 5,0 až 7,0. Mohou obsahovat vhodnou antioxidační přísadu.

Poloxamery se používají jako emulgátory v intravenózních emulzích, solubilizační a stabilizační činidla např. pro udržení transparentnosti tinktur a sirupů, jako smáčedla, základy termoreverzibilních gelů, základy mastí, čípků, při výrobě tablet jako pojiva a materiály pro potahování tablet.

Pluronic[®] je registrovaná ochranná známka společnosti BASF pro poloxamery. M_w je 12 600 g/mol. Pluronic[®] F-127 tvoří gely nad 10 ° C při použití v koncentracích 18-50 %. Po ochlazení pod 10 °C se opět zkapalní. Gely zůstávají stabilní i během sterilizace v autoklávu.

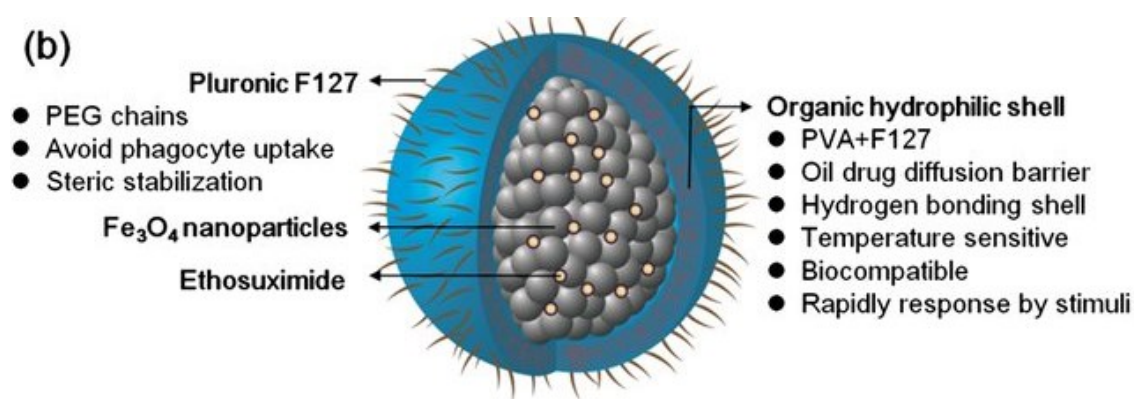
Metodou tavení byly připraveny pevné disperze tvořené poloxamerem 188 s inkorporovaným antihypertenzivem karvedilolem s cílem zvýšit jeho rozpustnost a biologickou dostupnost po perorální aplikaci. Poloxamer 188 byl roztaven při 60 ° C, bylo přidáno léčivo, disperze byla ochlazená na laboratorní teplotu a poté rozemleta a přesáta přes síto 425 μm .⁶³

Byly připraveny nanočástice s kurkuminem, ve kterých byl použit chitosan a poloxamer 407 jako nosiče pro targeting kurkuminu do rakovinných buněk.⁶⁴ Pluronic[®] F-127 byl použit pro vývoj *in situ* gelového systému pro řízené uvolňování a zlepšenou účinnost protinádorového léčiva paklitaxel, který je v termoreverzibilním gelu inkorporován ve formě lipozomů.⁶⁵ Nanočástice oxidu železa a molekuly hydrofobního léčiva byly

inkorporovány do termoreverzibilní matrice složené z poloxameru 407 a PVA za použití miniemulzního procesu. Přidání PVA významně přispělo ke stabilitě termoreverzibilní nano-nosičů PVA-F127 a snížilo únik léčiva, protože poskytuje vodíkové vazby pro reakci se segmenty PEO v obalu částice. Na Obr. 8 je znázorněna struktura takto stabilizovaných nanočástic.⁶⁶

Pluronic® F-127 byl použit v předložené diplomové práci pro sterickou stabilizaci nanočástic s rifampicinem.

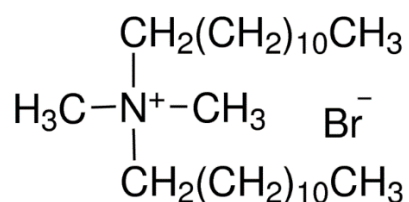
Obr. 8: Schéma struktury nanotobolky oxidu železa stabilizované poloxamerem 407⁶⁶



7.5.5 Didodecyldimethylammonium bromide

Didodecyldimethylammonium bromid (DDAB) je kationtová povrchově aktivní látka se dvěma řetězci (Obr. 9).⁶⁷

Obr. 9: Didodecyldimethylammonium bromid⁶⁷



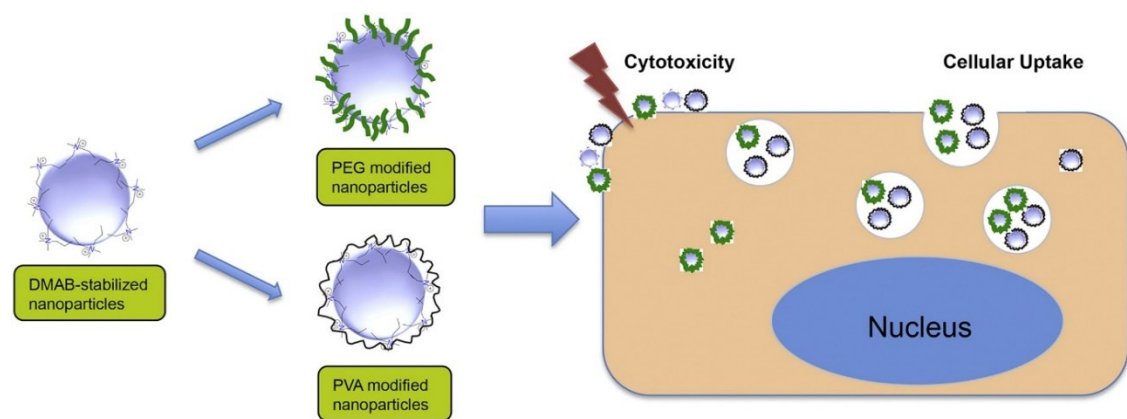
Byly připraveny fluorescenčně značené PLGA nanočástice, stabilizované DDAB, modifikované pomocí dvou hydrofilních polymerů, PVA a PEG s cílem zvýšit vstup NP do epiteliálních buněk GIT a snížit cytotoxicitu inkorporovaných léčiv.⁶⁸

DDAB je používán pro efektivní targeting léčiv do savčích buněk. Byl zjištěno, že DDAB je silným induktorem buněčné smrti v široké škále nádorových buněčných linií.

Na Obr. 10 je schematicky znázorněna stabilizace PLGA nanočástic didodecyldimethylamoniumbromidem a vstup nanočástic do nádorových buněk.⁶⁹

V předložené práci byl DDAB použit pro elektrostatickou stabilizaci PLGA nanočástic s rifampicinem.

Obr. 10: Schematické znázornění vstupu PLGA nanočástice stabilizovaných didodecyldimethylamoniumbromidem (DMAB) do buněk⁷⁵



8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Přístroje

Analytické digitální váhy, Kern Abs, max. 220 g, d= 0,1 mg

Biologický termostat BT 50, Labo MS

Centrifuga Fisher Scientific Micro Z

Digitální váhy, Kern 440 – 53, max. 6000 g, d= 1 g

Horkovzdušná sušárna, Memmert

Lyofilizátor Freeze-Dryer Beta 1-8 LSCPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlag

Magnetická míchačka, IKA – WERKERT, 100 – 1000 ot/min

Mraznička Vestfrost BSFS 290

pH meter Hanna Instruments HI22I

Spektrofotometr Specord 205, Analytic Jena

Třepací vodní lázeň Julabo SW, ILABO

Ultrazvuk Sonorex super 10 P, Bandelin

Zetasizer ZS 90 Malvern Instruments

8.2 Pomůcky

Automatická pipeta, Merck

Dialyzační membrána 23 mm, MWCO 6 000 – 8 000, Fisher Scientific

Kapilární kyveta DTS 1060, Malvern

Kyveta UV High Precision Cell 6030 Hellmy Analytics

Membránový filtr PP stříkačkový velikost pórů 0,45 mm, VWR International s.r.o.

Pipety s nastavitelným objemem Research, Eppendorf

Skleněná kyveta, Hellma Analytics

8.3 Chemické sloučeniny

Acetonitril, Sigma-Aldrich

Čištěná voda, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Didodecyldimethylamonium bromid, Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid, Penta

PBS pH 7,4 tablety, Merck

Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, Dr. Kulich Pharma s.r.o

Kyselina citrónová monohydrát, Dr. Kulich Pharma s.r.o. HK

Poloxamer 407 (Pluronic[®] F-127), Merck

Poly(D,L-laktid-*co*-glycolid) 50:50, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Poly(D,L-laktid-*co*-glycolid) 70:30, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Poly(D,L-laktid-*co*-glycolid) větvený na tripentaerythritolu, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Resomer[®] RG 503, Poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) lactide:glycolide 50:50, ester terminated, M_w 24 000-38 000, Merck

Rifampicin, Sigma-Aldrich

8.4 Příprava nanočástic

Nanočástice byly připravené nanoprecipitační metodou. Polymerní nosič a léčivo byly rozpuštěny v DMSO (vnitřní fáze). Byl připraven pufr nebo roztok tenzidu (vnější fáze). Vnitřní fáze byla přidána do fáze vnější, došlo k precipitaci, a tím vzniku nanosuspenze.

8.4.1 Příprava vnitřní fáze

Vnitřní fáze byla tvořena roztokem polymeru a rifampicinu v DMSO. Polymery použité k tvorbě nanočástic a jejich charakteristiky uvádí Tab. 4. Rozpuštěním polymeru v DMSO při teplotě 50 °C a míchání na elektromagnetické míchačce byly připraveny 10% zásobní roztoky. V čase přípravy byly naředěny DMSO na koncentraci 3 % nebo 5 %. V těchto roztocích byly rozpuštěny 2,0 mg rifampicinu.

8.4.2 Příprava vnější fáze

Vnější fáze byla tvořena pufrem, nebo vodným roztokem tenzidu. Použitými puframi byl fosfátový pufr (PBS) pH 7,4 nebo fosfát citrátový pufr pH 5,0. PBS pH 7,4 byl připraven rozpuštěním jedné tablety pro přípravu pufru ve 200 ml deionizované vody při 25 °C. Fosfát citrátový pufr pH 5,0 byl připraven smísením 49 ml 0,1M roztoku monohydrátu kyseliny citrónové a 51 ml 0,2M roztoku hydrogenfosforečnanu disodného dihydrátu.⁷⁰ Ve funkci tenzidu byly použity poloxamer 407 - Pluronic® F-127, BASF (F127) nebo didodecyldimethylamonium bromid (DDAB). Byl připraven 0,1% roztok DDAB a v čase potřeby popř. naředěn na koncentraci 0,01 %. Byl připraven 2% roztok F127 a v čase potřeby popř. naředěn na koncentrace 1 % a 0,5 %.

8.4.3 Nanoprecipitace

Na analytických vahách byl navážen rifampicin v množství 2 mg a byl přenesen do kádinky na 10 ml. Následně byl napipetován 1 ml roztoku polymeru v DMSO o dané koncentraci. Směs byla ponechána v klidu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Do 50 ml kádinky bylo napipetováno 10 ml vnější fáze a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Do 10,0 ml vnější fáze byla za stálého míchání a laboratorní teploty přidána vnitřní fáze metodou *drop wise* nebo metodou *one pot* v množství obvykle 1 ml, popř. 2 ml. Nanosuspenze byla míchána po dobu 15 minut a poté byla připravena k měření.

8.5 Měření velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu

Měření probíhalo na přístroji Zetasizer Nano ZS. Přístroj byl zapnutý 30 minut před začátkem měření, aby byl zkalibrován na teplotu 25 °C. Nanosuspenze byly měřeny bezprostředně po přípravě. Vzorek byl odebrán injekční stříkačkou vždy ze středu kádinky z důvodu zamezení negativnímu ovlivnění naměřených výsledků bublinami či prachovými částicemi, vyskytujícími se na povrchu vzorku a byl přenesen do kyvety. K měření velikosti nanočástic byly použity jednorázové kyvety z polymethylmethakrylátu. K měření zeta potenciálu byly použity složené kapilární kyvety DTS 1060. Vzorky byly měřeny ve třech cyklech, každý cyklus představoval deset měření. Byl vypočítán průměr ze tří měření a směrodatná odchylka.

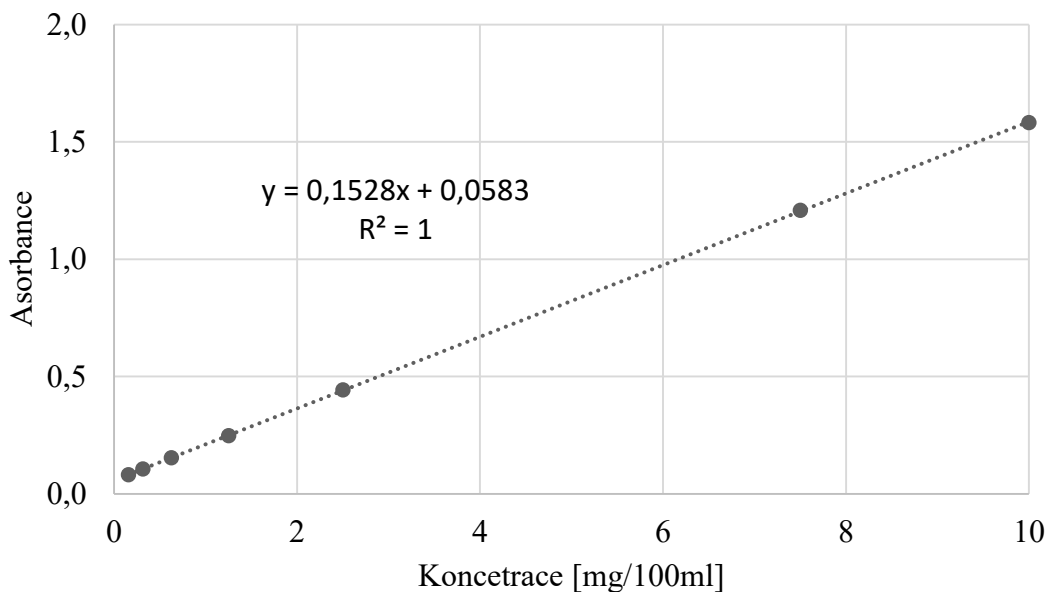
8.6 Kalibrační přímka

Pro spektrofotometrické stanovení rifampicinu byla sestrojena kalibrační křivka a zjištěna rovnice lineární regrese. Byly připraveny roztoky rifampicinu v acetonitrilu (ACN) a PBS pH 7,4. Na analytických vahách bylo naváženo dané množství rifampicinu. Následně byl rifampicin dán do odměrné baňky na 100 ml a bylo přidáno asi poloviční množství rozpouštědla. Po rozpuštění rifampicinu bylo doplněno rozpouštědlo po rysku. Z toho roztoku byly připraveny roztoky o nižších koncentracích a byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 475 nm proti ACN (Tab. 6) nebo PBS (Tab.7). Na základě získaných hodnot absorbance byly sestrojeny kalibrační přímky (Obr. 11 a 12).

Tab. 6: Absorbance roztoků rifampicinu v ACN při vlnové délce 475 nm

c (mg/100 ml)	10,0	7,5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,1562
A	1,5831	1,2081	0,4426	0,2485	0,1533	0,1057	0,0811

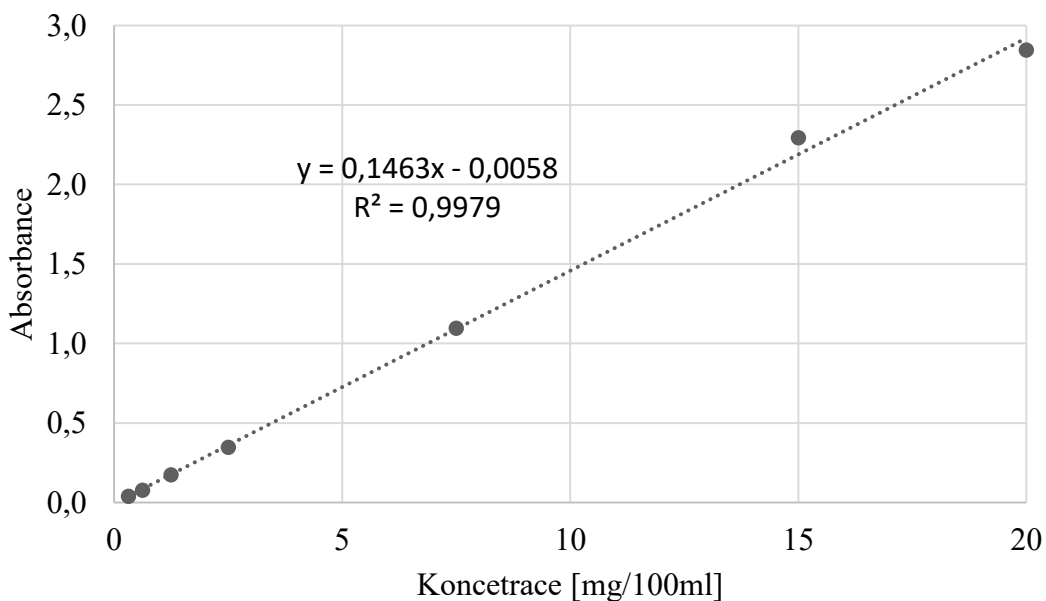
Obr. 11: Kalibrační přímka rifampicinu v ACN



Tab. 7: Absorbance roztoků rifampicinu v PBS 7,4 při vlnové délce 475 nm

c (mg/100 ml)	20	15,0	10,0	7,5	2,5	1,25	0,625
A	2,8442	2,2922	1,6957	1,0947	0,3457	0,1723	0,0765

Obr. 12: Kalibrační přímka rifampicinu v PBS 7,4



8.7 Stanovení enkapsulační účinnosti

Do 12 uzavíratelných vialek byly odpipetovány 2,0 ml nanosuspenze a vialky byly umístěny do centrifugy. Centrifugace byla nastavena na 10 000 ot/min a dobu 20 minut. Po skončení centrifugace byl odpipetován supernatant a čtyřikrát zředěn ACN. Sediment zbylý ve vialce byl rozpuštěn v 1,5 ml ACN. Byla měřena absorbance takto připravených vzorků při 475 nm proti ACN.

Enkapsulační účinnost EE [%] byla vypočtena podle vzorce:

$$EE = \frac{m_e}{m_t} \times 100 \quad (1)$$

Byl vypočten procentuální podíl léčiva v nanočásticích (*loading capacity*) podle vzorce:

$$LC = \frac{m_e}{m_n} \times 100 \quad (2)$$

EE enkapsulační účinnost [%]

LC loading capacity – procentuální podíl léčiva v nanočásticích [%]

m_e množství rifampicinu stanoveného v nanočásticích [mg]

m_t množství rifampicinu použitého při přípravě [mg]

m_n hmotnost nanočástic [mg]

8.8 Disoluce rifampicinu z nanočástic

Do dialyzační membrány z regenerované celulosy průměru 23 mm, MWCO 6000 až 8000 byly odpipetovány 3,0 ml nanosuspenze. Konce membrán byly zavázány, vzorky byly vloženy do vialek a bylo přidáno 15 ml disolučního média (PBS 7,4), které bylo předem zahřáté na 37 °C (Obr. 13). Vialky byly umístěny do třepací vodní lázně 37°C. Amplituda třepání byla 15 mm, frekvence třepání 70/min.

Ve stanovených časových intervalech (2 hod, 5 hod, 1 den, 2 dny, 3 dny, 4 dny, 6 dnů, 7 dnů) byly odebrány 3 ml disolučního média a stanoveno množství uvolněného rifampicinu. Do vialky byly přidány 3 ml disolučního média, aby byly zachovány *sink* podmínky.

Obr. 13: Vialka s nanosuspenzí v dialyzační membráně



Množství uvolněného rifampicinu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při 475 nm proti PBS 7,4. Každý vzorek se proměřil v jednom cyklu celkem třikrát. Množství uvolněného rifampicinu bylo vypočteno na základě rovnice kalibrační přímky a stanovené enkapsulační účinnosti:

$$m = \frac{[(A-b)/a]}{EE} \quad (3)$$

m množství rifampicinu [mg/15 ml]

A absorbance rifampicinu při λ_{\max} 475 nm

a, b reálná čísla z rovnice kalibrační přímky (viz. Obr. 12)

EE enkapsulační účinnost [%]

Výpočet množství rifampicinu uvolněného v procentech:

$$C_{\%} = \frac{(c \times 100)}{m_e} \quad (4)$$

$C_{\%}$ procentuální podíl uvolněného rifampicinu [%]

c koncentrace rifampicinu [mg/15 ml]

m_e množství rifampicinu enkapsulovaného v nanočásticích [mg]

8.9 Příprava nanočástic pro SEM a lyofilizaci

Byly připraveny nanočástice tvořené polyesterem 3T, použitým při přípravě NP ve formě 5% roztoku v DMSO. Vnější fází byl při nanoprecipitační metodě pufr PBS 7,4. Do dvanácti vialek bylo napipetováno po 2 ml nanosuspenze. Centrifugace proběhla při 10 000 ot/min po dobu 20 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a sediment byl rozdělen na dvě části – vzorek pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) a vzorek pro lyofilizaci.

Vzorek pro SEM byl předán k hodnocení morfologie nanočástic, která byla realizována ve spolupráci s Mgr. Janem Loskotem, Ph.D. z katedry fyziky Přírodovědecké fakulty UHK.

Ke vzorku pro lyofilizaci byla přidána kryoprotektivní látka, kterou byl 20% roztok trehalosy nebo 20% mannitolu. Bylo napipetováno vždy 0,6 ml roztoku kryoprotektiva a vialky byly důkladně protřepány. Vzorky byly aplikovány do blistru a připraveny na lyofilizaci. Lyofilizace byla realizována v rámci experimentální části diplomové práce Elišky Macákové.⁷¹ Vzorky byly v mrazicím boxu po dobu 24 hodin při -30 °C. Po zmrazení byly co nejrychleji přeneseny do komory lyofilizátoru. V lyofilizátoru byl nastavena teplota desek na -16 °C. Teplota kondenzátoru byla nastavena na -56 °C a tlak v komoře byl nastaven na 30 Pa. Teplota v průběhu primárního a sekundárního sušení postupně stoupala až ke konečné teplotě 18 °C. Lyofilizace probíhala po dobu 24 hodin. Po ukončení lyofilizace byly vzorky umístěny do nádoby s vysoušedlem.

Lyofilizované nanočástice byly redispergovány v 0,5% roztoku poloxameru 407; v 0,01% roztoku DDAB nebo v PBS pH 7,4 a přefiltrovány přes stříkačkový filtr s polypropylenovou membránou o velikost pórů 0,45 μm. Byla změřena velikost částic, polydisperzita a zeta potenciál a byla vypočtena hodnota S2/S1 jako podíl velikosti nanočástic po lyofilizaci (S2) a před lyofilizací (S1).

9 VÝSLEDKY

9.1 Velikost nanočástic, zeta potenciál, polydisperzita

Tab. 8: Vliv koncentrace polymeru ve vnitřní fázi a vliv pH vnější fáze na charakteristiky nanočástic tvořených polymerem 3T

Vnitřní fáze	Vnější fáze	Velikosti částic [nm]	ZP [mV]	PDI
3% 3T	pH 5,0	277,2	-25,9	0,013
		238,3	-25,5	0,045
		236,9	-25,0	0,067
	průměr ± SD	237,5 ± 0,7	-25,5 ± 0,4	0,042 ± 0,027
	pH 7,4	197,9	-31,6	0,060
		198,6	-33,4	0,067
		201,5	-36,0	0,086
	průměr ± SD	199,3 ± 1,9	-33,7 ± 2,2	0,071 ± 0,013
5% 3T	pH 5,0	251,8	-21,9	0,028
		252,6	-24,2	0,010
		254,4	-23,0	0,069
	průměr ± SD	252,9 ± 1,3	-23,1 ± 1,1	0,036 ± 0,030
	pH 7,4	329,2	-47,9	0,276
		328,9	-54,0	0,301
		323,7	-53,4	0,238
	průměr ± SD	327,5 ± 3,1	-51,8 ± 3,4	0,272 ± 0,032
10% 3T	pH 5,0	Vzorek aglomeroval		
	pH 7,4	Vzorek aglomeroval		

Tab. 1: Vliv koncentrace poloxameru 407 (F127) na charakteristiky nanočástic tvořených polymerem 3T

Vnitřní fáze	Vnější fáze	Velikosti částic [nm]	ZP [mV]	PDI
5% 3T	F127 0,5%	278,5	2,93	0,073
		280,2	2,96	0,056
		280,6	2,71	0,066
	průměr ± SD	279,8 ± 1,1	2,87 ± 0,14	0,065 ± 0,009
	F127 1%	292,4	2,30	0,052
		296,4	2,09	0,081
		289,1	1,64	0,134
	průměr ± SD	292,6 ± 3,6	2,01 ± 0,34	0,089 ± 0,042
	F127 1% „one pot“	297,9	1,85	0,102
		304,2	1,24	0,098
		300,8	1,28	0,077
	průměr ± SD	301,0 ± 3,1	1,46 ± 0,34	0,092 ± 0,013
F127 2%	382,6	-0,29	0,101	
	379,5	-0,25	0,112	
	383,8	-0,24	0,134	
průměr ± SD	381,7 ± 1,8	-0,26 ± 0,03	0,114 ± 0,017	
10% 3T	F127 2%	452,7	0,63	0,174
		444,3	0,42	0,124
		449,3	0,21	0,129
	průměr ± SD	448,8 ± 4,225	0,42 ± 0,212	0,142 ± 0,028

Tab. 2: Vliv koncentrace tenzidu na charakteristiky nanočástic tvořených polymerem 3T

Vnitřní fáze	Vnější fáze	Velikosti částic [nm]	ZP [mV]	PDI
5% 3T 2 ml	DDAB 0,01%	336,3	13,9	0,176
		335,5	15,9	0,118
		332,7	14,9	0,158
	průměr ± SD	334,8 ± 1,890	14,9 ± 1,0	0,151 ± 0,030
5% 3T 1 ml	DDAB 0,01%	233,6	29,4	0,081
		235,0	29,9	0,097
		232,4	31,9	0,122
	průměr ± SD	233,7 ± 1,301	30,4 ± 1,3	0,100 ± 0,021
	DDAB 0,01% F127 0,1%	265,2	14,1	0,077
		261,4	13,5	0,135
		264,8	13,7	0,089
	průměr ± SD	263,8 ± 2,1	13,8 ± 0,3	0,100 ± 0,031
	DDAB 0,005% F127 1%	358,5	2,83	0,098
		362,3	2,05	0,073
		363,2	2,15	0,064
	průměr ± SD	361,3 ± 2,5	2,34 ± 0,42	0,078 ± 0,018
DDAB 0,005% F127 0,5%	320,1	4,79	0,075	
	316,9	4,30	0,023	
	318,8	3,91	0,093	
průměr ± SD	318,6 ± 1,6	4,33 ± 0,44	0,064 ± 0,036	
10% 3T	DDAB 0,01%	Vzorek aglomeroval		

Tab. 11: Vliv formulačních faktorů na charakteristiky nanočástic tvořených PLGA

Vnitřní fáze	Vnější fáze	Velikosti částic [nm]	ZP [mV]	PDI
3% PLGA	pH 5,0	144,8	-28,8	0,090
		146,2	-30,1	0,078
		145,8	-31,6	0,098
	průměr ± SD	145,6 ± 0,7	-30,2 ± 1,4	0,089 ± 0,010
	pH 7,4	137,0	-20,2	0,078
		137,4	-22,6	0,091
136,1		-23,5	0,057	
průměr ± SD	136,8 ± 0,7	-22,0 ± 1,7	0,075 ± 0,017	
5% PLGA	pH 5,0	160,3	-22,2	0,074
		160,2	-24,2	0,074
		160,3	-22,7	0,055
	průměr ± SD	160,3 ± 0,05	-23,0 ± 2,10	0,068 ± 0,011
	pH 7,4	286,1	-41,7	0,214
		291,7	-46,3	0,202
		288,6	-48,8	0,169
	průměr ± SD	288,8 ± 2,8	-45,6 ± 3,60	0,195 ± 0,023
F127 1%	Vzorek aglomeroval			
F127 1% „one pot“	Vzorek aglomeroval			
DDAB 0,01%	Vzorek aglomeroval			
10% PLGA	pH 7,4	Vzorek aglomeroval		
	DDAB 0,01%	Vzorek aglomeroval		
5% PLGA 70:30	F127 1%	329,8	-1,01	0,114
		326,4	-1,05	0,097
		322,8	-1,32	0,141
	průměr ± SD	326,3 ± 3,50	-1,13 ± 0,17	0,117 ± 0,022

Tab. 12: Vliv formulačních faktorů na charakteristiky nanočástic tvořených Resomerem®

Vnitřní fáze	Vnější fáze	Velikosti částic [nm]	ZP [mV]	PDI
Resomer	pH 5,0	Vzorek aglomeroval		
	pH 7,4	Vzorek aglomeroval		
	DDAB 0,01%	Vzorek aglomeroval		
	F127 1%	276,8	-0,89	0,103
		266,7	-0,88	0,141
		271,4	-0,73	0,052
průměr ± SD	276,8	-0,89	0,103	

9.2 Enkapsulační účinnost a množství léčiva v nanočásticích

Tab. 13: Vliv koncentrace a typu polymeru a pH vnější fáze na EE a LC

Vnitřní fáze	Vnější fáze	EE [%]	LC [%]
3% 3T	pH 5,0	16,61	2,93
	pH 7,4	16,87	2,98
5% 3T	pH 5,0	30,52	5,26
	pH 7,4	40,72	7,45
3% PLGA	pH 5,0	18,11	3,19
	pH 7,4	19,80	3,47
5% PLGA	pH 5,0	36,81	6,27
	pH 7,4	52,92	8,93

Tab. 14: Vliv koncentrace F127 ve vnější fázi na EE a LC

Vnitřní fáze	Vnější fáze	EE [%]	LC [%]
5% 3T	F127 0,5%	28,51	4,93
	F127 1% „one pot“	5,20	0,94
	F127 1%	7,82	1,40
	F127 2%	6,05	1,09
5% PLGA70:30	F-127 1%	52,65	8,74
5% Resomer	F-127 1%	16,03	2,83
10% 3T	F127 2%	6,36	1,14

Tab. 15: Vliv kombinace tenzidů ve vnější fázi na EE a LC

Vnitřní fáze		Vnější fáze	EE [%]	LC [%]
5% 3T	1 ml	DDAB 0,01%	5,07	0,91
	2 ml		23,73	4,14
5% 3T	1 ml	DDAB 0,01% F127 0,1%	28,76	4,97
5% 3T	1 ml	DDAB 0,005% F127 0,5%	6,50	1,17
5% 3T	1 ml	DDAB 0,005% F127 1%	6,01	1,08
10% 3T	1 ml	DDAB 0,005% F127 1%	6,36	1,14

9.3 Liberace rifampicinu z nanočástic

Tab. 16 a-c: Množství rifampicinu uvolněného z polymeru 3T do PBS 7,4

a) vzorek 1

Čas [h]	A	RIFA [mg/100ml]	RIFA [%]	RIFA [kum %]
2	0,123	6,335	15,034	15,14
5	0,075	3,893	9,239	24,38
24	0,093	5,187	12,309	36,69
48	0,084	5,044	11,968	48,65
72	0,084	4,592	10,898	59,55
96	0,087	4,719	11,198	70,75
144	0,104	5,580	13,242	83,99

b) vzorek 2

Čas [h]	A	RIFA [mg/100ml]	RIFA [%]	RIFA [kum %]
2	0,115	5,918	14,045	14,15
5	0,074	3,856	9,150	23,30
24	0,090	4,640	11,011	34,31
48	0,078	4,058	9,629	43,94
72	0,080	4,146	9,840	53,78
96	0,082	4,247	10,079	63,86
144	0,090	4,678	11,101	74,96

c) vzorek 3

Čas [h]	A	RIFA [mg/100ml]	RIFA [%]	RIFA [kum %]
2	0,132	6,814	16,170	16,27
5	0,077	3,979	9,442	25,71
24	0,089	4,618	10,959	36,67
48	0,077	3,987	9,462	46,14
72	0,082	4,244	10,071	56,21
96	0,087	4,493	10,663	66,87
144	0,113	5,847	13,874	80,74

9.4 Charakteristiky rekonstituovaných lyofilizátů

Tab. 17: Nanočástice rekonstituované 0,01% roztokem DDAB

Kryoprotektant	Velikosti částic [nm]	PDI	ZP [mV]
20% mannitol	151,5	0,299	11,38
	151,2	0,293	11,76
	153,9	0,294	11,17
průměr ± SD	152,2 ± 1,5	0,295 ± 0,003	11,44 ± 0,30
20% trehalosa	253,5	0,214	12,61
	257,5	0,216	12,53
	252,6	0,199	13,09
průměr ± SD	254,5 ± 2,6	0,210 ± 0,009	12,74 ± 0,30

Tab. 18: Nanočástice rekonstituované 0,5% F127

Kryoprotektant	Velikosti částic [nm]	PDI	ZP [mV]
20% mannitol	144,06	0,474	-11,87
	145,36	0,472	-12,73
	145,10	0,483	-12,48
průměr ± SD	144,84 ± 0,69	0,476 ± 0,006	-2,36 ± 0,44
20% trehalosa	170,09	0,483	-11,53
	173,15	0,434	-11,71
	174,04	0,443	-11,22
průměr ± SD	172,43 ± 2,072	0,453 ± 0,026	-11,49 ± 0,248

Tab. 19: Nanočástice rekonstituované PBS 7,4

Kryoprotektant	Velikosti částic [nm]	PDI	ZP [mV]
20% mannitol	113,1	0,673	-8,53
	117,2	0,659	-8,66
	114,0	0,679	-9,16
průměr ± SD	114,8 ± 2,2	0,670 ± 0,100	-8,78 ± 0,33
20% trehalosa	200,3	0,576	-4,11
	199,3	0,576	-4,22
	198,2	0,579	-4,83
průměr ± SD	199,28 ± 1,0	0,577 ± 0,002	-4,39 ± 0,39

10 DISKUZE

Nanočástic s rifampicinem byly připraveny nanoprecipitační metodou, která je v literatuře prezentována jako metoda vhodná pro enkapsulaci hydrofobních léčiv. Jedná se o *bottom-up* metodu umožňující přípravu částic požadovaných vlastností díky relativně snadno ovlivnitelným formulačním faktorům.^{6,9}

Jako rozpouštědlo pro PLGA a rifampicin byl zvolen dimethylsulfoxid, nepolární protické rozpouštědlo, které je monografováno v ČL. Použité rozpouštědlo má vliv zejména na velikost nanočástic a množství léčiva v NP. Při použití DMSO se získají menší NP než při použití dimethylacetamidu, dimethylformamidu nebo acetonu. Enkapsulační účinnost se uvádí nejnižší při použití DMSO a acetonu.⁶¹ Stejně závěry přinesla diplomová práce Jaworského. DMSO se z hlediska velikosti NP jevil jako lepší volba než aceton.⁷²

Pro formulaci NP byly použity tři lineární PLGA, lišící se molární hmotností a poměrem kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Dále byl použit PLGA derivát s větvenou strukturou. Tyto polyestery byly syntetizovány stupňovou kopolymerací bez použití katalyzátorů ze směsi kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné, popř. doplněné tripentaerythritolem ve funkci větvičícího monomeru.⁵² Charakteristiky polyesterů použitých pro přípravu nanočástic s rifampicinem jsou uvedeny v Tab. 4. Byl rovněž použit komerčně dostupný Resomer[®] RG 503, který má vyšší molární hmotnost a vyšší teplotu skelného přechodu.⁵⁵

Při nanoprecipitaci byly jako vnější vodná fáze použity pufrы pH 5,0 a 7,4 nebo roztoky tenzidů. Ve funkci tenzidu byly použity poloxamer 407 nebo didodecyldimethylamonium bromid (DDAB). Poloxamer 407 je neiontový blokový kopolymer ethylenoxidu a propylenoxidu. Stabilizuje nanočástice stéricky, tvorbou polymerní vrstvy na povrchu nanočástic. DDAB je kationtový tenzid, který stabilizuje nanočástice elektrostaticky. Zvyšuje zeta potenciál, hodnotu elektrostatického potenciálu dvojvrstvy, obklopující nanočástice ve vodném prostředí. Nanočástice se zeta potenciálem mezi -10 a +10 mV se považují za přibližně neutrální, zatímco nanočástice se zeta potenciálem větším než +30 mV nebo nižším než -30 mV se považují za silně kationtové a silně aniontové. Obecně absolutní hodnoty zeta potenciálu nad 60 mV znamenají vynikající stabilitu, při hodnotách nad 30 mV jsou NP fyzikálně stabilní, hodnoty pod 20 mV ukazují na omezenou stabilitu a hodnoty nižší než 5 mV jsou důkazem aglomerace.⁷³

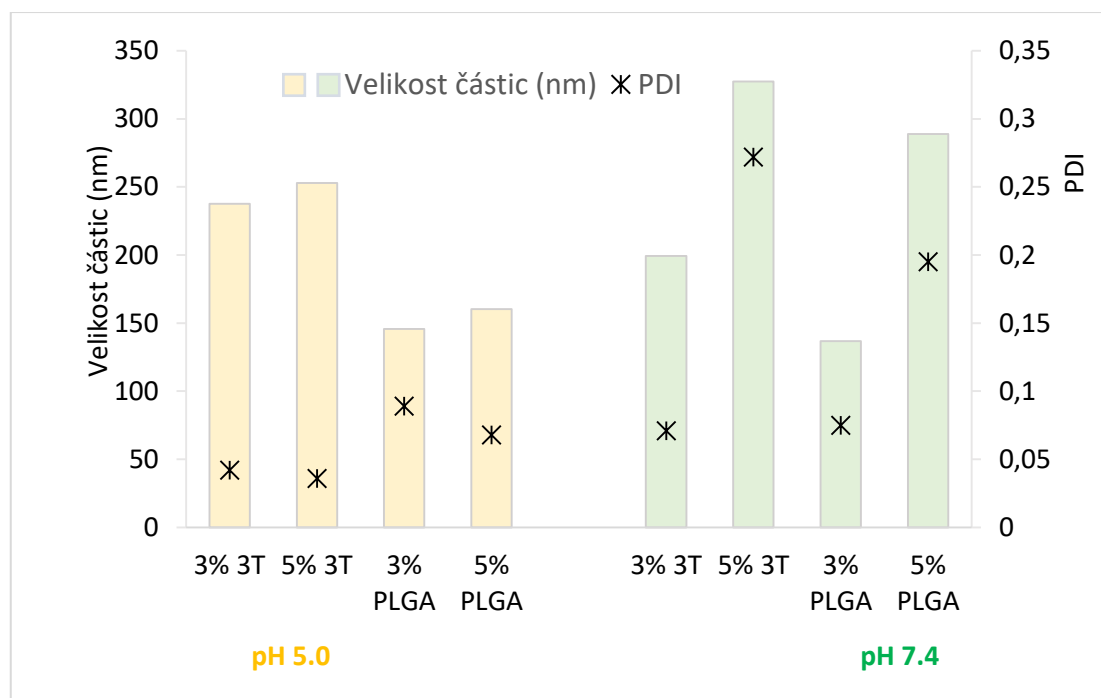
Dalšími formulačními faktory, jejichž vliv na kvalitu nanočástic byl sledován, byly poměr vnitřní a vnější fáze (1:10 popř. 1:5), způsob přidání vnitřní fáze do fáze vnější (“*drop wise*” nebo “*one pot*”) a vliv kryoprotektiva (trehalosa nebo mannitol).

10.1 Vliv formulačních faktorů na velikost a polydisperzitu nanočástic

Velikost a tvar nanočástic ovlivňují jejich transport v organismu, např. průchod kapilárami, proces endocytózy, interakci s buněčnými strukturami, a tím distribuci léčiva v organismu a kinetiku uvolňování. Velikost PLGA nanočástic se v době od přípravy do jejich aplikace mění bobtnáním, degradací, ale zejména tvorbou shluků. Změna velikosti je závislá i na hodnotě pH prostředí.⁷⁴ Velikost NP určuje jejich cílení v organismu (pasivní targeting). Nanočástice do 100 nm (popř. 200 nm) jsou optimální z hlediska doby cirkulace a přestupu přes biologické membrány. Nanočástice větší než 200 nm jsou účinně fagocytovány a distribuovány zejména do jater a sleziny.⁷⁵

Byl studován vliv typu a koncentrace polymeru a pH vnější fáze na velikost nanočástic s rifampicinem. V závislosti na těchto formulačních faktorech byly získány nanočástice v rozmezí přibližně 140 nm až 330 nm (Tab. 8-11, Obr. 14).

Obr. 14: Vliv polymeru a pH vnější fáze na velikost a polydisperzitu nanočástic

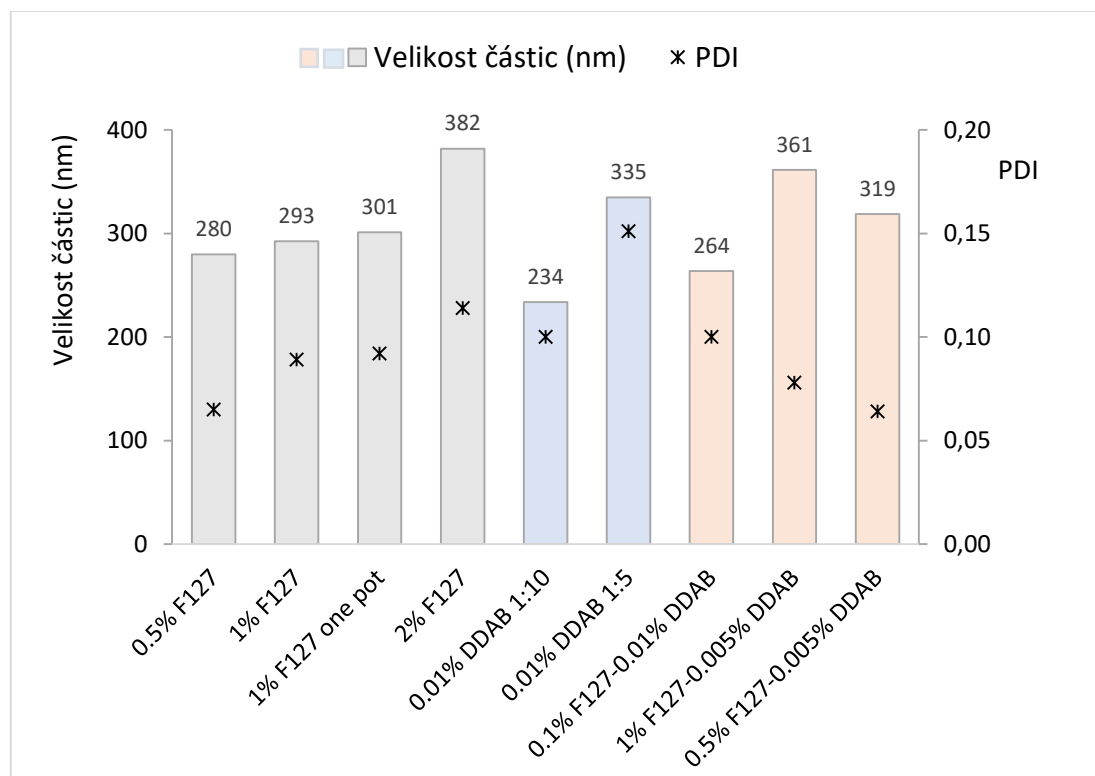


Nanočástice tvořené lineárním PLGA 50:50 s M_w 7 500 g/mol byly menší než nanočástice tvořené větveným polyesterem 3T s M_w 17 400 g/mol. Uplatnil se vliv molární hmotnosti jako významnější faktor, než je vliv konstituce molekuly. Při použití 3% roztoku polymeru v DMSO byly získány menší NP než při použití 5% roztoku, a to jak u lineárního PLGA, tak u větveného 3T. Nebyl zjištěn vliv pH vnější fáze na velikost nanočástic.

Údaje o velikosti nanočástic by měly být doplněny hodnotou polydisperzity, která vyjadřuje stupeň nejednotnosti distribuce velikosti částic. Jedná se o bezrozměrnou veličinu s hodnotami od nuly do jedné. Hodnoty PDI nižší než 0,05 mají monodisperzní standardy, hodnoty vyšší než 0,7 vysoce polydisperzní vzorky. U polymerních NP se za kvalitní považuje soustava s hodnotou nižší než 0,2. Nanočástice tvořené PLGA a 3T v koncentracích 3 % a 5 % vykazovaly optimální hodnoty PDI při pH 5,0 i 7,4. Nejvyšší PDI měly nanočástice 3T při 3% koncentraci při pH 7,4.

Na Obr. 15 je porovnána velikost a PDI nanočástic tvořených větveným polymerem 3T (5% roztok v DMSO), stabilizovaných poloxamerem 407 (F127), didodecyldimethylamonium bromidem (DDAB), nebo jejich kombinací.

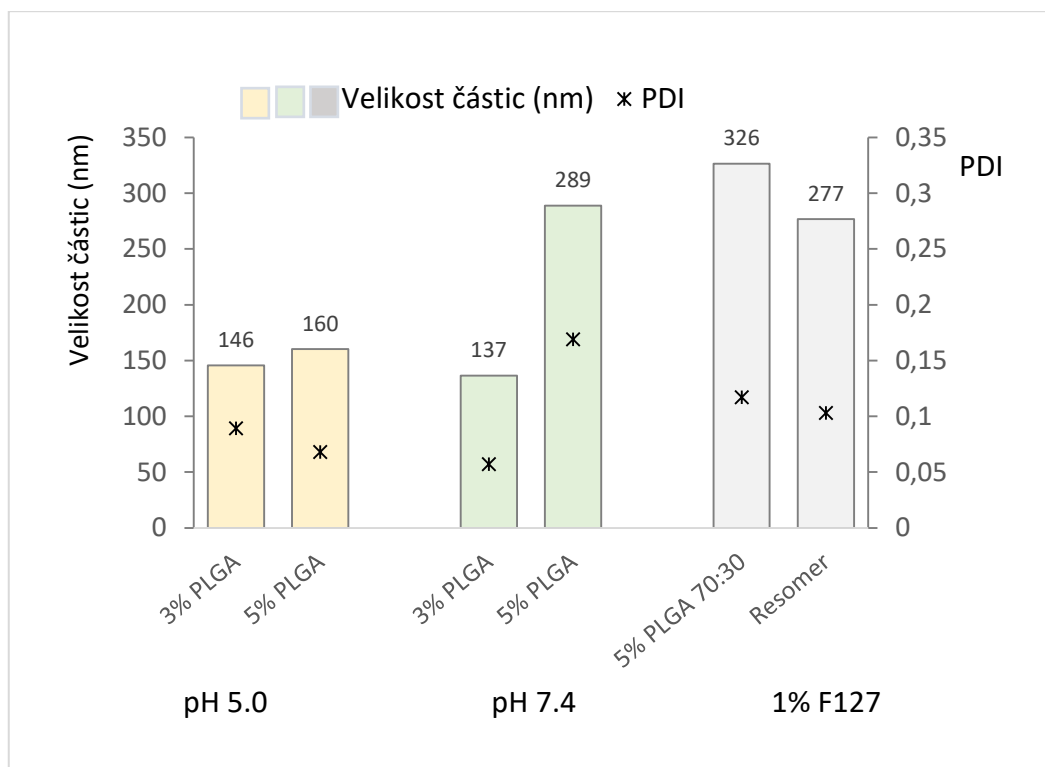
Obr. 15: Vliv tenzidu na velikost a polydisperzitu nanočástic 3T



Byly získány NP přibližně v rozmezí 230 až 380 nm s polydisperzitou nižší než 0,15. Zvýšením koncentrace F127 ve vnější fázi z 0,5 % na 1 %, ani změnou způsobu přidávání vnitřní fáze do fáze vnější z metody „*drop wise*“ na metodu „*one pot*“ se velikost NP významně nezvýšila. Pokud se pro stabilizaci použil 0,01% roztok DDAB, byla velikost NP ovlivněna poměrem vnitřní a vnější fáze. Při poměru 1:10 byla velikost NP 234 nm, při poměru 1:5 vzrostla velikost na 335 nm. Důvodem je zvýšení koncentrace polymeru a léčiva ve výsledné disperzi po smísení fází. Současně došlo ke snížení zeta potenciálu (Obr. 18), což je dáno změnou mezipovrchu. Kombinace neiontového poloxameru a kationtového DDAB nevedla k získání 3T nanočástic významně menších, ani významně větších než při použití tenzidů samostatně.

Na Obr. 16 je porovnána velikost a polydisperzita NP tvořených lineárními deriváty PLGA. Vliv koncentrace polymeru a molární hmotnost byl již zmíněn v souvislosti s Obr. 14. Zajímavý je výsledek měření velikosti NP tvořených PLGA 70:30. Tento nosič má vyšší hydrofobicitu než PLGA 50:50 díky vyššímu podílu kyseliny mléčné. Předpokládala se menší velikost NP, ale byly získány NP dvojnásobně větší (160 nm vs. 326 nm). Validita srovnání je však snížena rozdílným složením vnější fáze. Srovnání za stejných formulačních podmínek nemohlo být provedeno z důvodu aglomerace částic PLGA 50:50 v 1% roztoku poloxameru (Tab. 11). Resomer s deklarovanou M_w 24 000 až 38 000 g/mol byl úspěšně použit pro formulaci NP stéricky stabilizovaných poloxamerem, při použití DDAB a v pufrch pH 5,0 a 7,0 došlo k aglomeraci (Tab. 12). Polydisperzita NP tvořených lineárními PLGA byla ve všech případech menší než 0,17.

Obr. 16: Vliv formulačních faktorů na velikost a polydisperzitu PLGA nanočástic

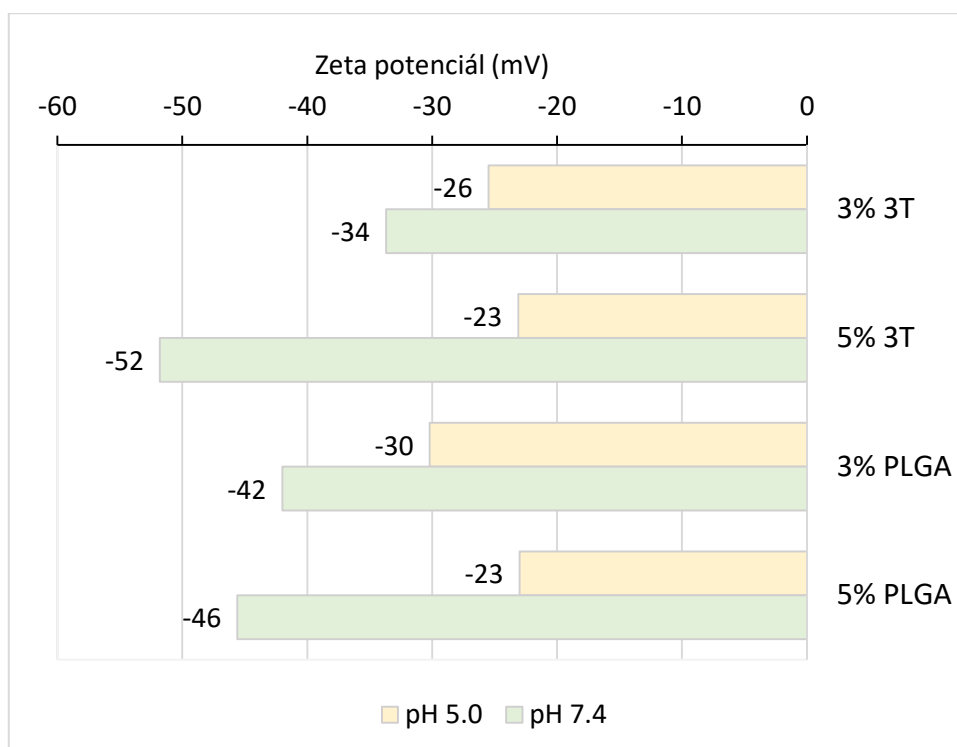


10.2 Vliv formulačních faktorů na zeta potenciál nanočástic

Rifampicin existuje ve vodných roztocích jako zwitterion s $pK_a 1 = 1,7$ (4-hydroxylová skupina), $pK_a 2 = 7,9$ (3-piperazinový dusík) a isoelektrickým bodem 4,8. Je to hydrofilní léčivo ($\log P 3,179$) s nízkou rozpustností a vysokou permeabilitou.⁴⁸ Lineární PLGA disponují teoreticky stejným počtem koncových hydroxylů a karboxylů. Polyester 3T větvený na tripentaerythritolu obsahuje koncové hydroxylové skupiny, rovněž tak Resomer[®] RG 503.

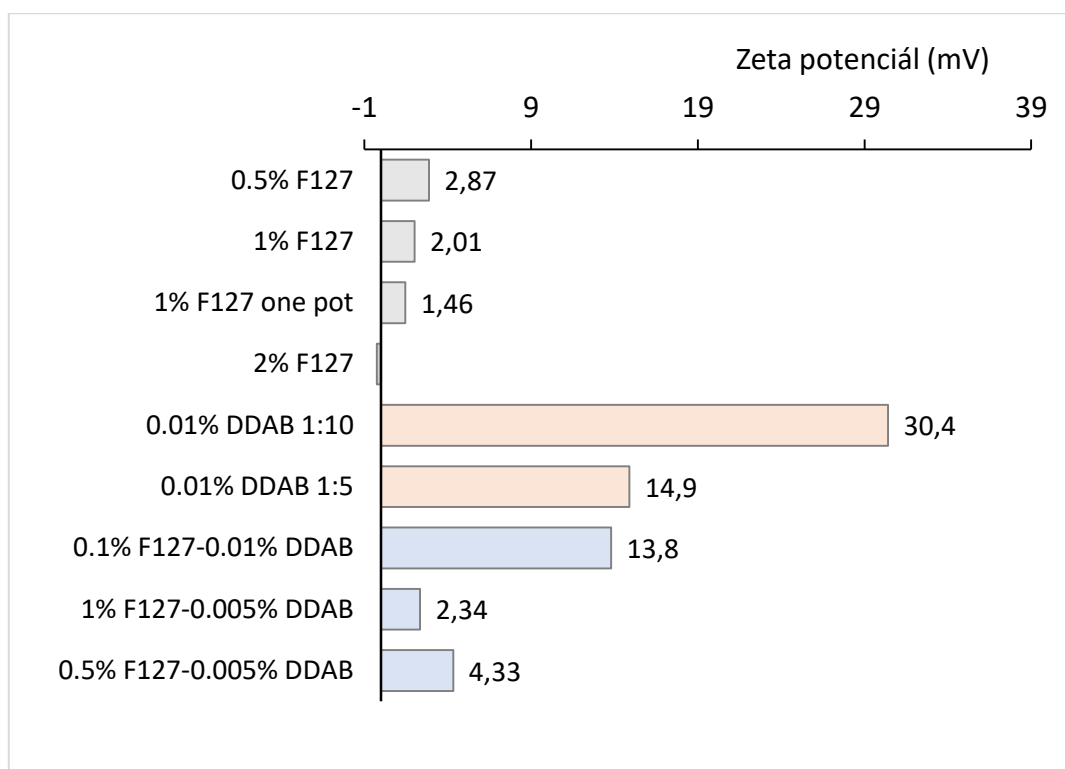
Na Obr. 17 jsou porovnány hodnoty zeta potenciálu NP s rifampicinem (Tab. 8-11). PLGA nanočástice s rifampicinem dispergované v pufrách jsou záporně nabitě a jsou fyzikálně stabilní. Vyšší absolutní hodnoty zeta potenciálu byly dosaženy při použití větveného polyesteru a při pH 7,4. Vliv koncentrace polyesteru na zeta potenciál se při pH 5,0 a při pH 7,4 projevil odlišně.

Obr. 17: Vliv polymeru a pH vnější fáze na zeta potenciál nanočástic



Při přípravě nanočástic s rifampicinem nanoprecipitační metodou byl použit poloxamer 407 a DDAB s cílem stabilizovat NP stéricky, resp. elektrostaticky. Na hodnotu zeta potenciálu se samozřejmě projevila pouze přítomnost kationtového DDAB. Stabilní NP byly získány pouze při koncentraci DDAB 0,01 % a poměru fází 1:10. Pokud se poměr fází zvýšil, vznikly větší nanočástice (Obr. 15) a došlo k poklesu zeta potenciálu. Jak už bylo vysvětleno výše, důvodem je změna koncentrace polymeru a léčiva. Při kombinaci poloxameru a DDAB nebylo dosaženo hodnot zeta potenciálu odpovídající stabilním nanočásticím.

Obr. 18: Vliv tenzidu na zeta potenciál nanočástic 3T



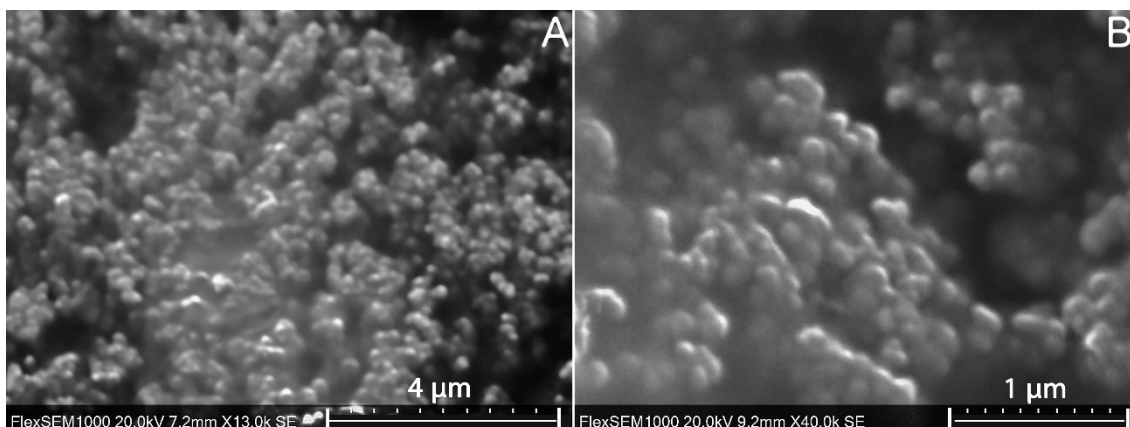
10.3 SEM nanočástic s rifampicinem

Byly připraveny nanočástic pro skenovací elektronovou mikroskopii, která byla realizována ve spolupráci s Mgr. Janem Loskotem, Ph.D. z katedry fyziky Přírodovědecké fakulty UHK.

Skenovací elektronovou mikroskopii byla ověřena morfologie PLGA nanočástic s rifampicinem. Snímání v režimu sekundárních elektronů (SE) je jevílo vhodnější než v režimu zpětně odražených elektronů (BSE). Bylo nutno postupovat obezřetně, protože vysoká energie paprsku při vyšších hodnotách urychlovacího napětí způsobovala po určitém čase destrukci nanočástic.

Snímky prokázaly sférický tvar nanočástic (Obr. 19). Pomocí softwarového vyhodnocení byla ověřena velikost nanočástic, která do značné míry korelovala s výsledky získanými metodou dynamického rozptylu světla.

Obr. 19: Snímky 3T nanočástic ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zvětšení 13000× (A) a 40000× (B)



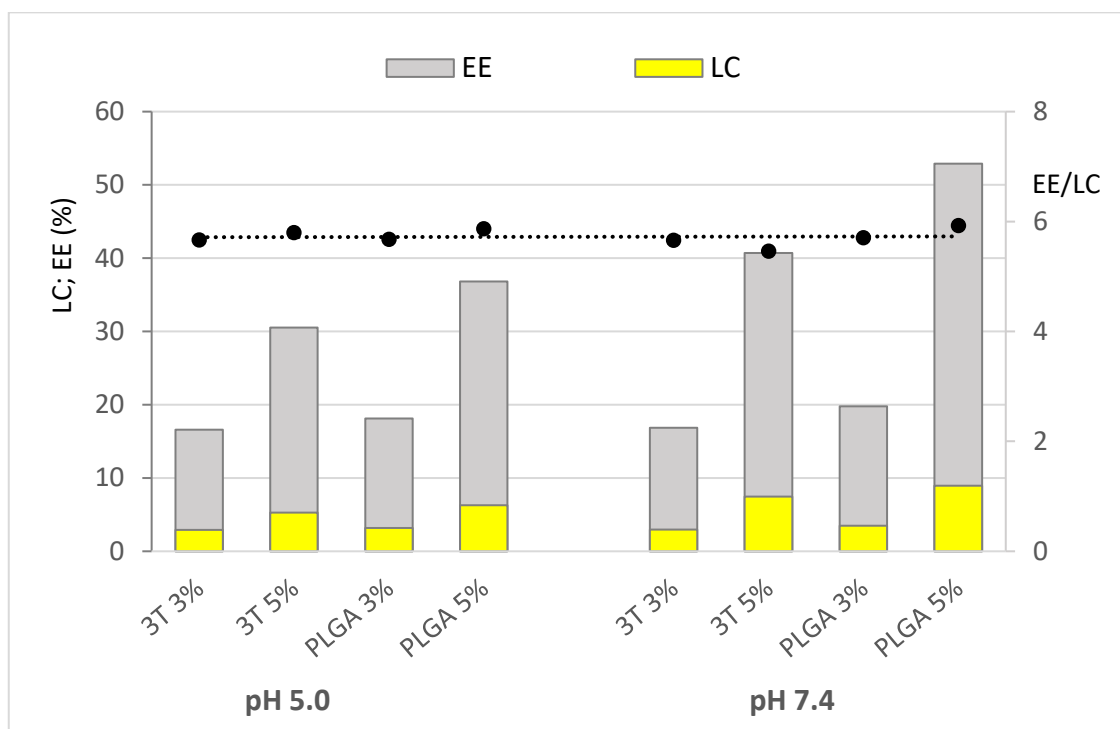
10.4 Enkapsulační účinnost a množství léčiva v nanočásticích

Enkapsulační účinnost (EE) je procento léčivé látky zachycené v částicích z celkového množství LL použitého při přípravě. Tento termín se nepoužívá pouze v souvislosti s tobolkami („kapsulami“), jak z významu slova vyplývá, ale i pro matricové systémy. Jedná se tedy o jakýsi „výtěžek“ nebo účinnost metody přípravy z pohledu léčivé látky. Pokud byly při přípravě nanočástic použity 2,0 mg rifampicinu a celé toto množství bylo inkorporováno do NP, je enkapsulační účinnost 100 %. EE se sníží únikem léčiva mimo NP, degradací léčiva v průběhu přípravy aj. Výpočet EE by měl vycházet z množství léčiva skutečně inkorporovaného do nosiče, nezahrnovat do výpočtu LL mimo nanočástice.

Podobný význam má parametr *loading capacity* (LC), proto dochází často k jejich záměně. V češtině je asi vhodný termín množství léčiva v nanočásticích nebo kapacita polymeru pro léčivo. Jedná se o podíl léčivé látky v nanočásticích k celkovému množství nanočástic. Tento parametr je pro kvalitu nanočástic důležitější než enkapsulační účinnost a úzce souvisí nejen s dávkováním léčiva, ale i s jeho disolučním profilem, degradací NP aj.

Byly stanoveny hodnoty EE a LC nanočástic připravených z lineárního polymeru PLGA 50:50 a větveného polymeru 3T (Tab. 13, Obr. 20).

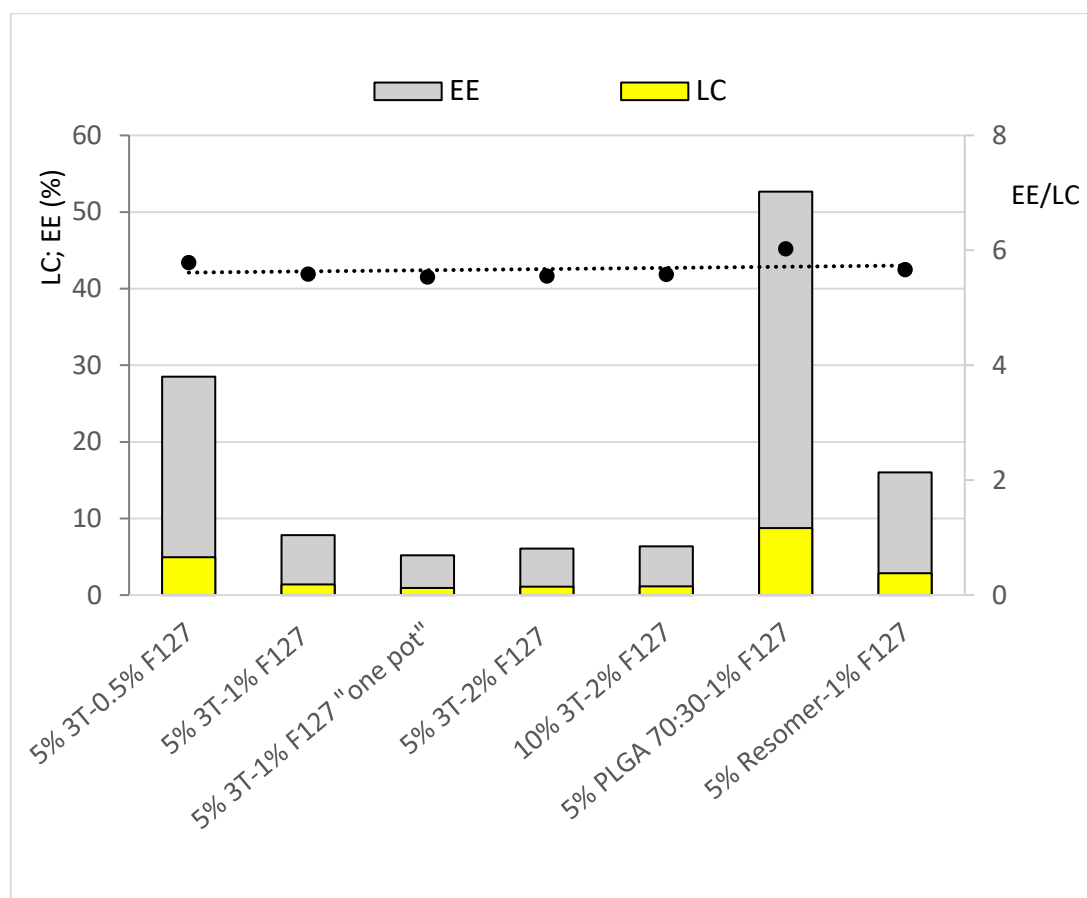
Obr. 20: Vliv typu a koncentrace polymeru a hodnoty pH vnější fáze na EE a LC



Enkapsulační účinnost byla v rozmezí 17 % až 53 % v závislosti na typu a koncentraci polymeru a pH vnější fáze. Je vidět významný vliv koncentrace polymeru, méně se uplatnil vliv konstituce polymeru a pH vnější fáze. Dle hodnot LC, které byly v rozmezí 3 % až 10 %, je zřejmé, že v nanočásticích výrazně převažuje polymerní nosič. Formulační faktory ovlivnily hodnoty LC stejně jako v případě EE. Poměr EE/LC je v úzkém rozmezí hodnot 5,5 až 6,0.

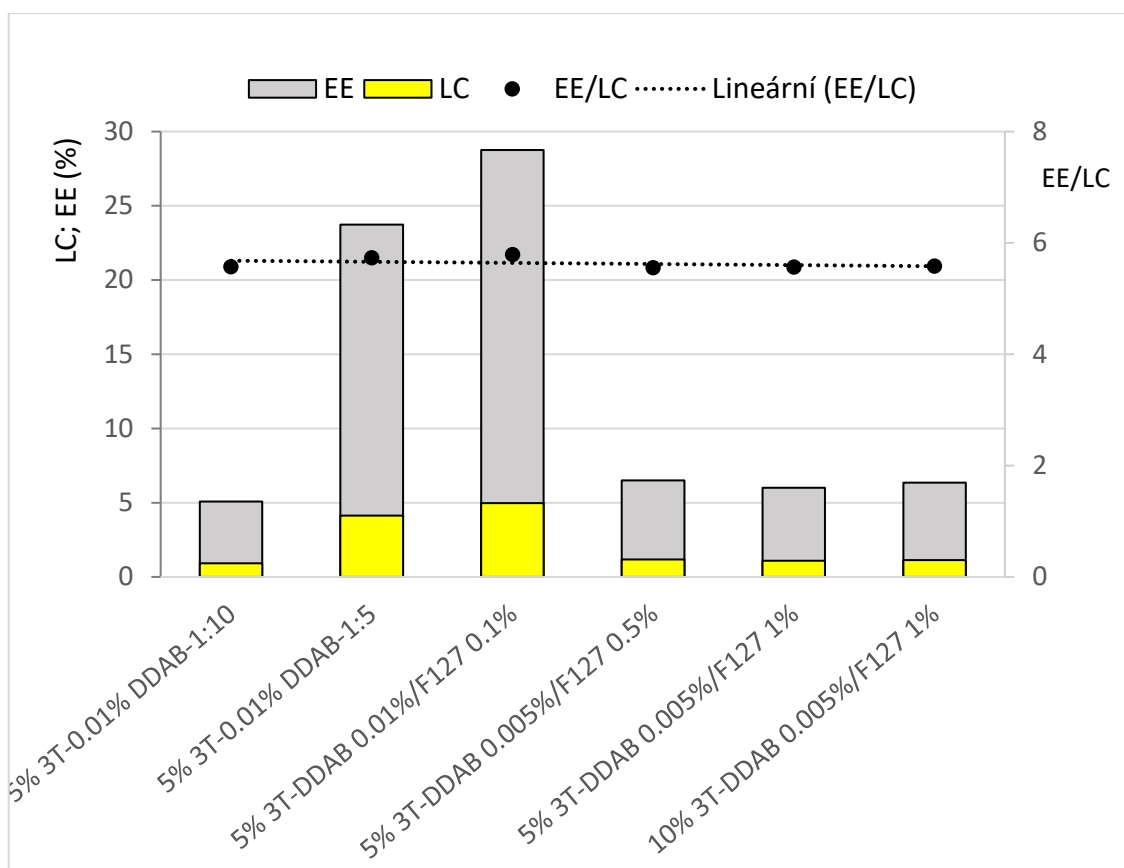
Zajímavý je vliv koncentrace poloxameru na EE a LC nanočástic (Tab. 14, Obr. 21). Nejvyšší hodnoty byly dosaženy při nejnižší použité koncentraci 0,5 %. Při použití vyšší koncentrace poloxameru nebo vyšší koncentrace polymeru došlo ke snížení EE a LC. Důvodem je pravděpodobně solubilizace rifampicinu. Vyšší hodnoty EE a LC u polymeru PLGA 70:30 lze vysvětlit jeho vyšší hydrofobicitou. Analogické výsledky byly získány při stabilizaci NP s rifampicinem za použití cetrimidu v dříve realizovaných experimentech.²

Obr. 21: Vliv koncentrace poloxameru 407 na EE a LC



Vliv kombinace neiontového a kationtového tenzidu na EE a LC je na Obr. 22. Vyšší hodnoty EE a LC byly dosaženy při použití 0,01% roztok DDAB a současném zvýšení poměru vnitřní a vnější fáze. Rovněž kombinace DDAB 0,01 % F127 0,1 % vedla k vyšší EE a LC (Tab. 15).

Obr. 22: Vliv kombinace poloxameru a DDAB na EE a LC

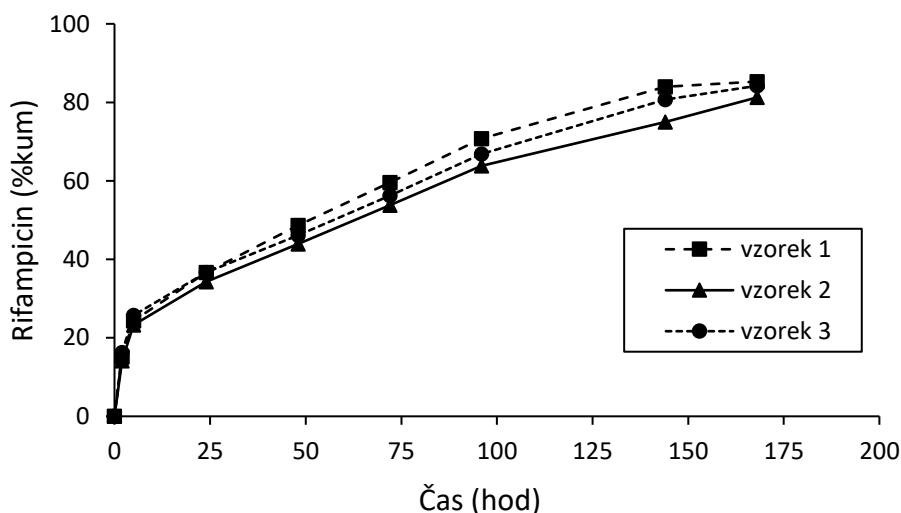


10.5 Liberace rifampicinu z nanočástic

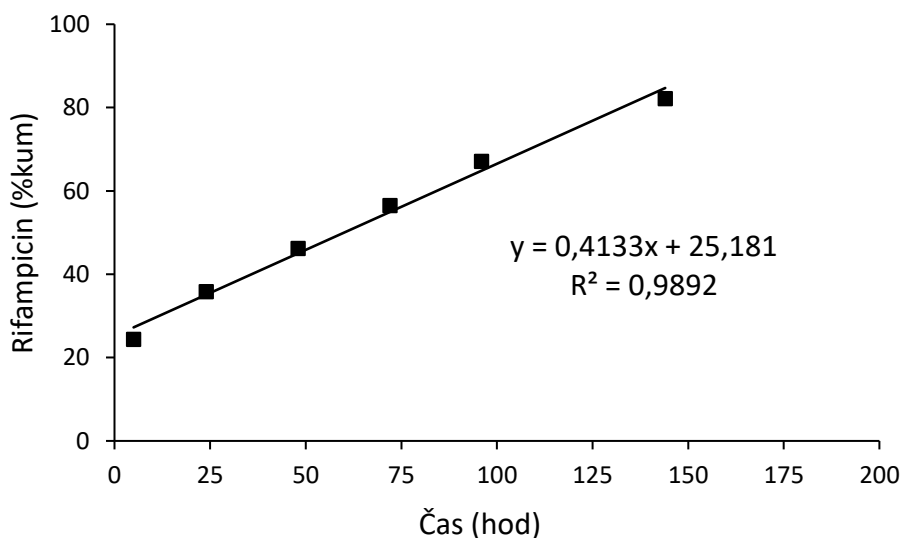
Liberace rifampicinu z polyesterových nanočástic nebyla v dosud realizovaných diplomových a rigorózních prací studována.^{1,2,72} Pro disoluční testy byly vybrány nanočástice tvořené větveným polyesterem 3T, použitým při nanoprecipitační metodě ve formě 5% roztoku v DMSO. Stabilizovány byly poloxamerem 407, jehož koncentrace ve vnější fázi byla 0,5 %. Tyto nanočástice měly velikost 280 nm, hodnota PDI byla 0,065; EE 28,5 % a LC 4,93 %.

Průběh liberace rifampicinu je znázorněn na Obr. 23. V počáteční fázi byl patrný relativně nízký burst efekt, kdy se za 5 hod uvolnilo přibližně 25 % rifampicinu. Liberační profil v počáteční fázi disoluce je dán rychlou disolucí léčiva vázaného na povrchu nanočástic. Následně až do 6. dne probíhala liberace lineárně a uvolnilo se přibližně 80 % enkapsulovaného rifampicinu (Obr. 24). Tato fáze závisí na průběhu eroze nanočástic a hydrolytické degradace polyesterového nosiče, které jsou ovlivněny velikostí NP, hodnotou LC, charakteristikami PLGA derivátu a pH prostředí. Celková doba liberace byla 7 dnů (Tab. 16a-c).

Obr. 23: Liberace rifampicinu z nanočástic tvořených polymerem 3T



Obr. 24: Lineární regrese disoluční křivky rifampicinu

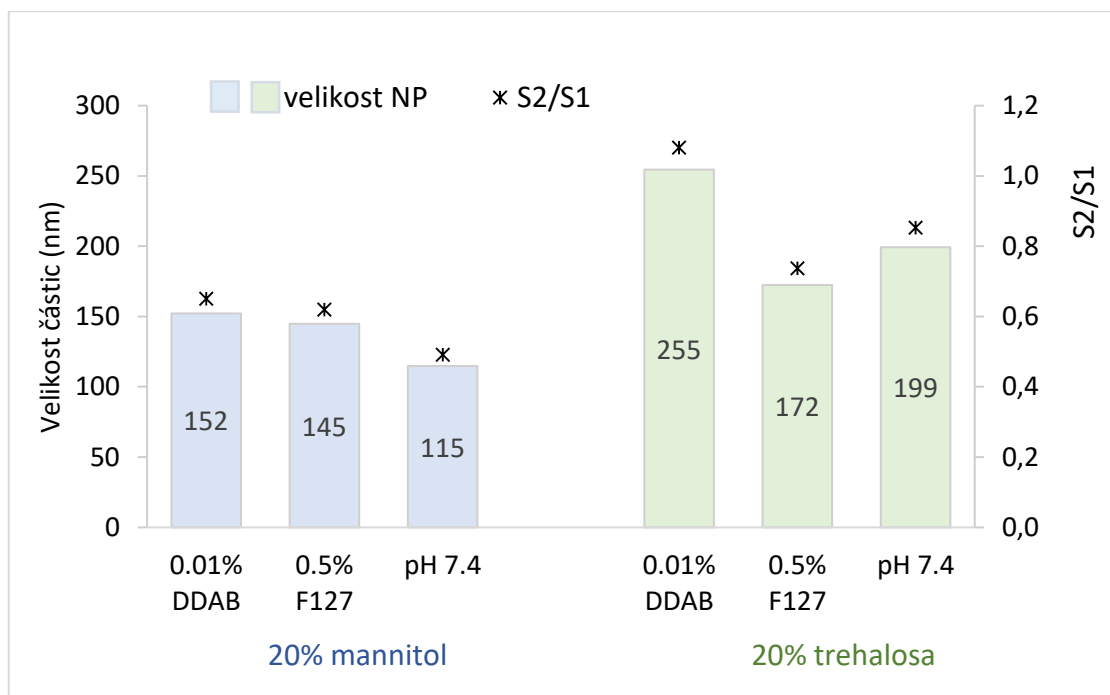


10.6 Charakteristiky rekonstituovaných lyofilizátů

Pro stabilizaci nanosuspenze lyofilizací byly vybrány nanočástice tvořené polyesterem 3T, použitým ve formě 5% roztoku v DMSO. Vnější fází byl při nanoprecipitační metodě pufr PBS 7,4. Nanočástice měly velikost 327 nm, PDI 0,27, zeta potenciál -52 mV, EE 53,9 % a LC 8,9 % (Tab. 8 a 13). Nanosuspenze byla centrifugována a byl přidán 20% roztok trehalosy nebo 20% roztok mannitolu ve funkci kryoprotektiva. Lyofilizace byla realizována na lyofilizátoru Freeze-Dryer Beta 1-8 LSCPlus ve firmě Povodí Labe státní podnik v součinnosti s prací Elišky Macákové.⁷¹

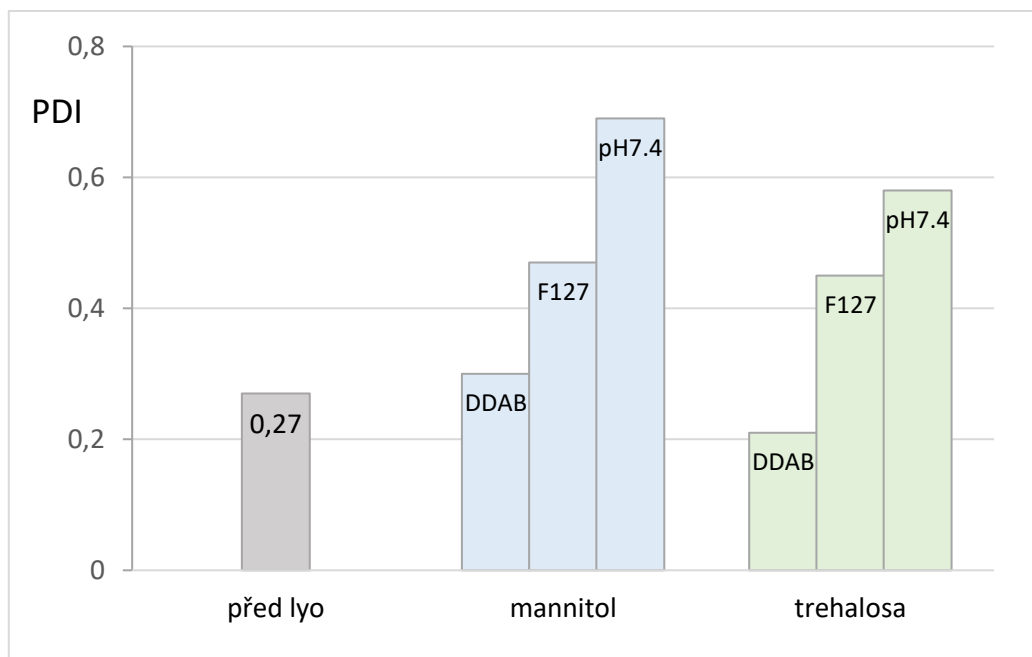
Důležitým ukazatelem kvality lyofilizátu je doba redispergace. Optimální je, pokud se lyofilizát rehydratuje ihned po přidání vodné fáze. Dlouhá doba rekonstrukce ukazuje na kolaps lyofilizátu. Lyofilizované nanočástice byly redispergovány v 0,01% roztoku DDAB, 0,5% F127 nebo PBS 7,4. Byla měřena velikost částic, PDI a zeta potenciál (Tab. 17-19, Obr. 25). Po redispergaci byly získány nanočástice o velikosti 115 nm až 255 nm. Byl vyjádřen poměr velikosti NP po lyofilizaci (S2) a před lyofilizací (S1), který by měl být v ideálním případě roven jedné.²⁵ Této hodnoty bylo dosaženo pouze rekonstitucí lyofilizátu stabilizovaného 20% roztokem trehalosy pomocí 0,01% roztoku DDAB ($S2/S1 = 1,08$). V ostatních případech byly nanočástice po redispergaci výrazně menší, zejména pokud byl ve funkci kryoprotektantu použit 20% roztok mannitolu. Důvodů může být celá řada, např. degradace polymeru, solubilizace, metodika redispergace, filtrace rekonstituovaného lyofilizátu před měřením na zeta sizeru aj. V dalších experimentech bude potřeba tyto faktory analyzovat.

Obr. 25: Velikost nanočástic po rekonstituci lyofilizátu a poměr velikosti nanočástic po lyofilizaci a před lyofilizací (S2/S1)



Proces lyofilizace lze považovat za úspěšný, pokud nedojde ke změně hodnoty indexu polydisperzity (PDI).²⁵ U polymerních NP se za kvalitní považuje soustava s hodnotou PDI nižší než 0,2. Hodnota PDI před lyofilizací byla 0,27, což není ideální. Po lyofilizaci byla zjištěna nižší hodnota PDI pouze pokud byl použit 20% roztok trehalosy jako kryoprotektivum a 0,01% roztok DDAB pro rekonstituci. Přibližně stejná PDI byla zjištěna v případě stabilizace 20% roztokem mannitolu a redispergace 0,01% roztokem DDAB. V ostatních případech byla polydisperzita výrazně vyšší, v rozmezí 0,45 až 0,69 (Obr. 26).

Obr. 26: Porovnání hodnot PDI nanočástic před lyofilizací a po rekonstituci v roztoku didodecyldimethylamonium bromidu (DDAB), poloxameru (F127) a pufru pH 7,4



11 ZÁVĚRY

Velikost nanočástic lze modifikovat celou řadou formulačních faktorů, ale zásadní vliv má koncentrace polymeru ve vnitřní fázi a molární hmotnost polymeru. Velikost částic ovlivňuje další parametry nanočástic, disoluční profil léčiva a celkový účinek polymerního částicového systému.

Překvapivě perspektivní pro formulaci nanočástic s rifampicinem nanoprecipitační metodou se ukázal polymer PLGA 70:30, a to z důvodu relativně nižší molární hmotnosti a vyšší hydrofobicity v porovnání s ostatními testovanými polymery. Byly získány nanočástice o velikosti 325 nm s výbornou hodnotou polydisperzity (PDI 0,1). Enkapsulační účinnost byla 53 % a množství léčiva v nanočásticích 9 %.

Pro stérickou stabilizaci nanočástic se za daných formulačních podmínek ukázal jako nejúčinnější 0,5% roztok poloxameru 407. Při použití DDAB pro elektrostatickou stabilizaci nanočástic byla účinná koncentrace DDAB 0,01 % při poměru fází 1:10. Kombinace poloxameru 407 a DDAB se neosvědčila.

Skenovací elektronovou mikroskopií byl prokázán sférický tvar nanočástic. Softwarově stanovená velikost nanočástic potvrdila výsledky získané metodou dynamického rozptylu světla.

Enkapsulační účinnost (EE) byla v rozmezí 17 % až 53 %. Je vidět významný vliv koncentrace polymeru, méně se uplatnil vliv konstituce polymeru a pH vnější fáze. Dle hodnot kapacity polymeru pro léčivo (LC), které byly v rozmezí 3 % až 10 %, je zřejmé, že v nanočásticích výrazně převažuje polymerní nosič. Poměr EE/LC je v úzkém rozmezí hodnot 5,5 až 6,0.

Liberace rifampicinu z větveného polyesteru 3T probíhala po dobu 7 dnů. V počáteční fázi byl patrný relativně nízký burst efekt, kdy se za 5 hod uvolnilo přibližně 25 % rifampicinu. Následně do 6. dne probíhala liberace lineárně a uvolnilo se přibližně 80 % enkapsulovaného rifampicinu.

Jako kryoprotektivum pro stabilizaci nanočástic lyofilizací lze doporučit 20% roztok trehalosy. Po rekonstituci lyofilizovaných nanočástic 0,01% roztokem DDAB byla získána stabilní nanosuspenze. Poměr velikosti částic po a před lyofilizací byl roven jedné a polydisperzita byla stejná jako před lyofilizací, což potvrzuje úspěšnost procesu lyofilizace.

12 LITERATURA

1. Balciarová, A.: *Formulácia a testovanie nanočastic z vetvených polyesterov s rifampicínom*. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2018, 86 s.
2. Mašek, J.: *Časticové medikované systémy*. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2017, 60 s.
3. Jyothi, N.V. et al.: *Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency*. J. Microencapsul. 27 (3) (2010) 187-197. ISSN 1464-5246 doi: 10.3109/02652040903131301
4. Martínez, R. et al.: *Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery*. Int. J. Pharm. 532 (1) (2017) 1-38 doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.064
5. Rao, J.P., Geckeler, K.E.: *Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters*. Prog. Polym. Sci. 36 (2011) 887-913 ISSN: 0079-6700 doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001
6. Morachis, J.M., Mahmoud, E.A., Almutairi, A.: *Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles*. Pharmacol. Rev. 64 (2012) 505–519 doi: 10.1124/pr.111.005363
7. Fessi, H., et al.: *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. Int J Pharm 55(1) (1989) R1-R4 [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)

-
8. Chidambaram M, Krishnasamy K.: *Modifications to the conventional nanoprecipitation technique: an approach to fabricate narrow sized polymeric nanoparticles*. Adv Pharm Bull. 4 (2) (2014) 205-208. doi:10.5681/apb.2014.030.
 9. Crucho, C.I.C., Barros, M.T.: *Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods*. Mater. Sci. Eng. C. 80 (2017) 771–784 doi: 10.1016/j.msec.2017.06.004
 10. Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., Cesaro, A.: *Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability*. Int. J. Pharm. 455 (2013) 219–228 doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.034
 11. Nguyen, T. Ch.: *In vitro nifedipine release from poly (lactic acid)/chitosan nanoparticles loaded with nifedipine*. Appl. Polym. Sci. 133 (2016) 43330 doi: 10.1002/APP.43330
 12. Alshammari, B.A., Kalevaru, V.N.: *Supported Gold Nanoparticles as Promising Catalysts* Edited by Neeraj Kumar Mishra, Intech Open, Catalytic Application of Nano-Gold Catalysts doi: 10.5772/64394 eBook (PDF) ISBN: 978-953-51-5449-5
 13. Kumar, R., Siril, P.F.: *Preparation and characterization of polyvinyl alcohol stabilized griseofulvin nanoparticles*. Materials Today: Proceedings 3 (6) (2016) 2261-2267 <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.04.135>
 14. Murakami, H. et al.: *Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles*, Powder Technol. 107 (2000) 137–143 doi: 10.1016/S0032-5910(99)00182-5

-
15. Wang, L. et al.: *Cryoprotectant choice and analyses of freeze-drying drug suspension of nanoparticles with functional stabilisers*. J. Microencapsul. 35(3) (2018) 241-248 doi:10.1080/02652048.2018.1462416
 16. Fonte, P. et al.: *Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying*. Biomatter 2 (4) (2012) 329–339 doi: 10.4161/biom.23246
 17. Almalik, A., Alradwan, I., Kalam, M.A., Alshamsan, A.: *Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating*. Saudi Pharm. J. 25 (2017) 861–867 <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.008>
 18. Lemoine, D.: *Stability study of nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone), poly (*D*, *L*-lactide) and poly (DL-lactide-coglycolide)*. Biomaterials 17 (1996) 2191–2197 [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)00049-X](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)00049-X)
 19. Coffin, M.D., McGinity, J.W.: *Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly (DL-lactide) and poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles in aqueous media*, Pharm. Res. 9 (1992) 200–205 <https://doi.org/10.1023/A:1018981222092>
 20. Belbella, A. et al.: *In vitro degradation of nanospheres from poly (DL-lactides) of different molecular weights and polydispersities*. Int. J. Pharm. 129 (1996) 95–102 [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04258-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04258-X)
 21. Zhang S. et al.: *Controllable drug release and simultaneously carrier decomposition of SiO₂-drug composite nanoparticles*. J Am Chem Soc. 135 (15) (2013) 5709-5716. doi:10.1021/ja3123015. PMID: 23496255

-
22. Alonso, M.J.: *Nanoparticulate drug carrier technology*, in: S. Cohen, H. Bernstein (Eds.), *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, Marcel Dekker, New York, 1996, 203–242
23. Wang, W.: *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals*. *Int. J. Pharm.* 203 (1–2) (2000) 1–60 doi: 10.1016/s0378-5173(00)00423-3
24. Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H.: *Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63 (2006) 87–94 doi: 10.1016/j.ejpb.2006.01.015
25. Abdelwahed, W. et al.: *Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1688–1713 doi: 10.1016/j.addr.2006.09.017
26. Chung, N.O., Lee, M.K., Lee, J.: *Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions*. *Int. J. Pharm.* 437 (2012) 42–50 doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.068
27. Searles, J.A., Carpenter, J.F., Randolph, T.W.: *The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf*. *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 860–871 doi: 10.1002/jps.1039
28. Li, J. et al.: *Influence of type and proportion of lyoprotectants on lyophilized ginsenoside Rg3 liposomes*. *J. Pharm. Pharmacol.* 68 (1) (2016) 1–13 doi: 10.1111/jphp.12489

-
29. Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H.: *Is trehalose special for preserving dry materials?* Biophys. J. 71 (1996) 2087–2093 doi: 10.1016/S0006-3495(96)79407-9
30. Arakawa, T. et al.: *Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins.* Adv. Drug Deliv. Rev. 46 (1-3) (2001) 307-326 doi: 10.1016/s0169-409x(00)00144-7
31. Bhatnagar, B.S., Pikal, M.J., Bogner, R.H.: *Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing.* J. Pharm. Sci. 97 (2) (2008) 798-814 doi: 10.1002/jps.21017
32. Sameti, M. et al.: *Stabilization by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery.* Int. J. Pharm. 266 (2003) 51–60 doi: 10.1016/s0378-5173(03)00380-6
33. Allison, S.D., Molina, M.D.C., Anchordoquy, T.J.: *Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis.* Biochim. Biophys. Acta 1468 (2000) 127–138 doi: 10.1016/s0005-2736(00)00251-0
34. Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H.: *A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): formulation and process optimization.* Int. J. Pharm. 17 (2006) 178–188 doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.003
35. Shaik, M.S.: *Long-circulating monensin nanoparticles for the potentiation of immunotoxin and anticancer drugs.* J. Pharm. Pharmacol. 53 (2001) 617–627 doi: 10.1211/0022357011775947

-
36. Hafner, A., Dürriegl, M., Ivan Pepič, I., Filipovič-Grčić, J.: *Short- and Long-Term Stability of Lyophilised Melatonin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles*. Chem. Pharm. Bull. 59 (9) (2011) 1117—1123 doi: 10.1248/cpb.59.1117
37. Jäger, A., Gärtnerová, V.: *Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura*. Fyzikální ústav Akademie věd ČR <https://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
38. Oh, K.S. et al.: *Formation of core/shell nanoparticles with a lipid core and their application as a drug delivery system*. Biomacromolecules 6 (2005) 1062–1067 doi: 10.1021/bm049234r
39. Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H.: *Freeze-drying of nanocapsules: impact of annealing on the drying process*. Int. J. Pharm. 324 (1) (2006) 74–82 doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.06.047
40. Dulieu, C., Bazile, D.: *Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying*. Pharm. Res. 22 (2005) 285–292 doi: 10.1007/s11095-004-1196-0
41. Alam, N. et al.: *Biodegradable polymeric system for cisplatin delivery: Development, in vitro characterization and investigation of toxicity profile*. Mater Sci Eng C 38 (2014) 85-93 doi: 10.1016/j.msec.2014.01.043
42. Wana, K.Y., Wongb, K.W., Chowa, A.H.L., Chowc, S.F.: *Impact of molecular rearrangement of amphiphilic stabilizers on physical stability of itraconazole nanoparticles prepared by flash nanoprecipitation*. Int. J. Pharm. 542 (1–2) (2018) 221-231 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.006>

-
43. Dostupné 6.5.2020
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Rifampicin#/media/Soubor:Rifampicin.svg>
44. Dostupné 6. 4. 2020 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifampicin>
45. Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová V., Zimčík, P.: *Farmaceutická chemie IV.*, 2. vydání Karolinum Praha 2012, 113-116
46. Srinivas, N.R.: *Pharmacokinetic Interaction of Rifampicin with Oral Versus Intravenous Anticancer Drugs: Challenges, Dilemmas and Paradoxical Effects Due to Multiple Mechanisms*. *Drugs R D*. 16 (2) (2016) 141-8. doi: 10.1007/s40268-016-0133-0
47. Dostupné 27. 1. 2020 <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01045>
48. Kasim, N.A. et al.: *Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification*. *Mol. Pharm.* 1 (2004) 85-96 doi: 10.1021/mp034006h
49. Agrawal, S. et al: *Assessment of bioequivalence of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels*. *Int. J. Pharm.* 233 (2002) 169-177 doi: 10.1016/s0378-5173(01)00939-5
50. Mariappan, T.T., Singh, S.: *Regional gastrointestinal permeability of rifampicin and isoniazid (alone and their combination) in the rat*. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 7 (2003) 797-803 PMID: 12921157

-
51. Agrawal, S., Panchagnula, R.: *Implication of biopharmaceutics and pharmacokinetics of rifampicin in variable bioavailability from solid oral dosage forms*. *Biopharm. Drug. Dispos.* 26 (2005) 321–334 doi: 10.1002/bdd.464
52. Snejdrova, E., Podzimek, S., Martiska, J., Holas, O., Dittrich, M.: *Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties*. *Acta Pharm.* 70 (2020) 63–75.
<https://doi.org/10.2478/acph-2020-0011>
53. Šnejdrová, E., Dittrich, M.: *Poly(alfa-hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv*. *Chem. Listy*, 105, 2011, 27-33
54. Dostupné 15. 1. 2020
<https://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/biomaterials/resomer/pages/controlled-release.aspx>
55. Dostupné 15. 4. 2020
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/719889?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_cooccuranceModel-_-prodMerch10-2
56. Dostupné 8. 2. 2020
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d2650?lang=en®ion=CZ&gclid=CjwKCAjw7-P1BRA2EiwAXoPWAw7DajQTePud1jWb2G8vF_ENZcviCMw-XYH9shEqNmkUQEeqXh6IMRoCJaEQAvD_BwE
57. Marren K.: *Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs*. *Phys Sportsmed.* 39 (3) (2011) 75-82 doi: 10.3810/psm.2011.09.1923

-
58. McPherson, M.L., Cimino, N.M.: *Topical NSAID formulations*. Pain Med. 14 (2013) 35-39. doi: 10.1111/pme.12288.
59. Rainsford, K.D, Kean, W.F., Ehrlich, G.E.: *Review of the pharmaceutical properties and clinical effects of the topical NSAID formulation, diclofenac epolamine*. Curr Med Res Opin. 24 (10) (2008) 2967-92 doi: 10.1185/03007990802381364.
60. Jeon, H.J. et al.: *Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics*. Int. J. Pharm. 207 (2000) 99–108 doi: 10.1016/s0378-5173(00)00537-8
61. Subedi, R.K., Kanga, K.W., Hoo-Kyun Choia, H.K.: *Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin*. Eur J Pharm Sci 37 (2009) 508–513 doi: 10.1016/j.ejps.2009.04.008
62. Český lékopis 2017, První vydání, Grada Publishing a.s., 2017, ISBN: 859-404-924-045-6
63. Sharma, A., Jain, Ch.P., Tanwar, S.Y.: *Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with poloxamer 188*. J. Chil. Chem. Soc., 58 (1) (2013) 1553-1557 <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072013000100012>
64. Le, T.M.P et al.: *Preparation of curcumin-loaded pluronic F127/chitosan nanoparticles for cancer therapy*. Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. 4 (2013) 1–4 doi:10.1088/2043-6262/4/2/025001
65. Nie, S. et al.: *Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell*

-
- cytotoxicity, and uptake studies.* Int J Nanomedicine. 6 (2011) 151–166 doi: 10.2147/IJN.S15057
66. Hsin, H.Y. et al.: *Self-assembling PVA-F127 thermosensitive nanocarriers with highly sensitive magnetically-triggered drug release for epilepsy therapy in vivo.* J. Mater. Chem. 22 (17) (2012) 8566-8573 doi: 10.1039/C2JM00032F
67. Dostupné 16. 4. 2020
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/359025?lang=en®ion=CZ>
68. Kusumoto, K., Ishikawa, T.: *Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) induces caspase-mediated apoptosis in human leukemia HL-60 cells.* J Control Release 147 (2) (2010) 246-52 doi: 10.1016/j.jconrel.2010.07.114
69. Gossmann, R., Spek, S., Langer, K., Mulac, D.: *Didodecyldimethylammonium bromide (DMAB) stabilized poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles: Uptake and cytotoxic potential in Caco-2 cells.* J Drug Deliv Sci Tec 43 (2018) 430-438 <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.11.002>
70. Labtools, *Tables for laboratory use.* Merck Germany 2017, 152 s. dostupné https://www.merckmillipore.com/Web-CZ-Site/cs_CZ/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201306.519
71. Macáková E.: *Formulace lyofilizovaných tablet pro orální aplikaci peptidů.* Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2020
72. Jaworski, J.: *Granulometrická charakterizace nanočástic metodou PCS.* Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2019, 108 s

-
73. Clogston, J.D., Patri, A.K.: *Zeta potencial measurements*. *Methods Mol Biol.* 69 (2011) 63-70 doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6
74. Zhang, J., et al.: *Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy*. *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 8483-8493 doi: 10.2147/IJN.S148359
75. Clemons, T.D.: *Distinction Between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy*. *Langmuir* 34 (50) (2018) 15343-15349 doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02946