

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



OPTIMALIZACE SEPARACE A PURIFIKACE
POLYMERNÍCH NANOČÁSTIC

Diplomová práce

Hradec Králové 2018

Jáchym Vencel

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

Jáchym Vencl, V Hradci Králové, 14. 5. 2018

Rád bych touto formou také poděkoval svým vedoucím diplomové práce. Díky patří Mgr. Janě Kubačkové za zasvěcení do problematiky a trpělivou pomoc při výzkumu v laboratoři. Dále děkuji PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za ochotu a poskytování rad a připomínek k dovedení této práce do zdárného konce. Nemalé díky patří také doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za syntézu PLGA polymerů použitých v této diplomové práci.

Obsah

1	ABSTRAKT	1
2	ABSTRACT.....	2
3	ZADÁNÍ.....	3
4	ÚVOD.....	4
5	TEORETICKÁ ČÁST	5
5.1	NANOTECHNOLOGIE	5
5.2	NANOČÁSTICE	6
5.2.1	<i>Typy nanočástic</i>	<i>6</i>
5.2.2	<i>Příprava polymerních nanočástic.....</i>	<i>8</i>
5.2.3	<i>Metody charakterizace nanočástic</i>	<i>13</i>
5.2.4	<i>Purifikační metody.....</i>	<i>14</i>
5.2.5	<i>Možnosti úpravy povrchu.....</i>	<i>15</i>
5.2.6	<i>Targeting.....</i>	<i>17</i>
5.2.7	<i>Mechanismy plnění a uvolňování léčiva</i>	<i>20</i>
5.3	BIOODBOURATELNÉ POLYMERY.....	23
5.3.1	<i>Druhy polymerů používaných pro enkapsulaci léčiv.....</i>	<i>23</i>
5.4	PLGA.....	26
5.4.1	<i>Syntéza</i>	<i>27</i>
5.4.2	<i>Strukturní obměny.....</i>	<i>28</i>
5.4.3	<i>Vlastnosti v drug delivery</i>	<i>29</i>
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
6.1	POUŽITÉ SUROVINY.....	31
6.1.1	<i>Bioodbouratelné PLGA polymery.....</i>	<i>31</i>
6.1.2	<i>Enkapsulované léčivo</i>	<i>33</i>
6.1.3	<i>Stabilizátory (poloxamery)</i>	<i>34</i>

6.1.4	<i>Polární a semipolární rozpouštědla</i>	35
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	36
6.3	POUŽITÉ METODY	38
6.3.1	<i>Analytické vážení – navážky</i>	39
6.3.2	<i>Nanoprecipitace – příprava nanočástic</i>	39
6.3.3	<i>Hodnocení nanočástic pomocí zetasizeru</i>	40
6.3.4	<i>Centrifugace – separace a purifikace nanočástic</i>	41
6.3.5	<i>Hodnocení nanočástic spektrofotometricky</i>	44
6.3.6	<i>Analytické vážení – hodnocení výtěžku nanočástic</i>	44
6.3.7	<i>Výpočty a zhodnocení</i>	44
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
7.1	NAMĚŘENÉ PARAMETRY	48
7.2	VLIV POUŽITÉHO PLGA POLYMERU	56
7.2.1	<i>lineární PLGA polymery</i>	56
7.2.2	<i>větvené PLGA polymery</i>	60
7.3	VLIV POUŽITÉHO STABILIZÁTORU	65
7.4	VLIV REDISPERGAČNÍHO MÉDIA	68
7.5	VLIV ČASU (DOBY) CYKLU CENTRIFUGACE	70
7.6	VLIV VELIKOSTI NANOČÁSTIC	72
8	ZÁVĚRY	73
9	POUŽITÁ LITERATURA	74

1 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitelé: Jana Kubačková, Ondřej Holas

Posluchač: Jáchym Vencl

Název diplomové práce: Optimalizace separace a purifikace polymerních nanočástic

Poly(mléčná-*co*-glykolová) kyselina (PLGA) je jedna z neúspěšnějších molekul, které byly vyvinuty pro biomedicínské využití. Největšími výhodami PLGA jsou její biodegradovatelnost, biokompatibilita a netoxičita¹. Byla povolena EMA (Evropská léková agentura) pro použití na lidech. Kvůli narůstajícímu počtu léčiv založených na bázi proteinu nebo nukleové kyseliny, roste poptávka po sofistikovaném doručovacím systému. Nanočástice vytvořené z PLGA představují přesně takový systém, schopný enkapsulovat širokou škálu léčiv².

V této studii byly zkoumány možnosti optimalizace separace a purifikace polymerních nanočástic s enkapsulovaným léčivem. Tyto částice byly připraveny metodou nanoprecipitace PLGA¹. Separace a purifikace částic probíhala pomocí několika cyklů centrifugace. Hodnotili jsme částice připravené z pěti různých druhů PLGA polymerů. Byly použity různé časy centrifugace pro zjištění nejvhodnější doby. Voda a dva typy stabilizátorů, každý ve dvou koncentracích, byly použity jako redispergační média. Modelovým léčivem byl zvolen Rhodamin B kvůli jeho snadnému hodnocení spektrofotometrií. Separované nanočástice byly hodnoceny hmotnostním výtěžkem (% RY) a enkapsulační efektivitou (% EE).

Nanočástice připravené v 1% Kolliphoru® P188 a separované ve vodě vykazovaly nejvyšší % EE. Částice připravené v Pluronicu® F-127 měly obecně vyšší % RY. Nejvhodnějšími polymery pro enkapsulaci se ukázaly být lineární PLGA 7/3 (LA/GA) a tripentaerythritolem větvený PLGA T1.

2 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Pharmaceutical technology
Consultants: Jana Kubačková, Ondřej Holas
Student: Jáchym Vencel
Title of Thesis: Optimization of polymeric nanoparticles separation and purification protocol

Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) is one of the most successful polymeric molecule invented for biomedical use. PLGA's biggest advantage lies in its biodegradability and nontoxicity¹. It has been approved by EMA for human use. Because of increasing number of protein or nucleic acid based drugs the need for sophisticated drug delivery systems grows. PLGA nanoparticles (NPs) present exactly such drug delivery system capable of encapsulating large variety of compounds².

Within this study we have researched optimization of separation and purification of drug loaded NPs. They were prepared by nanoprecipitation of PLGA¹. Separation and purification of NPs was done using multiple cycles of centrifugation. We evaluated purification of particles prepared from five different PLGA polymers. Different centrifugation times were applied to find the most effective way. Water and two types of stabilizers each one in two concentrations have been used as purification media. Rhodamine B was used as a model drug because of its simple quantification by spectrophotometry. Separated NPs were characterized by recovery yield (RY) of PLGA and encapsulation efficacy (EE).

NPs prepared in 1% Kolliphor® P188 and separated in water show the highest % EE. However, NPs produced and separated in Pluronic® F-127 have generally higher % RY. As the most suitable polymers for Rhodamine B encapsulation proved linear PLGA 7-3 (LA-GA) and tripenaerythritol-branched PLGA.

3 Zadání

Centrifugace je jednou z nejčastěji používaných metod pro odstranění nadbytečného surfaktantu, neenkapsulovaného léčiva a jiných rozpustných nečistot ze surové nanosuspenze polymerních částic. Parametry centrifugace publikované v literatuře se však dosti zásadně liší. Cílem této práce bylo nalezení optimálního nastavení purifikačního protokolu pro nanočástice připravené z různých polymerních materiálů založených na poly-laktid-*co*-glykolidu. Optimálnost nastavení byla hodnocena na základě enkapsulační efektivity pro modelovou látku a výtěžnosti celého procesu.

4 Úvod

Nanotechnologie je poměrně novým vědeckým a technickým oborem. Má potenciál stát se hlavním směrem výzkumu 21. století. Mohla by přispět k řešení mnoha celosvětových a ekologických problémů. Bioodbouratelné polymery představují velice perspektivní materiál do budoucna. V dnešním světě zaplaveném nerozložitelnými plasty jsou nadějí ve vztahu člověka k přírodě. I na poli biomedicínské technologie zaujímají nové nekonvenční postavení. Jejich první použití, kdy byly uplatněny jako rozložitelná chirurgická šicí vlákna, odstartovalo kaskádu nápadů na další využití v medicíně.

Momentálně nejvýznamnějším využitím bioodbouratelných polymerů a tím je tvorba nanočástic. Částice jsou totiž schopny do svého objemu zakomponovat určité množství účinné látky. S rostoucím počtem nových léčiv proteinové nebo nukleotidové povahy, které jsou v těle nestabilní a málo kdy se dostanou na místo určení v nezměněné podobě, bylo třeba vymyslet nový způsob podání a dopravy. Tyto částice představují novou možnost dopravení léčiva na místo potřeby v původním nezměněném stavu. Navíc jsou nanočástice novou lékovou formou schopnou upravit mimo jiné profil uvolňování účinné substance ze svého nosiče, zvýšit biodostupnost, účinnost a specifitu. Dále díky nim můžeme také snížit dávky léčiva, nežádoucí účinky a toxicitu pro organismus. Nanočástice představují budoucnost v doručování léčiv na místo potřeby a vytvářejí prostor pro další zkoumání.

5 Teoretická část

5.1 Nanotechnologie

Nanotechnologie je nový technický obor, který se zabývá nanomateriály (velikost řádově desítky až stovky nanometrů). Nanotechnologii je často připisován „převratný“ nebo „revoluční“ potenciál, v kontextu jejího možného dopadu na postupy průmyslové výroby. Vývojem menších, lehčích, rychlejších a výkonnějších materiálů, konstrukčních částí a systémů nabízí nanotechnologie řešení mnoha současných problémů. Díky tomu otevírá nové možnosti pro vytváření pracovního uplatnění. Rovněž se očekává, že významně přispěje k řešení globálních a ekologických problémů tím, že přinese výrobky a procesy s konkrétnějším využitím, ušetří zdroje a sníží množství odpadů a emisí³.

Nanotechnologie je považována za hlavní technologii 21. století. Může vnést světlo do mnoha současných problémů prostřednictvím menších, lehčích, rychlejších a výkonnějších materiálů, komponent a systémů. Nanotechnologie vytváří nové tržní příležitosti a může rovněž významně přispět k ochraně životního prostředí a zdraví³.

5.2 Nanočástice

Nanočástice se v poslední době stávají důležitou a velice perspektivní součástí výzkumu nosičů léčiv. Kvůli rychle narůstajícímu počtu léčiv, jež jsou založeny na bázi proteinu nebo nukleové kyseliny, roste poptávka po sofistikovaném doručovacím systému. Nanočástice představují přesně takový systém, který je použitelný jako nosič a zároveň schopný enkapsulovat širokou škálu léčiv². V případě léčiv biologické povahy jsou nanonosiče ideální, protože dokáží zamezit jejich styku s prostředím, kde by jinak mohla degradovat na neúčinné. Enkapsulováním léčiva do částice je možné zvýšit biodostupnost, účinnost, specifitu léčiva a tím i terapeutický index. Zároveň takto snižujeme potřebnou dávku léčiva, nežádoucí účinky a tím pádem i toxicitu pro organismus¹. Dále je také možno upravit farmakokinetický profil léčiva a zprostředkovat tak jeho prodloužené uvolňování. Další výhodou nanočástic je právě jejich schopnost procházet skrze epiteliální bariéry díky jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem. Velikost je důležitý parametr pro jejich distribuci do určitých tkáňových struktur organismu. Tyto vlastnosti dávají nanočásticím značnou výhodu ve srovnání s konvenčními formami aplikace.

5.2.1 Typy nanočástic

Nanočástice jsou obecně částice jakékoliv povahy, ať už organické či anorganické, které dosahují rozměrů v řádech nanometrů (cca 1–1000 nm). Mohou to být agregáty kovů, makromolekul, polymerů apod. Jejich využití je čím dál tím větší. Můžeme je najít ve strojírenství, chemickém průmyslu či v medicíně. Právě ty používané v medicíně jsou objektem zájmu této práce, přesněji ty s potenciálem ve farmakoterapii. Tyto nanočástice se dělí na několik základních typů⁴:

- | | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| 1) fullereny | (fulleren C ₆₀ : 0,7 nm) |
| 2) dendrimery | (1,5–10 nm) |
| 3) liposomy | (20–300 nm) |
| 4) polymerní nanočástice | (cca 50–600 nm) |

1) fullereny

Alotropicky modifikované sloučeniny uhlíku. Název vychází z kulovitého fullerenu, jehož struktura připomíná tvar „fotbalového míče“. Jsou to stabilní, avšak elektronově deficitní polyeny. Typická reakce je tedy elektrofilní adice. Z toho vyplývají jejich antibakteriální a antioxidační vlastnosti. Předpokládá se, že by díky schopnostem vycytávat volné radikály, mohly sloužit jako „léky proti stárnutí“⁴.

2) dendrimery

Mezi další nanočástice patří dendrimery. Ty jsou schopné odpovídat na určité prostředí nebo stimuly^{5, 6}. Mezi tyto spouštěcí reakce patří například podněty fyzikální, fyzikálně chemické, iontové, molekulové (receptory) či enzymatické (hydrolýza)⁵. V případě dendrimerů jsou to nejčastěji stimuly na úrovni změny pH, fotosenzitivní reakce a redukce nitroskupiny. Dendrimery jsou makromolekuly s větvenou strukturou, která je na rozdíl od polymerních částic přesně definovaná. Mají značný počet funkčních skupin na povrchu a také velký prostor uvnitř molekuly. To jim umožňuje uskladnit účinnou látku uvnitř (nekovalentními vazbami) a pomocí výběžků, takzvaných dendritů, se vázat na určité receptory v těle⁶. Mohou také vytvářet mezičlánek ke kovalentním polymerním konjugátům s léčivou na jedné straně a k fyzikálně uzavřeným léčivům v částicích na straně druhé⁵.

3) lipozomy

Podobně jako dendrimery i lipozomy reagují na určité stimuly. Jedná se o vezikuly lipidové povahy, přesněji je jejich povrch tvořen fosfolipidovou dvojvrstvou. Největší uplatnění našly jako nosiče léčiv⁷. Jsou schopny nést hydrofilní léčivo ve svém lumen, které je také hydrofilní povahy. Nicméně i léčiva hydrofobní mohou být transportována lipozomy a to uvnitř jejich fosfolipidové membrány, která je zde povahy lipofilní. Jsou připraveny z přírodních lipidů, díky tomu jsou biodegradovatelné a biokompatibilní⁵. Jsou lipofilní povahy, proto jsou schopny přestupovat přes membrány a doručit tak hydrofilní léčiva do míst, kam by se za normálních okolností nedostala. Jejich povrch může být také modifikován za účelem úpravy

fyzikálně-chemických vlastností. Jednou z prvních úprav bylo připojení hydrofilních polymerů k povrchu lipozomu. Podařilo se tak prodloužit jejich cirkulaci v krevním řečišti při parenterální aplikaci. Jsou to perspektivní částice, jejichž formulací se dnes zabývá spousta vědců z celého světa⁷.

4) Polymerní nanočástice

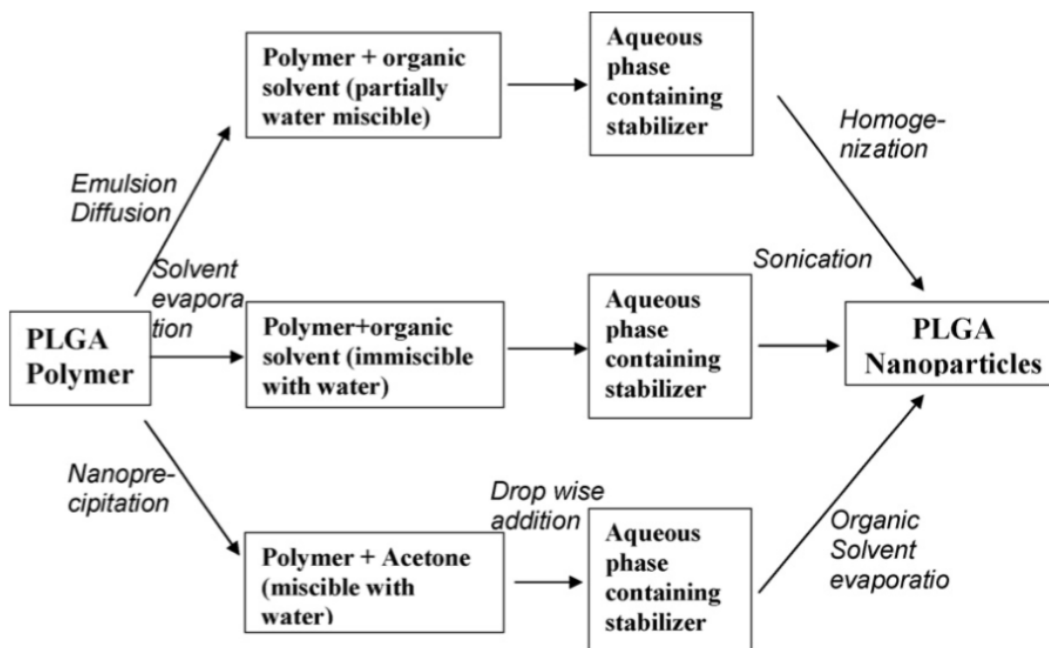
Tento typ částic je v dnešní době jedním z nejperspektivnějších. Jsou formulovány pomocí polymeru. Tento polymer je zpravidla biokompatibilní a bioodbouratelný. Podle stavby se dělí na nanosféry a nanotobolky. Nanosféry jsou matricové systémy, kde je léčivo adsorbováno na povrch nebo dispergováno v celém objemu. Oproti tomu nanotobolky jsou vezikuly, které mají oddělené jádro a stěnu tvořenou polymerem⁵.

Polymerní nanosféry jsou podstatou této práce, a proto budou další části věnovány právě nanočásticím tvořeným bioodbouratelnými polymery.

5.2.2 Příprava polymerních nanočástic

Existuje mnoho metod pro přípravu nanočástic. Je také spousta různorodých metod, jak zakomponovat účinnou látku do částice. Děje se tak za pomoci fyzikálně-chemických vlastností léčiva a polymeru. Léčivo může být zachyceno například v polymerní matrix, enkapsulováno v jádře částice anebo obklopeno schránkou membránové povahy. Další možností zachycení léčiva polymerem je chemická vazba léčiva na polymer nebo navázání léčiva na povrch částice pomocí adsorpce⁸. Při každé z těchto metod jsou potřeba tři základní ingredience: polymer, rozpouštědla a enkapsulovanou látku. Často se také přidává stabilizátor.

Částice jsou ve všech dále zmíněných metodách tvořeny z polymeru, který byl již syntetizován předem. Existuje ale možnost přípravy nanočástic z monomerů bioodbouratelného polymeru. Tato příprava probíhá procesem zvaným **polykondenzace**. Výsledná velikost takto připravených částice je podobná té velikosti částic z polymerů. Částice dosahují velikosti 200–300 nm.



obr. 1: nejčastější používané metody pro přípravu nanočástic z PLGA¹

Metody přípravy polymerních nanočástic mohou být rozděleny:

- 1) z předem připravených polymerů
 - a) emulzní
 - i) s chlorovanými rozpouštědly
 - emulzní metoda
 - dvojitá emulzní metoda
 - ii) bez chlorovaných rozpouštědel
 - emulgace-difuze
 - vysolování
 - b) neemulzní
 - nanoprecipitace
2. polykondenzace nanočástic z monomerů

1) Emulzní metoda

Emulzní metoda je ze všech nejběžnější. Tento způsob přípravy je úspěšný zejména pro enkapsulaci **lipofilních** molekul, avšak často neúspěšný pro účinné látky hydrofilní povahy, protože dochází k jejich rychlé difuzi do vnější vodné fáze⁸. Vzniklá emulze je tedy povahy **o/v**.

Postup přípravy:

První fáze metody spočívá v rozpuštění polymeru a účinné látky pro enkapsulaci v **organickém** rozpouštědle, které není mísitelné s vodou^{8, 9}. Pro PLGA polymery, jež jsou stěžejní pro tuto práci se nejčastěji používá dichlormethan. Emulze se vytvoří přidáním vodného roztoku surfaktantu do organické fáze s polymerem a léčivem⁹. Ve většině případů jsou kapky polymeru vytvářeny pomocí ultrazvuku nebo homogenizátoru. Vzniknou tak drobné nanočástice. Organické rozpouštědlo je posléze odpařeno.

2) Dvojitá emulzní metoda

Modifikací předchozí metody přípravy nanočástic vznikl nový postup, který byl uzpůsoben pro enkapsulaci **hydrofilních** léčiv⁸. Emulze vzniklá touto metodou je povahy **v/o/v**.

Největším problémem dvojité emulzní metody je rychlá difúze hydrofilního léčiva, povahy proteinu nebo peptidu, do vnější vodné fáze během emulgace. Tento problém může snížit enkapsulační efektivitu a drug-load na minimum⁸.

Postup přípravy:

V první kroku se rozpustí účinná látka a stabilizátor ve vodě. Primární emulze vzniká při dispergaci vodné fáze (léčivo, stabilizátor) do organického fáze, která obsahuje rozpuštěný polymer. Dále následuje sekundární emulgace. Vzniklá směs je znovu

emulgována do vodné fáze (vnější) s obsahem stabilizátoru. V dalším kroku následuje odpaření organického rozpouštědla a purifikace vzniklých nanočástic¹⁰.

Metoda 1) a 2) nejsou však tolik vhodné pro enkapsulaci biologických léčiv například proteinů. Tyto postupy totiž používají chlorovaná toxická rozpouštědla. Při kontaktu rozpouštědla s léčivem biologické povahy může být léčivo denaturováno. Kvůli tomu byla snaha vyvinout další metody přípravy, které by zvyšovaly stabilitu nanočástic během přípravy. Proto vznikly následující postupy:

3) Emulgace-difuze

Jednou z metod, jež nepoužívá chlorovaná toxická rozpouštědla, je princip emulgace-difuze. Může zde být použit například částečně ve vodě rozpustný propylenkarbonát, dimethylsulfoxid nebo aceton⁸.

Postup přípravy:

První fáze postupu spočívá v rozpuštění polymeru a účinné látky v semipolárním rozpouštědle. Roztok je poté emulgován do vodné fáze se stabilizátorem. Stabilizátor potom zabraňuje agregaci vzniklých emulzních kapének, tím že se adsorbuje na povrch těchto vznikajících nanočástic. Dále je přidána voda, aby mohla proběhnout difúze semipolárního rozpouštědla do vody. Za stálého míchání vede tento postup k nanoprecipitaci částic. Poté jsou částice purifikovány a separovány⁸.

4) Vysolování

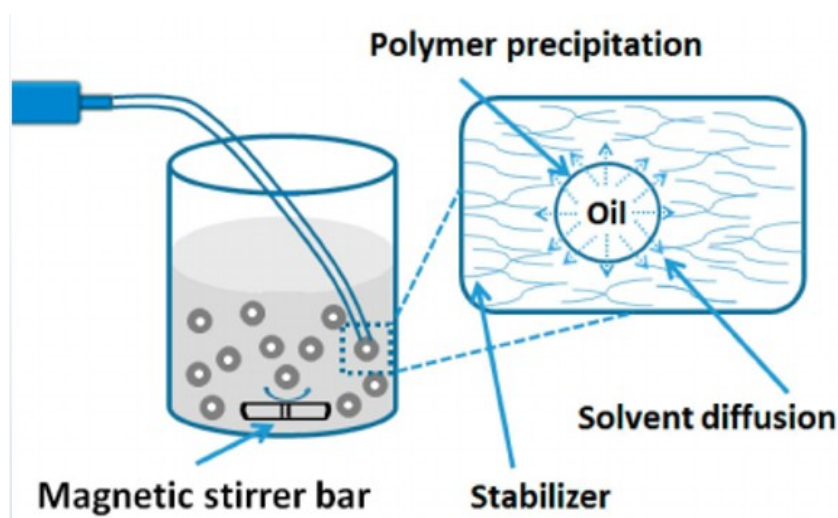
Další metodou založenou na emulgaci je vysolování organického rozpouštědla^{8, 9, 10}. Jako předchozí postup i tento nepoužívá chlorované molekuly. Jako vysolovací činidla se používá například chlorid hořečnatý či vápenatý. Jsou schopny vyvézt organické rozpouštědlo z emulzního systému². Avšak kvůli reaktivní povaze solí není metoda vhodná pro enkapsulaci mnoha účinných látek⁸.

Postup přípravy:

V prvním kroku jsou polymer a účinná látka rozpuštěny v organickém rozpouštědle. Roztok je potom vpraven do vodné fáze obsahující vysolovací činidlo a stabilizátor. Vzniklá emulze je posléze zředěna dostatečným množstvím vody nebo vodné fáze, kdy do ní aceton difunduje. Tento proces spustí tvorbu nanočástic.

5) Nanoprecipitace

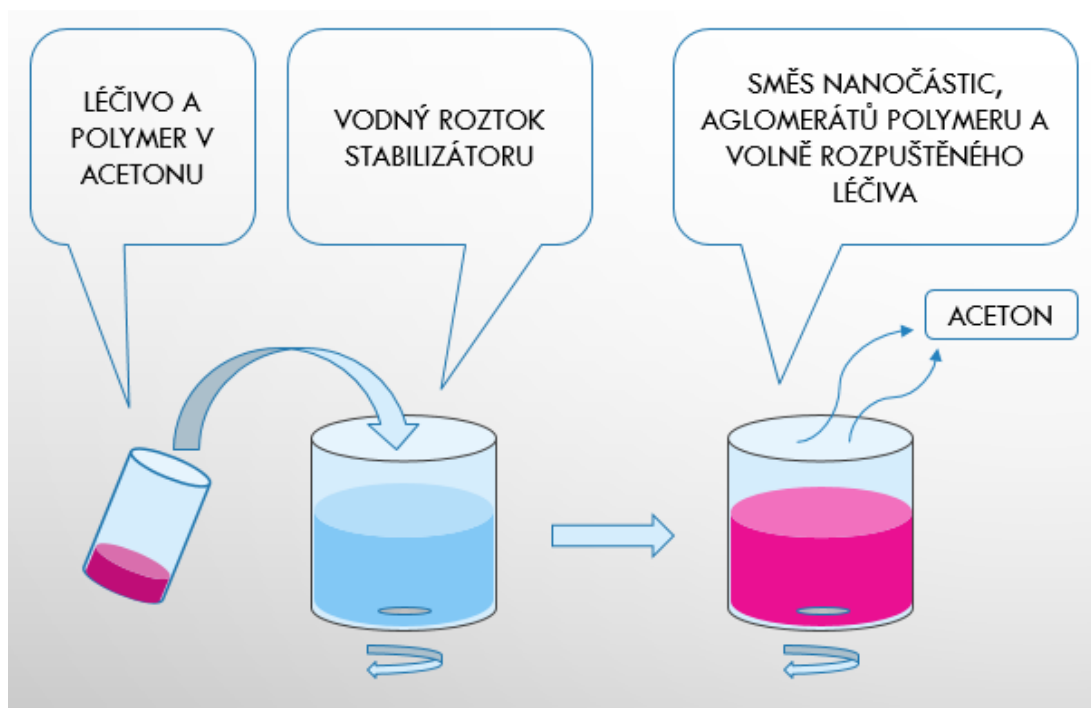
Nanočástice mohou být připraveny také pomocí metody zvané nanoprecipitace. Tato **neemulzní** metoda je nejběžnějším postupem používaným pro přípravu nanočástic z poly(mléčné-co-glykolové) kyseliny (PLGA)^{1, 9, 10}. Také se při ní používají nechlorovaná rozpouštědla. Principem je použití dvou rozpouštědel, v jednom je polymer rozpustný, v druhém není^{2, 9, 10}. Rozpouštědla musejí být vzájemně mísitelná. Nejčastějšími rozpouštědly jsou aceton a voda. Při přípravě dochází k difuzi acetonu do vodného prostředí (*obr. 2*), tím snížení rozpustnosti polymeru, což vede k jeho precipitaci do podoby nanočástic s enkapsulovaným léčivem. Vznikají částice s úzkou distribuční křivkou velikosti, což je její nesporná výhoda^{8, 11}.



obr. 2: princip nanoprecipitace – difuze dvou mísitelných rozpouštědel

Postup přípravy:

Polymer a účinná látka jsou rozpuštěny v acetonu. Potom je vzniklý roztok přidáván po kapkách do vodné fáze (obsah stabilizátoru není podmínkou) za stálého míchání na magnetické míchačce. Potom, co polymer s léčivem precipituje do formy nanočástic, je ze směsi v digestoři nebo za sníženého tlaku odpařen aceton (*obr. 3*).



obr. 3: postup při nanoprecipitaci – příprava surové nanosuspenze

5.2.3 Metody charakterizace nanočástic

Velikost a povrchový náboj (zeta potenciál) nanočástic hrají důležitou roli v jejich chování *in vivo*. Tyto parametry mají zásadní vliv na distribuci a také profil uvolňování účinné substance² (viz kapitola 5.2.6 Targeting). Pro měření parametrů se používají různé metody jako například dynamický rozptyl světla¹² nebo transmisní elektronová mikroskopie.

1) Hodnocení pomocí zetasizeru

Nejběžnější postup pro hodnocení velikosti a zeta potenciálu nanočástic se provádí pomocí přístroje zetasizer¹³. Ten je schopen na základě **dynamického rozptylu světla** měřit velikost a index polydisperzity¹⁴.

Zetasizer je také používán pro měření zeta potenciálu nanočástic. Přístroj k tomu využívá laserovou dopplerovskou elektroforézu¹³. Vzorek s nanočásticemi je přenesen do kyvety s elektrodami. Částice pak migrují k pólům podle svého povrchového náboje (zeta potenciálu).

2) Hodnocení pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM)

Pomocí TEM můžeme měřit velikost a morfologii nanočástic¹⁵. Metoda je podobná světelné mikroskopii, na rozdíl od ní však používá elektrony namísto světelných fotonů.

5.2.4 Purifikační metody

Důležitou součástí přípravy nanočástic je jejich separace a purifikace. Po přípravě nanočástic vznikne surová heterogenní nanosuspenze. Její frakce je třeba oddělit, aby vznikla homogenní směs částic. Existuje mnoho postupů, kterými je možné separovat nanočástice podle jejich velikosti nebo tvaru. Jsou to například filtrace, centrifugace, size-exclusion chromatografie nebo centrifugace podle hustotního gradientu¹⁶.

1) Crossflow filtrace

Oproti klasické filtraci má crossflow metoda mnoho výhod. Při klasické filtrem procházejí částice menší, než jsou póry. Větší částice postupně ucpávají póry a snižují tím účinnost filtrace. Tento problém se vyřeší pouze výměnou filtru. Při crossflow filtraci je disperze přiváděna k filtru tangenciálně za zvýšeného tlaku. Přes póry tak mohou projít jen menší částice a ty větší je neucpávají¹⁷. Přesto však není

příliš vhodná pro separaci nanočástic. Kvůli zvýšenému tlaku mohou procházet i částice o trochu větší. To je způsobeno deformací nanočástic, která není žádoucí¹⁶.

2) Size-exclusion chromatografie

Tato metoda separuje nanočástice na základě jejich hydrodynamického objemu. Stacionární fáze v koloně je vyrobena z hydrofilního polymerního gelu s póry. Jak částice procházejí kolonou, menší se zachytávají v pórech, zatímco větší procházejí rychleji. Je používána nejčastěji pro separaci nanočástic od látek v nich enkapsulovaných¹⁶.

3) Centrifugace podle hustotního gradientu

Tímto druhem centrifugace je možno separovat nanočástice nejen podle velikosti, ale i tvaru na základě vyšší hustoty nesférických částic ve srovnání se sférickými¹⁶.

4) Diferenciální centrifugace

Diferenciální centrifugace je jednou z nejběžnějších metod v biomedicínském výzkumu. Je ideální pro separaci směsí podle velikosti a hustoty, kde je potřeba oddělit několik frakcí ve vzorku. Postupuje se tak, že vzorek nanosuspenze je centrifugován v několika cyklech¹⁶. Mezi každým cyklem jsou částice vyjmuty a redispergovány v supernatantu. Tento typ centrifugace byl v optimalizované formě aplikován v experimentální části.

5.2.5 Možnosti úpravy povrchu

Největším současným problémem cíleného transportu léčiva pomocí nanočástic je aktivace vlastního imunitního systému organismu. Tělo rozpoznává hydrofobní částice jako cizí, a proto jsou rychle odstraněny⁸. Oponizace je proces navázání látek na cizorodou látku, a to vede k rychlejšímu rozpoznání imunitním systémem. Makrofágový retikuloendoteliální systém (RES) dokáže takto fagocytovat částice před tím, než dosáhnou cíle¹⁸. Pokud tedy není makrofágový nebo lymfatický systém

(játra, slezina) cílem účinku enkapsulovaného léčiva, je potřeba upravit povrch částic tak, aby nebyly tak rychle odbourávány. Toho docílíme tím, že zvýšíme hydrofilitu povrchu. Takto upravené nanočástice nejsou tak rychle rozpoznávány RES. Tak se sníží clearance částic na minimum. Zároveň se zeta-potenciál povrchu částic posune do zápornějších hodnot a tím je zvýšena i jejich stabilita. Prodlouží se cirkulace částic v krevním řečišti, takže se zlepší prodloužené uvolňování účinné látky do systému⁸. Tato odpověď organismu se však stává výhodou tehdy, když je enkapsulovaným léčivem látka, která má za úkol cílit na retikuloendoteliální systém¹⁹. Příkladem typů takto použitých účinných látek mohou být imunosupresiva či protizánětlivá léčiva.

Nejlepší výsledky úpravy povrchu pro zpomalení opsonizace vykazují dlouhé řetězce hydrofilních polymerů a neionické surfaktanty². Nejběžnější a nejdéle používanou modifikací povrchu je úprava polyethylenglykolem (PEG)^{2, 8, 20}. Zároveň se tak dosahuje nejlepších výsledků. Polyethylenglykol je extrémně hydrofilní a bez jakéhokoliv náboje. Díky tomu chrání lipofilní částice před krevními proteiny, enzymy a makrofágy^{2, 8, 21}. Modifikace prostřednictvím molekuly chitosanu zvýší propustnost částic přes slizniční povrchy^{8, 22}. Úprava prostřednictvím polysorbátu 80 výrazně zvýšila propustnost částic přes hematoencefalickou bariéru².

Jak již bylo zmíněno, pro modifikaci povrchu se používají různé hydrofilní molekuly. Pro názornou představu o tom, jaké molekuly se používají, byly připojeny názorné příklady modifikátorů⁸:

- polyethylenglykol (PEG)
- poloxamer 407
- poloxamin 908
- chitosan
- polysorbát (tween) 80

Úprava povrchu hydrofilní polymerní molekulou má nesporné výhody:

- Proloužení cirkulace částic v krevním řečišti
- prodloužení uvolňování léčiva
- zlepšení stability částic
- zlepšení permeačních vlastností částic
- snížení opsonizace (aktivace RES, fagocytózy)
- snížení clearance částic z organismu

Další možností úpravy povrchu je modifikace pro aktivní targeting. Na povrch nanočástice můžou být připojeny molekuly zacílené na určité struktury organismu (ligandy). Mohou to být protilátky nebo jiné specifické rozeznávací molekuly². Tomuto tématu je věnována následující kapitola 5.2.4. Targeting.

5.2.6 Targeting

Targeting neboli cílená distribuce léčiva je nejdůležitějším objektem zkoumání vlastností nanočástic. Parametry nanočástic jsou upravovány, tak aby částice s léčivem dosáhla cílové destinace. Důležitými parametry pro targeting jsou:

- použitý druh polymeru
- velikost nanočástice
- úprava povrchu
- náboj povrchu
- cesta podání

V cílené distribuci léčiv rozlišujeme dva základní typy targetingu: aktivní a pasivní targeting. Při aktivní cílené distribuci jsou na povrch nanočástice připojeny ligandy zacílené na určité struktury organismu. Mohou to být protilátky, aptamery nebo jiné specifické rozeznávací molekuly^{1, 2}. Tyto ligandy mají selektivní afinitu k určitým

receptorům, které například vpustí nanočástici do buňky, aby zde následovně uvolnila účinnou látku^{2, 23}. U pasivního targetingu dosáhne léčivo svého cíle jen na základě fyzikálně-chemických vlastností svého nosiče, tedy polymerní nanočástice².

1) Aktivní targeting

Aktivní targeting je tedy zprostředkován úpravou povrchu nanočástic rozpoznávacími molekulami^{2, 23}. Specifickými ligandy mohou být peptidy, protilátky, nukleové kyseliny (aptamery) nebo jiné malé molekuly^{1, 2, 24}. Upravené částice jsou následně schopné navázat se na cílové receptory a uvolnit léčivo v místě potřeby²³.

Existuje několik metod, jak připojit ligandy na povrch částice. Obecně se dělí na kovalentní a nekovalentní. Nekovalentní vazba je však často problémová. Ligandy mohou být snadno přemístěny nebo navázány plazmatickými proteiny, což je značná nevýhoda². Kovalentní vazby jsou mnohem stabilnější a díky tomu molekuly dosahují potřebné specifity.

Zavedením ligandu na povrch nanočástice se zvýší specifita a účinnost obsaženého léčiva. Zároveň se sníží nežádoucí účinky a toxicita pro organismus. Aktivní targeting nanočástic má potenciál zejména ve formulaci nanočástic s obsaženými protinádorovými a protizánětlivými léčivy².

2) Pasivní targeting

Jak bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, pasivní targeting ovlivňují pouze fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástice (velikost, zeta potenciál, stupeň hydrofobnosti) či způsob jejich podání do organismu².

Intravenózní aplikace nanočástic

Po *i. v.* podání bývají částice rychle odbourávány makrofágy retikuloendoteliálního systému². To platí pro všechny částice velikosti od 100 nm do 6 μm . Větší než 6 μm se hromadí v plicích. Díky tomu mají potenciál v cílené léčbě karcinomu plic². Částice menší než 30 nm jsou zpravidla vylučovány renální exkrecí²⁵.

Pro cílenou distribuci léčiva do lymfatických orgánů (játra, slezina) je ideální velikost částic 100–300 nm. Ty mají potenciál stát se nosiči například protizánětlivých léčiv. Tímto způsobem mohou být léčeny autoimunitní choroby, diabetes nebo revmatoidní artritida^{2,23}.

Perorální aplikace nanočástic

V posledních letech byl uskutečněn signifikantní výzkum, kde byly polymerní nanočástice použity jako perorální nosič pro léčivou látku. Perorální podání nanočástic s léčivem má mnoho výhod ve srovnání z konvenčními lékovými formami. Zvyšuje absorpci špatně rozpustných léčiv, chrání biologická léčiva před nepříznivým prostředím žaludku. Nestabilní léčiva mohou obcházet first-pass efekt metabolismu²⁶.

Hlavní předmět výzkumu tohoto způsobu podání je uptake nanočástic do lymfatického systému procesem endocytózy. Ta je zprostředkována pomocí tzv. M-buněk Peyeroých plaků ve střevní lymfatické tkáni. M-buňky jsou zcela zásadní pro absorpci nanočástic z GIT².

Perorální cesta aplikace nanočástic by mohla sloužit k podání léčiv pro terapii žaludečních vředů, Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy²³. Dále může být do budoucna vhodná k aplikaci enkapsulovaných vakcín. Bývá pro pacienta přijatelnější než intravenózní podání².

Inhalační podání nanočástic

Podání do plic je neinvazivní cestou aplikace. Dají se takto aplikovat léčiva cílená lokálně i systémově. Částice o velikosti 500 nm–2 μm se kumulují v plicních sklípcích, trochu větší pak v bronchiolách. Mikročástice od 5 μm do 10 μm se hromadí v orofaryngu.

Částice podané inhalační cestou by mohly mít potenciál v léčbě plicních onemocnění jako jsou astma, chronická plicní obstrukční nemoc, cystická fibróza a tuberkulóza².

5.2.7 Mechanismy plnění a uvolňování léčiva

Částicový systém pro drug delivery by měl mít jednu základní vlastnost k tomu, aby mohl být úspěšně použit. Musí být schopen pojmout velké množství léčiva za použití malého množství nosiče (polymeru).

1) Plnění

Jsou dva základní typy plnění nanočástic léčivem. Zaprvé včlenění účinné látky do částice během přípravy. Zadruhé přidáním částic do roztoku s již vytvořenými částicemi, kde se adsorbuje. Obecně vzato, plnění částic účinnou látkou dosáhneme přidáním léčiva do reakční směsi, ať už s monomery k polykondenzaci či předem připravenými polymery, nebo do směsi hotových nanočástic¹⁰.

Enkapsulace léčiva do polymeru probíhá na základě fyzikálně-chemických vlastností jak polymeru, tak účinné látky. Nejčastěji jsou to procesy typu dispergace léčiva do objemu polymeru, adsorpce na povrch nanočástic, chemická vazba látky k polymeru. Protože jsou nanočástice koloidní povahy, přestavuje přesné stanovení obsahu léčiva zásadní problém. Proto je nejspolehlivějším způsobem separace nanočástic ze surové nanosuspenze, která obsahuje neenkapsulované léčivo, buď ultracentrifugace, nebo gelová filtrace¹⁰.

Množství enkapsulovaného léčiva se potom dá spočítat pomocí vzorce pro **enkapsulační efektivitu**²⁷:

$$\%EE = \frac{\text{hmotnost enkapsulového léčiva}}{\text{celková hmotnost použitého léčiva}} * 100$$

Dále také můžeme spočítat poměr množství enkapsulovaného léčiva a množství polymeru v částicích, takzvaný **drug load**²⁷:

$$\%DL = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného léčiva}}{\text{celková hmotnost nanočástic}} * 100$$

2) Uvolňování

Charakter uvolňování je jednou z nejdůležitějších vlastností formulace polymerních nanočástic. Jejich smyslem je totiž prodloužené uvolňování léčiva. Existuje spousta faktorů, které tuto vlastnost ovlivňují. Zásadní jsou fyzikálně-chemické vlastnosti polymeru a léčiva. Pro úpravu těchto vlastností je potřeba zjistit, který z mechanismů uvolňování je žádoucí. Je pět základních způsobů uvolňování léčiva z částic¹:

- desorpce léčiva z povrchu nanočástice
- difuze léčiva z matrix částice (nanosféry)
- difuze léčiva přes stěnu částice (nanotobolky)
- eroze matrix nanočástice (např. hydrolýza PLGA)
- kombinace eroze s difuzí

Větší částice mají menší počáteční uvolnění léčiva z částice a delší celkové prodloužené uvolňování účinné látky. Malé částice se chovají vesměs opačně⁸. Další z vlastností částice je také to, že čím víc je naplněna léčivem, tím je větší iniciální uvolnění a také rychlejší celkové. Hypoteticky, počáteční (iniciální) uvolnění léčiva může být způsobeno jeho špatnou enkapsulací do částice nebo jeho možnou adsorpcí na povrch nanočástice. V případě použití účinné látky s volnou karboxylovou skupinou mohou polymery typu PLGA interagovat. Tím se sníží iniciální uvolnění, v některých případech dokonce chybí, a celkové uvolňování léčiva je prodlouženo⁸.

Dále uvolňování závisí na modifikaci povrchu nanočástice. Například použití kopolymeru polymléčné kyseliny (PLA) a polyethylenglykolu (PEG) může vést ke kontrolovanému uvolňování. Obsah celkového polyethylenglykolu ovlivňuje velikost částic a také snižuje jejich degradaci. Množství uvolněného léčiva se zvýší v případě

vyššího obsahu PEG. Uvolňování léčiva závisí i na molekulové hmotnosti použitého kopolymeru. Čím je celková molekulová hmotnost kopolymeru nižší, tím vyšší je uvolňování léčiva z částice. Díky popsaným vlastnostem použitých materiálů jsme schopni upravit proces uvolňování účinné látky z nanočástice⁸.

3) Typy enkapsulovaných léčiv

Nanočástic jsou schopny enkapsulovat širokou škálu léčiv. V případě léčiv biologické povahy (proteiny, hormony, genová léčiva) jsou nanočástice ideální, protože jsou chráněna polymerním obalem. Zamezí tak jejich styku s prostředím, kde by jinak mohla degradovat na neúčinné. Výzkumy se zaměřují na enkapsulaci léčiv různé povahy¹. Vždy jsou používány biodobouratelné polymery. Pro představu, v současném výzkumu nanobiotechnologie je snaha enkapsulovat tyto účinné látky¹:

tabulka 1: příklady zkoumaných léčiv pro enkapsulaci:¹

Protinádorová léčiva	<ul style="list-style-type: none"> • Paclitaxel • Cis-platina • Tegafur • Taxol • Tamoxifen
Imunosupresiva	<ul style="list-style-type: none"> • Dexamethason • Cyklosporin A
Antipsychotika	<ul style="list-style-type: none"> • Haloperidol
Antimykotika	<ul style="list-style-type: none"> • Amfotericin B
Antimalarika	<ul style="list-style-type: none"> • Chlorochin
Léčiva diabetu	<ul style="list-style-type: none"> • Zn-Insulin
Hormony	<ul style="list-style-type: none"> • Estradiol • Progesteron
Oligonukleotidy	<ul style="list-style-type: none"> • SiRNA

5.3 *Bioodbouratelné polymery*

Tyto polymery jsou dnes velice populární v použití při formulaci nanočástic. Neodbouratelné polymery jako polyakrylamid a polymetakrylát, které byly dříve předmětem výzkumu dnes ztrácejí význam. Jejich kumulace v buňkách a tkáních zvyšuje risk chronické toxicity pro organismus². Bioodbouratelné molekuly mají proti nim nespornou řadu výhod. Jsou biokompatibilní, pro organismus netoxické, protože jejich monomery jsou snadno metabolizovány tělu vlastními metabolickými procesy. V dnešní době je již více polymerů tohoto typu, které se používají v drug delivery. Jsou to polyestery a polysacharidy².

5.3.1 **Druhy polymerů používaných pro enkapsulaci léčiv**

Bioodbouratelné polymery používané pro enkapsulaci léčiv se dělí na:

A. Polyestery:

- | | |
|--|--------|
| 1) Polymléčná kyselina | (PLA) |
| 2) Poly(mléčná- <i>co</i> -glykolová) kyselina | (PLGA) |
| 3) Poly- ϵ -kaprolakton | (PCL) |
| 4) Polyalkylkyanoakryláty | (PACA) |

B. Polysacharidy:

- 5) Chitosan
- 6) Algináty

1) Polymléčná kyselina (PLA)

Jedná se o lineární, alifatický polyester. Je poměrně lipofilní, například ve srovnání s PLGA je lipofilnější. Tento homopolymer je složen z monomerů mléčné kyseliny. Přítomnost esterového řetězce polymeru z něj činí hydrolyzovatelný polymer, rozložitelný ve vodném prostředí. Monomery mléčné kyseliny jsou metabolizovány v citrátovém cyklu (*obr. 4*). Food and Drug Administration (FDA) jej zařadila na

seznam GRAS (Generally regarded as safe)²⁸. Byl také povolen k terapeutickému použití na lidech^{2, 28}. Je to běžně používaný polymer pro formulaci nanočástic.

2) Poly(mléčná-*co*-glykolová) kyselina (PLGA)

PLGA se stala nejběžněji používaný polymer pro přípravu nanočástic, díky svým výhodným vlastnostem. Bude mu věnována celá následující kapitola této práce (5.4).

3) Poly- ϵ -kaprolakton (PCL)

Jedná se o alifatický hydrofobní polyester. Je syntetizován metodou polymerace za otevření kruhu v přítomnosti katalyzátoru. Je také povolen FDA^{1, 2} a používá se tkáňovém inženýrství a pro formulaci nanočástic. V těle je odbouráván hydrolyzou jako všechny bioodbouratelné polyestery. Hydrolyzuje na ϵ -kaprolakton, který je poměrně bezpečný pro organismus. Poté tento metabolit přechází v 6-hydroxyhexanovou kyselinu, ve vodě rozpustnou sloučeninu, která je z těla odváděna močí (*obr. 4*)². Poly- ϵ -kaprolakton je schopný absorbovat vodu do svojí matrix. Kvůli tomu, že je převážně hydrofobní, probíhá tato absorpce vody a následná hydrolyza pomalu.

4) Polyalkylkyanoakryláty (PACA)

Polyalkylkyanoakryláty jsou také bioodbouratelné a biokompatibilní esterové polymery. Jejich deriváty, tedy jmenovitě ethyl-, *n*-butyl- a oktylkyanoakrylát byly schváleny FDA k použití na lidech². Jsou tvořeny akrylovými monomery. Připravují se metodou aniontové polymerací ve vodném prostředí. V těle jsou postupně od konce řetězce odbourávány hydrolyzou na alkyl-alkohol a polykyanoakrylovou kyselinu (*obr. 4*). Ta je rozpustná ve vodě a může být z těla vyloučena ledvinami². Využití PACA polymerů je značné a jsou to velice slibné látky. Například polybutylkyanoakrylát je vhodný k dopravení léčiva do mozku.⁵ Tyto látky mají mukoadhezivní vlastnosti a jsou schopny enkapsulovat širokou škálu biologických

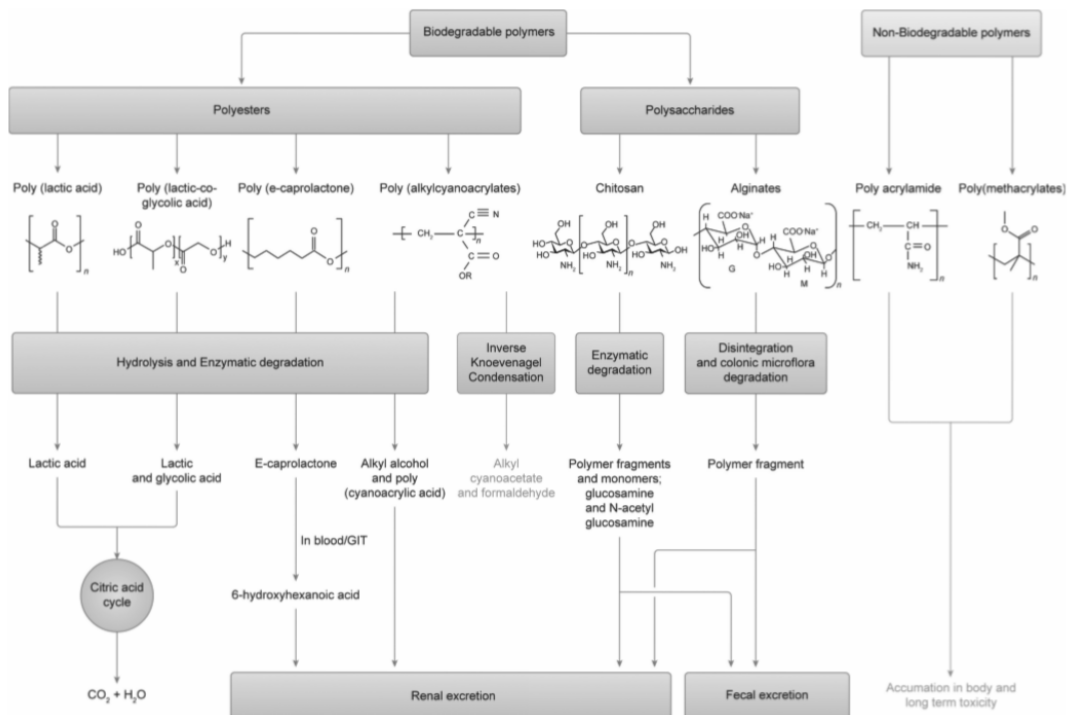
léčiv. Obecně bývají PACA polymery odbourávány rychleji než PLGA, což může být v určitých případech výhodné.⁵

5) Chitosan

Chemický název tohoto hydrofilního polysacharidu je α -(1-4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glukan. Získává se deacetylací chitinu, což stavební látka krunýře korýšů. V organismu je odbouráván pomocí enzymů, které štěpí vazby mezi glukosaminovými monomery. S největší pravděpodobností je odbouráván lysozomy nebo bakteriálními enzymy v tlustém střevě. V těle také najdeme enzymy štěpící chitin (tzv. chitinázy). Rychlost jeho odbourávání závisí na molekulární hmotnosti polymeru a také na jeho stupni deacetylace².

6) Algináty

Podobně jako chitosan jsou algináty hydrofilní polysacharidy. Několik pokusů na lidech dokázalo jejich nezávadnost pro organismus. Jsou to anionické biopolymery získané z hnědých řas. Jejich molekulu tvoří lineární řetězce α -L-glukuronové a β -D-manuronové kyseliny, spojené navzájem 1-4 vazbami. Algináty tvoří gelovité komplexy s dvoumocnými kationty, převážně vápenatými. V organismu neexistují žádné alginázy, proto jejich degradace probíhá odlišným způsobem. *In vivo* se ze struktury odpojují dvojmocné kationty, díky čemuž dochází k disoluci částice. Zbytky alginátů jsou z těla vylučovány pomocí moči i stolice. Perorálně aplikované alginátové nanočástice jsou odbourávány střevní mikroflórou² (**obr. 4**).



obr. 4: metabolické cesty polymerů v lidském těle²

5.4 PLGA

Poly(mléčná-*co*-glykolová) kyselina, přesněji poly(D,L-mléčná-*co*-glykolová) kyselina, je bioodbouratelný, biokompatibilní a netoxický polymer. Byl schválen FDA pro použití na lidech a v nanomedicině.^{1, 2} Používá se jako materiál pro výrobu implantátů a částicových systémů²⁹. V poslední době se PLGA stala prestižní molekulou díky svým vhodným vlastnostem pro formulaci bioodbouratelných nanočástic. Dá se konstatovat, že je to v dnes všeobecně nejběžnější polymer syntetizovaný pro tyto účely⁸.

PLGA je lineární, alifatický, syntetický polyester. Přítomnost esterového řetězce jej činí hydrolyzovatelným ve vodním prostředí. Je to kopolymer složený z dvou monomerních podjednotek. Prvním monomerem je kyselina mléčná a druhým kyselina glykolová. Každá z těchto látek je odbouratelná v citrátovém cyklu organismu^{2, 30}.

5.4.1 Syntéza

O alifatické polyestery byl dlouho ve vědeckých kruzích nezájem. Průlom nastal až v šedesátých letech minulého století, kdy byly navrženy k použití jako resorbovatelný šicí materiál v chirurgii. Největší zájem byl o polymery připravené z α -hydroxykyselin, především o kopolymery kyseliny mléčné a glykolové^{2, 29}. Tak byla připravena PLGA.

Kyselina mléčná (LA)

Tato sloučenina je chirální, proto je třeba odlišit, jaký izomer se v polymeru nachází. Je potřeba odlišit kyselinu L-mléčnou od racemické směsi DL-mléčné. PLGA bývá zpravidla syntetizována z racemátu, proto by přesnější označení použité kyseliny mléčné mělo být DLLA²⁹. Kyselina mléčná je lipofilnější než glykolová (druhý monomer obsažený v PLGA)⁸. Pomocí této její vlastnosti můžeme zvyšovat celkovou lipofilitu syntetizované PLGA. Docílíme toho tím, že nakloníme poměr monomerů při polykondenzaci ve prospěch LA.

Kyselina glykolová (GA)

Druhým monomerem v kopolymerní molekule PLGA je kyselina glykolová. Tato α -hydroxykyselina má o jednu methylovou skupinu v molekule méně než mléčná, a proto je hydrofilnější⁸. Naklonění poměru složek ve prospěch GA při syntéze PLGA, zvýšíme celkovou hydrofilitu tohoto polymeru.

Syntéza PLGA

Existují čtyři nejběžnější metody pro syntézu polyesterů^{29, 31}:

- přímá katalytická polykondenzace za sníženého tlaku
- azeotropická polykondenzace
- polymerace v pevném stavu

- polymerace za otevření kruhu

1) přímá katalytická polykondenzace za sníženého tlaku

Touto metodou lze připravit nízkomolekulární polymery. Není však vhodná pro kontrolu stereoregularity během reakce²⁹.

2) azeotropická polykondenzace

Azeotropická polykondenzace je vhodná pro přípravu vysoce čistých, vysokomolekulárních polymerů.

3) polymerace v pevném stavu

Při této metodě se používá prepolymer zahřátý na teplotu skelného přechodu, ale pod teplotu tání polymeru²⁹. Při této teplotě dochází k polymeraci.

4) polymerace za otevření kruhu

Polymer je zde syntetizován z laktonů, cyklických dimerů²⁹. Od kyseliny mléčné jsou to laktidy, od glykolové glykolidy. Otevřením laktonových kruhu se dá připravit polymer o vysoké molekulární hmotnosti.

5.4.2 Strukturní obměny

PLGA má běžně lineární esterový řetězec. Když se však při její syntéze (polykondenzaci) přidá vícesytný alkohol je možné připravit oligoestery a nízkomolekulární polyestery s větvenou strukturou²⁹. Ty jsou více hydrofilní a mají další zajímavé vlastnosti. Výhoda spočívá v kontinuálnější odbourávání z nich připravených nanočástic, tedy ve výhodnější farmakokinetice uvolňovaného léčiva²⁹.

Jak bylo uvedeno, jako větvičí složky je vhodné použít vícesytné alkoholy či cukry. Větvení probíhá připojením polymerních řetězců na volné hydroxylové skupiny větvičí složky. Tak mohou být použity například²⁹:

- Mannitol
- Glukóza
- Pentaerythritol
- Dipentaerythritol
- Tripentaerythritol

Zdálo by se, že při použití vyšší koncentrace větvičí složky bude připravena molekula polymeru o větší molární hmotnosti. V praxi to ale úplně nefunguje. Při použití mannitolu či dipentaerythritolu se s její zvyšující se koncentrací molární hmotnost syntetizovaných polymerů klesá. Tento jev je dán vzrůstajícím přebytkem terminálních hydroxylových skupin²⁹. Za použití tripentaerythritolu jako větvičího agens se podařilo připravit vysokomolekulární polymery^{29,32}.

5.4.3 Vlastnosti v drug delivery

PLGA je jeden z nejúspěšnějších polymerů pro použití v nanomedicíně¹. Ve vodném prostředí totiž hydrolyzuje a je bioodbouratelný. Nanočástice připravené z PLGA jsou schopny enkapsulovat širokou škálu léčiv. Proteiny, peptidy, vakcíny, genová léčiva mohou být snadno vpravena do nanočástice. Kromě biologických léčiv je možné enkapsulovat také léčiva z řad protinádorových, protizánětlivých léčiv, antipsychotik a také hormonů¹.

Po perorálním podání jsou částice díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem (důležitá je také vhodná velikost) schopny přechodu ze střeva do lymfatického systému organismu. Endocytóza, jak se tento transport nazývá, je zprostředkován M-buňkami Peyerových plaků⁸. Po intravenózním podání se nanočástice kumulují v orgánech lymfatického systému, kupříkladu v játrech a slezině. Poté jsou degradovány fagocytujícími makrofágy².

Degradace PLGA

PLGA je odbourávána ve vodném prostředí pomocí hydrolýzy^{1,29}. Nastane náhodné štěpení řetězců, tím i snížení molekulární hmotnosti. Následuje eroze, při které vznikají ve vodě rozpustné oligomerní sloučeniny. Tím se rychle snižuje hmotnost nanočástice. Při fyziologickém pH je hydrolyzována předposlední esterová vazba od konce řetězce. Je pravděpodobné, že tímto procesem je odtržen cyklický dimer ve formě laktidu nebo glykolidu. Ten je pak dále hydrolyzován na kyselinu mléčnou či glykolovou²⁹.

Kyselina mléčná (LA) je dále metabolizována v citrátovém cyklu organismu^{1, 2, 29}. Z těla je odvedena ve formě oxidu uhličitého a vody. Kyselina glykolová (GA) vstupuje do citrátového cyklu jen částečně. Většina této látky je z těla exkretována ještě před vstupem do cyklu³³.

6 Experimentální část

6.1 Použité suroviny

K výzkumu použito značné množství chemických látek. Tyto suroviny mohou být rozděleny do čtyřech základních kategorií:

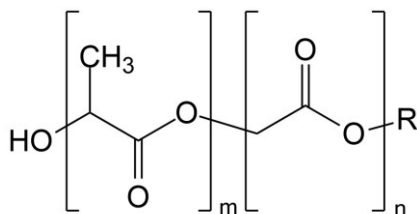
- BIOODBOURATELNÉ PLGA POLYMERY
- ENKAPSULOVANÉ LÉČIVO
- STABILIZÁTORY (POLOXAMERY)
- POLÁRNÍ A SEMIPOLÁRNÍ ROZPOUŠTĚDLA

6.1.1 Bioodbouratelné PLGA polymery

Jak již bylo nastíněno v teoretické části, PLGA polymery jsou jedním z nejvhodnějších materiálů pro tvorbu nanočástic. Všechny použité polymery byly syntetizovány doc. RNDr. Milanem Dittrichem, CSc. na katedře farmaceutické technologie. Pomocí nanoprecipitace z nich vytvořené částice mají ideální velikost pro náš účel (100-300 nm), tedy aby aktivovaly RES (retikuloendotelový systém) a byly fagocytovány makrofágovými buňkami. V našem experimentu bylo použito pět různých PLGA polymerů, z nichž dva byly lineární a tři větvené pomocí molekuly trientaerythritolu. Obecně je tedy můžeme rozdělit na dvě hlavní kategorie:

1) LINEÁRNÍ:

- a) PLGA 5/5
- b) PLGA 7/3



obr. 5: obecná struktura PLGA

2) VĚTVENÉ:

- a) PLGA T1

b) PLGA T3

c) PLGA T5

PLGA 5/5

Tento lineární polymer je složen monomerů mléčné a glykolové kyseliny v poměru 50:50 (LA:GA).

$$M_n = 1700 \text{ g/mol} \qquad M_w = 2400 \text{ g/mol}$$

PLGA 7/3

Tento lineární polymer je syntetizován v poměru 70:30 (LA:GA). Poměr je nakloněn ku prospěchu mléčné kyseliny, dá se tedy očekávat, že tento polymer bude lipofilnější.

$$M_n = 2500 \text{ g/mol} \qquad M_w = 3300 \text{ g/mol}$$

PLGA T1

Tento větvený polymer je syntetizován pomocí větvicí složky tripentaerythritolu (TPE), která byla použita v 1% koncentraci. Jednotlivé složky jsou v poměru 1:49,5:49,5 (TPE:LA:GA). Dá se očekávat, že bude mírně hydrofilnější než oba lineární polymery.

$$M_n = 3600 \text{ g/mol} \qquad M_w = 12300 \text{ g/mol}$$

PLGA T3

Při syntéze tohoto větveného polymeru byl použit tripentaerythritol v koncentraci 3 %. Poměr složek je 3:48,5:48,5 (TPE:LA:GA).

$$M_n = 5300 \text{ g/mol} \qquad M_w = 17400 \text{ g/mol}$$

PLGA T5

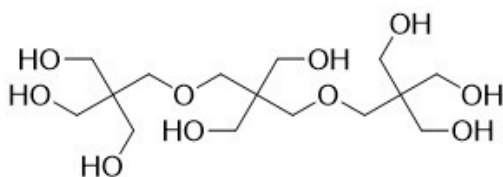
Při syntéze tohoto větveného polymeru byl použit tripentaerythritol v koncentraci 5 %. Poměr složek byl tedy 5:47,5:47,5 (TPE:LA:GA). Dá se očekávat, že PLGA T5 bude nejhydrofilnější ze všech použitých polymerů a také má nejvyšší číselnou molekulovou hmotnost.

$$M_n = 5400 \text{ g/mol}$$

$$M_w = 10900 \text{ g/mol}$$

TRIPENTAERYTHRITOL

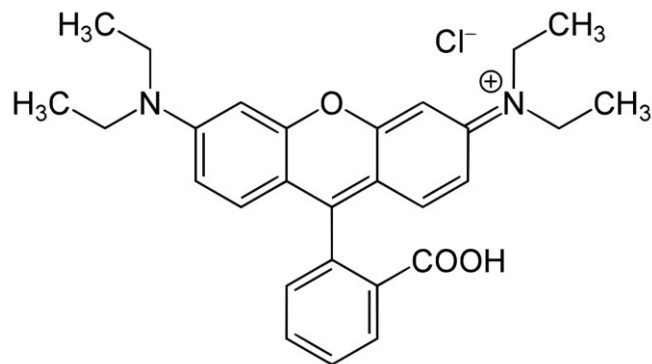
Byl použit při syntéze větvených PLGA polymerů jako větvící složka. Větvením polymerů je možné zvýšit jejich molekulovou hmotnost a také hydrofilitu díky vyššímu počtu volných terminálních hydroxylových skupin.



obr. 6: struktura tripentaerythritolu

6.1.2 Enkapsulované léčivo

Jako enkapsulované modelové léčivo byl použit **Rhodamin B**. Je to fluorescenční barvivo často používané při metodách jako fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie a ELISA. V našem případě byl vybrán z důvodu jeho snadné kvantifikace pomocí spektrofotometrie. Jeho vodný roztok má totiž výraznou růžovou barvu. Hodnocení bylo prováděno podle kalibrační křivky Rhodaminu B v acetonu.



obr. 7: struktura Rhodaminu B

6.1.3 Stabilizátory (poloxamery)

Poloxamery jsou neiontové kopolymery složené ze tří bloků. Jejich molekula obsahuje centrální hydrofobní řetězec tvořený polypropylenoxidem (polypropylenglykolem) obklopený dvěma hydrofilními bloky polyethylenoxidu (polyethylenglykolu)³⁴. Jsou to bílé pevné sloučeniny ve formě prášku.

V naší práci byly použity jejich vodné roztoky jako stabilizátory při přípravě nanočástic (nanoprecipitaci). Dále byly vedle čištěné vody používány jako redispergační média při purifikaci nanosuspenze, která probíhala pomocí několika cyklů centrifugace. Byly charakterizovány pomocí poměru polyethylenoxidových a polypropylenoxidových monomerů (PEO/PPO), hydrofilně/lipofilní rovnováhy (HLB) a číselné molekulové hmotnosti (M_n). V experimentu byly použity dva druhy těchto poloxamerů pod firemními názvy:

1) KOLLIPHOR® P188

Tento poloxamer obsahuje poměrově více blokových jednotek polyethylenoxidu. Je tedy hydrofilnější. Byly použity dvě různé koncentrace vodného roztoku Kolliphoru, 0,1% a 1% roztok.

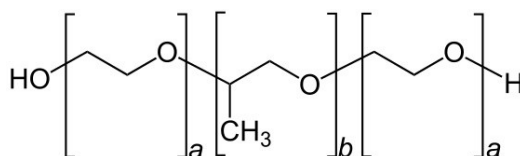
- PEO/PPO: 80/27
- HLB: >24

- průměrná M_n 7680–9510 g/mol

2) PLURONIC® F-127

Pluronic, na rozdíl od Kolliphoru, obsahuje poměrově více blokových jednotek polypropylenoxidu, má tedy lehce lipofilnější charakter. Byly použity dvě různé koncentrace vodného roztoku Pluronicu, 0,1% a 1% roztok.

- PEO/PPO: 101/56
- HLB: 22
- průměrná M_n 12600 g/mol



obr. 8: obecná struktura poloxamerů

6.1.4 Polární a semipolární rozpouštědla

Během našeho výzkumu jsme použili dvě základní rozpouštědla. Byl to semipolární aceton a polární čištěná voda. Tato dvě rozpouštědla byla zvolena hlavně kvůli jejich vzájemné mísitelnosti a rozdílné polaritě. Základní princip nanoprecipitace, naší preferované metody při přípravě nanočástic, je založen právě na těchto vlastnostech. Dále byl přiložen seznam využití rozpouštědel v jednotlivých fázích práce:

1) ACETON

a) Nanoprecipitace

- rozpuštění PLGA polymeru a Rhodaminu B v prvním kroku nanoprecipitace

b) Hodnocení nanočástic po separaci

- rozpuštění vzniklých nanočástic s enkapsulovaným Rhodaminem B pro kvantifikaci pomocí spektrofotometru

2) ČIŠTĚNÁ VODA

a) Nanoprecipitace

- příprava vodného roztoku stabilizátoru v prvním kroku nanoprecipitace

b) Hodnocení nanočástic po nanoprecipitaci

- část surové nanosuspenze byla odebrána, zředěna vodou a hodnocena pomocí zetasizeru

c) Separace a purifikace

- čištěná voda použita také jako redispergační médium v druhé části našeho purifikačního experimentu

6.2 Použité přístroje

1) CENTRIFUGA

MICRO 7, FISHER SCIENTIFIC (Hampton, Spojené státy americké)

Pro separaci a purifikaci nanočástic byla použita tato centrifuga při 10000 RPM (otáček za minutu), což se rovná přetížení 7200 G.

2) ZETASIZER

NANO ZS, MALVERN INSTRUMENTS (Malvern, Spojené království)

Tento přístroj je ve výzkumu používán pro měření velikosti, elektroforetického pohybu proteinů, molekulové hmotnosti, zeta potenciálu koloidů, nanočástic a viskozity polymerů nebo jejich roztoků. Měří velikost částic ve vzorku pomocí dynamického rozptylu světla díky svým speciálním optikám. Obsahuje také analyzátoři na měření zeta potenciálu a molekulové hmotnosti.¹⁰

Zetasizer Nano ZS byl v této práci použit pro hodnocení nanočástic připravených nanoprecipitací. Hodnotili jsme tři základní parametry:

- Velikost
- Index polydisperzity
- Zeta potenciál

Dynamický rozptyl světla

Touto metodou byla měřena velikost a index polydisperzity nanočástic. Její princip je založen na měření difuze částic pohybujících se pomocí Brownova pohybu. Z těchto hodnot zetasizer vypočítá velikost a distribuci velikosti měřených částic pomocí Stokesova-Einsteinova vztahu. Přístroj je schopen měřit částice s průměrem v rozmezí 0,3 nm–10 μm ¹³.

Laserová dopplerovská elektroforéza

Zeta potenciál nanočástic byl měřen touto metodou. Vzorek byl umístěn do kyvety s elektrodami. V nanosuspenzi je takto vytvořeno elektrické pole. Částice pak migrují k pólu (elektrodě) rychlostí úměrnou jejich zeta potenciálu. Tato rychlost je měřena laserovou elektroforetickou metodou. Zetasizer je z těchto hodnot schopen spočítat zeta potenciál a jeho distribuci ve vzorku. Je schopen měřit částice ve velikostním rozmezí 3,8 nm–100 μm ¹³.

3) SPEKTROFOTOMETR

SPECORD 205, ANALYTIK JENA (Jena, Německo)

4) MAGNETICKÁ MÍCHAČKA

RT 5 POWER, IKA-WERKE (Staufen im Breisgau, Německo)

5) SUŠÁRNA

MEMMERT, MEMMERT GmbH + Co. KG (Schwabach, Německo)

6) ANALYTICKÉ VÁHY

DISCOVERY DV215CD, OHAUS (Parsippany, Spojené státy americké)

7) PIPETY

TRANSFERPETTE, BRAND (Mumbai, Indie)

FINNPIPETTE F2, THERMO SCIENTIFIC (Waltham, Spojené státy americké)

6.3 Použité metody

V této práci bylo použito množství metod, jež byly aplikovány na jednotlivé kroky našeho výzkumu. Uvedené parametry použitých postupů se budou nejčastěji vztahovat k přípravě jedné šarže nanočástic. Pro jednu šarži nanočástic bylo potřeba připravit dostatečné množství surové nanosuspenze. Tato **šarže** byla charakterizována jako *množství nanočástic připravených v jednom kroku nanoprecipitace a separovaných za použití jednoho protokolu*. Požadované množství bylo 10 ml surové nanosuspenze na šarži. Prakticky však byla připravena nanosuspenze pro více šarží.

Použité metody byly seřazeny chronologicky podle toho, kdy byly během výzkumu použity:

- 1) Analytické vážení – navážky polymeru a Rhodaminu B
- 2) Nanoprecipitace – příprava nanočástic
- 3) Hodnocení nanočástic pomocí zetasizeru
- 4) Centrifugace – separace a purifikace nanočástic
- 5) Hodnocení nanočástic spektrofotometricky
- 6) Analytické vážení – hodnocení výtěžku nanočástic
- 7) Výpočty – koncentrace Rhodaminu B, výtěžek (% RY), enkapsulační efektivita (% EE) a drug-load (% DL)

6.3.1 Analytické vážení – navážky

Jak již název napovídá, přístrojem použitým při této metodě byly analytické váhy. Byly takto zváženy PLGA polymery a enkapsulovaná látka Rhodamin B. V tabulce jsou uvedeny navážky jednotlivých složek:

tabulka 2: navážky polymeru a léčiva pro nanoprecipitaci

<i>sloučenina</i>	<i>navážka na 100 ml nanosuspenze</i>	<i>navážka na šarži (10 ml)</i>	<i>koncentrace</i>
PLGA	300 mg	30 mg	3 mg/ml
Rhodamin B	2,5 mg	0,25 mg	0,025 mg/ml

6.3.2 Nanoprecipitace – příprava nanočástic

Teoreticky byla tato metoda popsána v kapitole 5.2.2 Příprava polymerních nanočástic.

Jak bylo uvedeno v úvodu kapitoly, pro jednu šarži nanočástic bylo potřeba připravit dostatečné množství surové nanosuspenze, které činilo 10 ml. Prakticky však byla připravena nanosuspenze pro více šarží. Pro zjednodušení je postup nanoprecipitace vztažen na jednu šarži, která byla definována dříve.

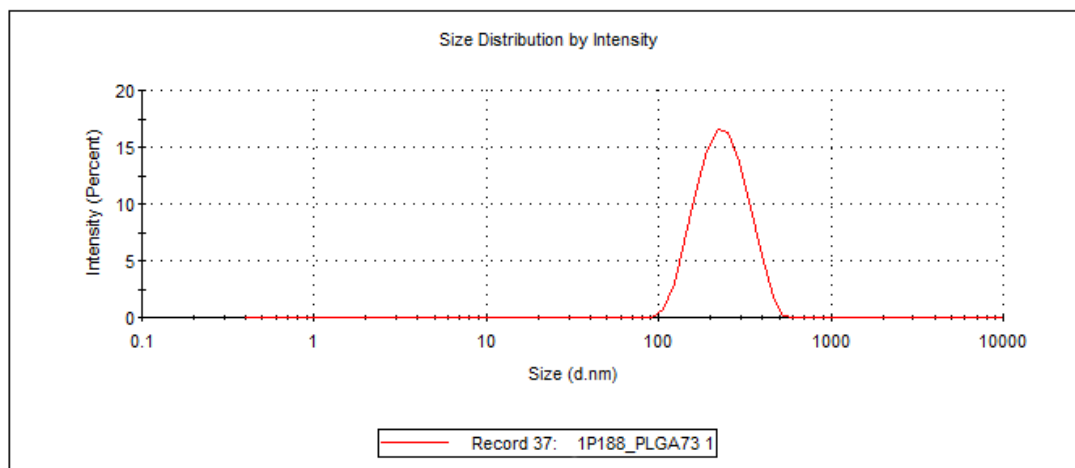
Postup pro přípravu 10 ml surové nanosuspenze byl následující:

- 1) Množství 30 mg PLGA a 0,25 mg Rhodaminu B bylo rozpuštěno v 1 ml acetonu.
- 2) Bylo připraveno 10 ml vodného roztoku stabilizátoru (koncentrace 0,1% (m/m) a 1% (m/m)) rozpuštěním za stálého míchání na magnetické míchačce.
- 3) Za stálého míchání byl aceton pomocí pipety přenesen do vodné fáze se stabilizátorem. Vznikla tak surová nanosuspenze v poměru 1:10 (aceton:voda).
- 4) Za stálého míchání pomocí magnetické míchačky, při konstantních otáčkách a při laboratorních podmínkách byl aceton odpařen. Jeho nepřítomnost v suspenzi byla zhodnocena organoleptickou zkouškou (výrazný zápach acetonu).
- 5) Takto vzniklá surová nanosuspenze byla poté purifikována centrifugací (9 ml) a hodnocena pomocí zetasizeru (1 ml).

6.3.3 Hodnocení nanočástic pomocí zetasizeru

Po nanoprecipitaci byl z každé šarže odebrán jeden 1 ml nanosuspenze. Byl zředěn 1:10 čištěnou vodou a hodnocen na zetasizeru **Nano ZS, Malvern Instruments**. Na tomto přístroji probíhalo měření velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu připravených nanočástic, tedy vlastností, které byly pro náš výzkum podstatné¹³. Takto byly hodnoceny nanočástice každé z připravených šarží.

Pro měření velikosti nanočástic a indexu polydisperzity byly použity kyvety bez elektrod, pro měření zeta potenciálu kyvety s elektrodami. Princip měření zetasizeru byl popsán v kapitole 6.2 Použité přístroje.



obr. 9: hodnocení velikosti nanočástic pomocí zetasizeru

6.3.4 Centrifugace – separace a purifikace nanočástic

Po přípravě surové nanosuspenze bylo třeba připravené částice separovat a purifikovat. Toho bylo dosaženo pomocí tří cyklů centrifugace. Pro tuto metodu byla použita centrifuga **Micro 7, Fisher Scientific** při 10000 RPM (otáčkách za minutu), což se rovná přetížení 7200 G.

Byly také aplikovány různé časy (doby) jednotlivých cyklů centrifugace částic pro zjištění nejvýhodnějšího.

Pro **lineární** polymery (PLGA 5/5, PLGA 7/3):

- 10, 20, 30 a 60 minut pro jeden cyklus centrifugace

Pro **větvené** polymery (PLGA T1, PLGA T3, PLGA T5):

- 5, 10 a 30 minut pro jeden cyklus centrifugace

Dále byla hodnocena takzvaná redispergační média. V první části našeho experimentu sloužil jako redispergační médium roztok stabilizátoru, který byl použit pro přípravu nanočástic (v té stejné koncentraci). Například, když byl pro nanoprecipitaci použit 1% Kolliphor P188, byl také aplikován při centrifugaci jako redispergační médium. V druhé části experimentu byla jako redispergační médium při centrifugaci použita čištěná voda.

Postup pro separaci a purifikaci nanočástic byl následující:

1) První cyklus centrifugace

Jak bylo uvedeno dříve, na jednu šarži nanočástic bylo použito 10 ml surové nanosuspenze. Na hodnocení pomocí zetasizeru byl odebrán 1 ml suspenze. Zbýlých 9 ml bylo použito k získání částic. Toto množství bylo přeneseno do 6 mikrozkušavek (typu eppendorf) po 1,5 ml pro následnou centrifugaci. Další postup probíhal následovně:

- centrifugace surové nanosuspenze (9 ml – 6 mikrozkušavek po 1,5 ml suspenze)
- odebrání roztoku volně distribuovaného léčiva (1. frakce)
- přenesení nanočástic do nové mikrozkušavky pro další cyklus centrifugace (2. frakce)
- odstranění mikrozkušavky s agregátem polymeru a léčiva na jejím dně (3. frakce)

2) Druhý cyklus centrifugace

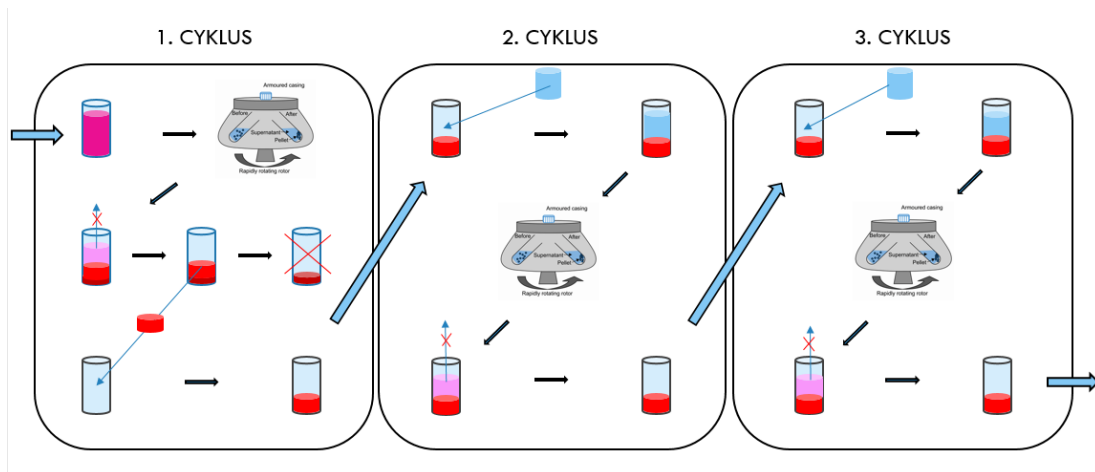
Ve druhém a třetím cyklu bylo potřeba doplnit objem mikrozkušavky pro další purifikaci nanočástic. Bylo přidáno celkově 6 ml redispergačního média (po 1 ml média do každé z 6 mikrozkušavek). Postup pro druhý a třetí cyklus centrifugace byl téměř totožný.

- doplnění mikroskopické kumavky s nanočásticemi (2. frakce) redispergačním médiem (celkově 6 ml roztoku stabilizátoru nebo čištěné vody)
- centrifugace redispergovaných nanočástic
- odebrání supernatantu se zbytkem volného léčiva

3) Třetí cyklus centrifugace

- doplnění mikroskopické kumavky s nanočásticemi (2. frakce) redispergačním médiem (celkově 6 ml roztoku stabilizátoru nebo čištěné vody)
- centrifugace redispergovaných nanočástic
- odebrání supernatantu se zbytkem volného léčiva

Výsledkem byly separované a purifikované nanočástice, které byly následně rozpuštěny v acetonu k dalšímu zhodnocení.



obr. 10: schéma postupu při separaci a purifikaci nanočástic pomocí centrifugace

6.3.5 Hodnocení nanočástic spektrofotometricky

Separované a purifikované nanočástice byly následně rozpuštěny celkově ve 3 ml acetonu (do každé z 6 mikrozkušavek bylo přidáno 0,5 ml acetonu). Tento roztok polymeru a enkapsulovaného léčiva byl přenesen do předem zvážené vialky. Tato šarže nanočástic byla následně hodnocena pomocí spektrofotometru. V této práci byl použit **Specord 205, Analytik Jena**. Jako referenční roztok byl použit čistý aceton. Absorbance Rhodaminu B byla hodnocena při vlnové délce **544 nm**, což je jeho absorpční maximum. Tímto způsobem byla získána hodnota absorbance jednotlivých šarží. Za pomoci kalibrační přímky absorbance Rhodaminu B je možné vypočítat koncentraci této látky.

6.3.6 Analytické vážení – hodnocení výtěžku nanočástic

Po získání hodnot absorbance pomocí spektrofotometru byl vzorek v kyvetě kvantitativně přenesen zpět do vialky se zbytkem šarže. Aceton byl následně kompletně odpařen v sušárně. Vialka s vysušeným polymerem a Rhodaminem B byla analyticky zvážena za cílem získání hodnoty množství polymeru. Tuto hodnotu bylo možno spočítat odečtením hmotnosti prázdné vialky (předem zvážené) a hmotnosti Rhodaminu (vypočítané z kalibrační křivky a absorbance) od celkové hmotnosti vialky s vysušeným polymerem a léčivem.

6.3.7 Výpočty a zhodnocení

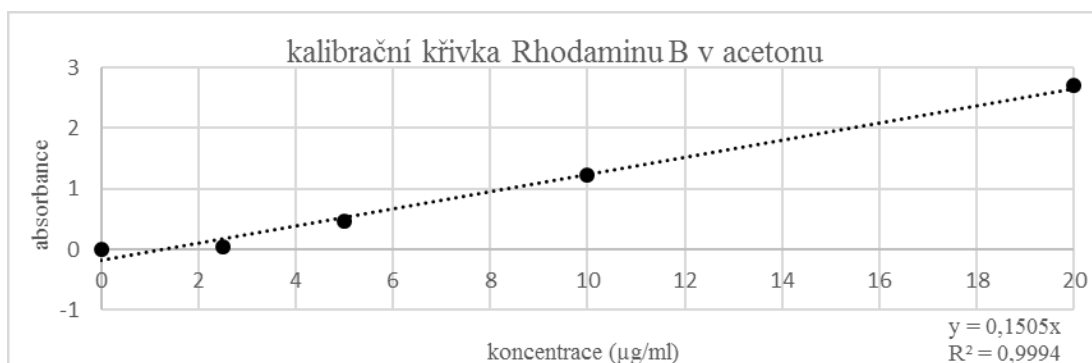
Dále bylo nutné zhodnotit parametry připravených šarží nanočástic. Proto bylo spočítáno několik parametrů důležitých pro interpretaci výsledků. Po zhodnocení absorbance a hmotnosti šarže po vysušení rozpouštědla byla spočítána:

- koncentrace Rhodaminu B
- hmotnost enkapsulovaného Rhodaminu B
- procenta výtěžku polymeru (% RY)
- procenta enkapsulační efektivity (% EE)

- procentuální drug load (% DL)

1) koncentrace Rhodaminu B

Předem byla také změřena a sestavena kalibrační křivka absorbance pro různé koncentrace Rhodaminu B (enkapsulované látky) v acetonu.



graf 1: kalibrační křivka Rhodaminu B v acetonu

Ze získaných hodnot absorbance jednotlivých šarží a z kalibrační křivky bylo možno vypočítat koncentraci (µg/ml) a celkové množství enkapsulovaného Rhodaminu B (µg). Vzorec pro výpočet:

$$c = \frac{A}{0,1505}$$

2) hmotnost enkapsulovaného Rhodaminu

Hodnota celkového množství enkapsulovaného Rhodaminu B v jedné šarži (µg) se spočítá pomocí hodnoty koncentrace v šarži (µg/ml) násobeno třemi (3 ml částic rozpuštěných v acetonu na šarži).

3) % RY (% hmotnostního výtěžku PLGA polymeru)

Vypočítáním hmotnosti enkapsulovaného Rhodaminu B bylo možno z celkové hmotnosti vysušené směsi spočítat hmotnost polymeru v nanočásticích. Tato hodnota

byla vztažena procentuálně k původní navážce PLGA polymeru. Tak byla získána hodnota % RY (z anglického *recovery yield* = výtěžek, výnos). % RY vypovídá o tom, jaká byla výtěžnost nanoprecipitačního a separačního procesu. Tento parametr byl společně s procenty enkapsulační efektivity (% EE) nejpodstatnější pro interpretaci výsledků práce.

$$\%RY = \frac{(\text{hmotnost částic po vysušení} - \text{hmotnost enkapsulovaného léčiva})}{\text{celková hmotnost použitého polymeru}} * 100$$

4) % EE (% enkapsulační efektivity)

Dalším významným parametrem pro hodnocení nanočástic jsou procenta enkapsulační efektivity. Tato hodnota udává, kolik procent z celkové navážky léčiva (Rhodaminu B) bylo enkapsulováno PLGA polymerem. Vzorec pro výpočet:

$$\%EE = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného léčiva}}{\text{celková hmotnost použitého léčiva}} * 100$$

5) % DL (% drug load)

Třetím vypočteným parametrem je procentuální drug load. % DL udává kolik procent z celkové hmotnosti nanočástic tvoří enkapsulované léčivo Rhodamin B. Tento parametr nebyl použit pro interpretaci výsledků.

$$\%DL = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného léčiva}}{\text{celková hmotnost nanočástic}} * 100$$

Pro výpočet těchto parametrů byl vytvořen rozsáhlý komplex tabulek. Pro představu je zde přiložena ukázka jedné z těchto tabulek:

tabulka 3: příklad tabulky pro výpočet parametrů nanočástic

čas	A	c RhB ($\mu\text{g/ml}$)	m RhB (μg)	m částic (μg)	% RY	% EE	% DL
10 min	0,482	3,2027	9,6080	9910	36,67	11,65	0,097
20 min	1,079	7,1694	17,9236	11250	49,92	19,15	0,159
30 min	1,016	6,7508	20,2525	12800	47,33	19,02	0,158
60 min	2,822	18,7508	56,2525	20090	74,13	33,72	0,280

7 Výsledky a diskuze

Po přípravě, separaci a purifikaci všech šarží bylo získáno značné množství dat. Z těchto dat (*tabulky 4, 5, 6, 7, 8*) byly vytvořeny grafy k zjištění vlastností jednotlivých šarží, které mohly být takto zřetelně porovnány a zhodnoceny. Nejdůležitějšími daty této práce byla procenta hmotnostního výtěžku polymeru (% RY) a procenta enkapsulační efektivity (% EE). % RY udávají, jaké množství z celkové navážky PLGA polymeru bylo reálně použito pro tvorbu stabilních nanočástic. % EE znázorňují schopnost polymeru enkapsulovat účinnou látku, tedy kolik procent navážky Rhodaminu B bylo zakomponováno do polymerní nanočástice.

Byly hodnoceny parametry přípravy, separace a purifikace každé šarže. Největší vliv na vlastnosti nanočástic měly:

- druh polymeru pro přípravu nanočástic
- druh a koncentrace stabilizátoru pro přípravu nanočástic
- druh redispergačního média
- čas (doba) jednoho cyklu centrifugace

7.1 Naměřené parametry

Výsledky vlastností polymerů v konkrétním prostředí jsou shrnuty v tabulkách. **Zeleně** jsou v *tabulkách 4–8* zvýrazněny nejvyšší dosažené procentuální hodnoty RY a EE u konkrétního polymeru. Tyto hodnoty jsou pak použity v *tabulkách 10–14* u každého z PLGA polymerů v kapitole 7.2.

tabulka 4: % RY a EE nanočástic z PLGA 5/5 v různých prostředích

polymer	stabilizátor	redispergační médium	čas centrifugace	% RY	% EE
PLGA 5/5	0,1% Kolliphor	0,1% Kolliphor	10 minut	20,84	9,73
			20 minut	34,44	24,39
			30 minut	29,06	14,85
			60 minut	12,96	4,17
		voda	10 minut	nestabilní	-
			20 minut	-	-
			30 minut	-	-
			60 minut	-	-
	1% Kolliphor	1% Kolliphor	10 minut	40,63	29,41
			20 minut	48,00	35,52
			30 minut	40,66	20,65
			60 minut	47,97	40,76
		voda	10 minut	49,96	22,51
			20 minut	45,15	22,53
			30 minut	29,94	25,18
			60 minut	35,35	21,18
	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	10 minut	35,07	7,34
			20 minut	38,24	10,48
			30 minut	40,04	11,77
			60 minut	52,58	20,88
		voda	10 minut	39,79	26,98
			20 minut	37,62	14,33
			30 minut	35,69	42,40
			60 minut	39,93	10,23
1% Pluronic	1% Pluronic	10 minut	37,35	9,44	
		20 minut	52,51	5,12	
		30 minut	44,87	6,79	
		60 minut	42,76	10,55	
	voda	10 minut	26,56	11,04	
		20 minut	36,19	13,53	
		30 minut	37,94	30,15	
		60 minut	9,55	16,42	

tabulka 5: % RY a EE nanočástic z PLGA 7/3 v různých prostředích

polymer	stabilizátor	redispergační médium	čas centrifugace	% RY	% EE
PLGA 7/3	0,1% Kolliphor	0,1% Kolliphor	10 minut	8,58	6,63
			20 minut	14,25	3,68
			30 minut	17,17	8,35
			60 minut	-	-
		voda	10 minut	nestabilní	-
			20 minut	-	-
			30 minut	-	-
			60 minut	-	-
	1% Kolliphor	1% Kolliphor	10 minut	16,19	14,75
			20 minut	36,24	12,17
			30 minut	46,04	11,92
			60 minut	15,91	5,53
		voda	10 minut	39,52	70,51
			20 minut	21,80	75,23
			30 minut	39,00	72,42
			60 minut	22,71	53,75
	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	10 minut	49,03	10,81
			20 minut	60,11	14,18
			30 minut	44,01	16,77
			60 minut	83,31	19,78
		voda	10 minut	36,67	11,65
			20 minut	49,92	19,15
			30 minut	47,33	19,02
			60 minut	74,13	33,72
1% Pluronic	1% Pluronic	10 minut	62,48	21,96	
		20 minut	47,17	12,94	
		30 minut	51,41	16,47	
		60 minut	59,91	22,94	
	voda	10 minut	49,80	29,85	
		20 minut	36,76	18,34	
		30 minut	34,89	38,60	
		60 minut	40,48	38,88	

tabulka 6: % RY a EE nanočástic z PLGA T1 v různých prostředích

polymer	stabilizátor	redispergační médium	čas centrifugace	% RY	% EE
PLGA T1	0,1% Kolliphor	0,1% Kolliphor	5 minut	nestabilní	-
			10 minut	-	-
			20 minut	-	-
		voda	5 minut	nestabilní	-
			10 minut	-	-
			20 minut	-	-
	1% Kolliphor	1% Kolliphor	5 minut	51,15	13,47
			10 minut	33,69	8,11
			20 minut	42,13	9,16
		voda	5 minut	54,72	38,41
			10 minut	54,38	49,37
			20 minut	36,70	59,26
	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	5 minut	34,34	24,52
			10 minut	43,26	19,87
			20 minut	41,46	7,84
		voda	5 minut	57,83	25,87
			10 minut	47,08	30,26
			20 minut	32,54	22,59
	1% Pluronic	1% Pluronic	5 minut	80,55	27,82
			10 minut	74,53	26,27
			20 minut	98,72	25,15
		voda	5 minut	32,56	20,97
			10 minut	31,89	12,28
			20 minut	32,46	18,10

tabulka 7: % RY a EE nanočástic z PLGA T3 v různých prostředích

polymer	stabilizátor	redispergační médium	čas centrifugace	% RY	% EE
PLGA T3	0,1% Kolliphor	0,1% Kolliphor	5 minut	nestabilní	-
			10 minut	-	-
			20 minut	-	-
		voda	5 minut	nestabilní	-
			10 minut	-	-
			20 minut	-	-
	1% Kolliphor	1% Kolliphor	5 minut	19,82	1,09
			10 minut	9,60	2,07
			20 minut	19,27	1,78
		voda	5 minut	8,58	1,18
			10 minut	23,56	4,19
			20 minut	28,73	3,57
	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	5 minut	74,33	4,22
			10 minut	57,82	6,31
			20 minut	48,63	1,36
		voda	5 minut	67,96	11,04
			10 minut	26,53	1,83
			20 minut	20,35	1,76
	1% Pluronic	1% Pluronic	5 minut	39,57	0,22
			10 minut	52,57	0,44
			20 minut	31,65	0,29
		voda	5 minut	28,92	1,67
			10 minut	26,87	0,88
			20 minut	29,81	2,07

tabulka 8: % RY a EE nanočástic z PLGA T5 v různých prostředích

polymer	stabilizátor	redispergační médium	čas centrifugace	% RY	% EE	
PLGA T5	0,1% Kolliphor	0,1% Kolliphor	5 minut	nestabilní	-	
			10 minut	-	-	
			20 minut	-	-	
		voda	5 minut	nestabilní	-	
			10 minut	-	-	
			20 minut	-	-	
	1% Kolliphor	1% Kolliphor	5 minut	nestabilní	-	
			10 minut	-	-	
			20 minut	-	-	
		voda	5 minut	nestabilní	-	
			10 minut	-	-	
			20 minut	-	-	
	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	5 minut	69,53	2,68	
			10 minut	40,01	1,78	
			20 minut	23,34	0,66	
			voda	5 minut	nestabilní	-
				10 minut	-	-
				20 minut	-	-
1% Pluronic		1% Pluronic	5 minut	33,87	0,16	
			10 minut	32,72	0,04	
			20 minut	43,84	0,22	
		voda	5 minut	nestabilní	-	
			10 minut	-	-	
			20 minut	-	-	

tabulka 9: průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu nanočástic v různých prostředích

polymer	stabilizátor	velikost (nm)	index polydisperzity	zeta potenciál (mV)
PLGA 5/5	0,1% Kolliphor	269	0,175	-47
	1% Kolliphor	230	0,165	-36
	0,1% Pluronic	210	0,127	-29
	1% Pluronic	208	0,143	-26
PLGA 7/3	0,1% Kolliphor	216	0,116	-57
	1% Kolliphor	241	0,159	-41
	0,1% Pluronic	211	0,165	-35
	1% Pluronic	181	0,095	-19
PLGA T1	0,1% Kolliphor	-	-	-
	1% Kolliphor	273	0,177	-48
	0,1% Pluronic	229	0,133	-31
	1% Pluronic	223	0,122	-20
PLGA T3	0,1% Kolliphor	-	-	-
	1% Kolliphor	249	0,103	-34
	0,1% Pluronic	228	0,135	-27
	1% Pluronic	234	0,179	-26
PLGA T5	0,1% Kolliphor	-	-	-
	1% Kolliphor	-	-	-
	0,1% Pluronic	213	0,141	-31
	1% Pluronic	220	0,181	-39

1) Velikost

Tento parametr a jeho vliv na vlastnosti nanočástic je diskutován v kapitole 7.6 Vliv velikosti nanočástic.

2) Index polydisperzity (PDI)

Index polydisperzity byl také zkoumaným parametrem. Vypovídá o tom, jak hodně se liší velikosti molekul v měřené disperzi. Čím je hodnota menší, tím lepší. Pokud je hodnota tohoto indexu nižší než 0,200 je polydisperzita soustavy považována za vyhovující. Tento požadavek splnily všechny měřené nanočástice (*tabulka 9*).

3) Zeta potenciál

Zeta potenciál je parametr určující stabilitu nanočástic. Čím zápornější je tento potenciál, tím stabilnější jsou částice. Ty připravené v Kolliphoru mají u každého z polymerů tento potenciál zápornější, než částice připravené v Pluronicu (kromě PLGA T5, u kterého se je v Kolliphoru nepodařilo připravit). O tom vypovídají hodnoty v *tabulce 9*. Z výsledků je patrné, že zeta potenciál není pro separaci a purifikaci nanočástic rozhodující.

7.2 Vliv použitého PLGA polymeru

Bylo hodnoceno pět různých druhů PLGA polymerů. Na vlastnostech při enkapsulaci Rhodaminu B se patrně podílí jejich hydrofilita/lipofilita, lineární či větvená struktura a molekulová hmotnost. Vlastnosti a chování každého z nich budou dále diskutovány.

legenda ke *grafům 3–10*

znázornění času cyklu centrifugace:

- pro 10 minut u lineárního a 5 minut větveného byl použit symbol kruhu ○
- pro 20 minut u lineárního a 10 minut větveného symbol trojúhelníku △
- pro 30 minut u lineárního a 20 minut větveného symbol kosočtverce ◇
- pro 60 minut u lineárního symbol čtverce □

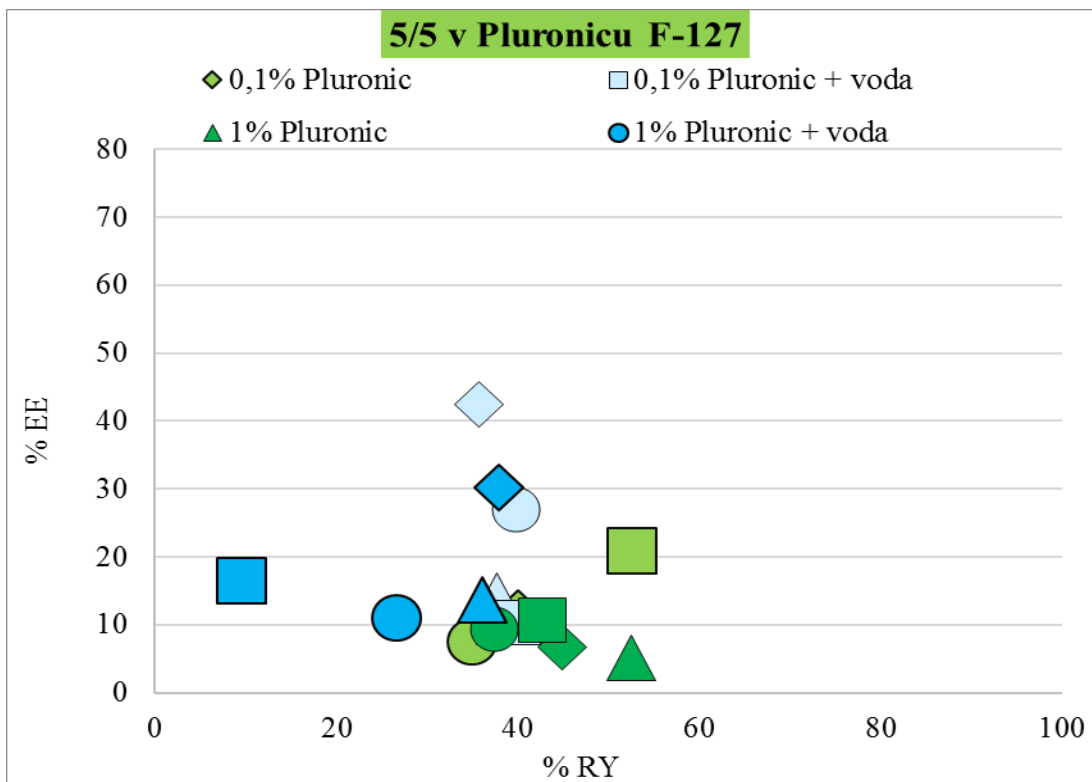
7.2.1 lineární PLGA polymery

1) PLGA 5/5

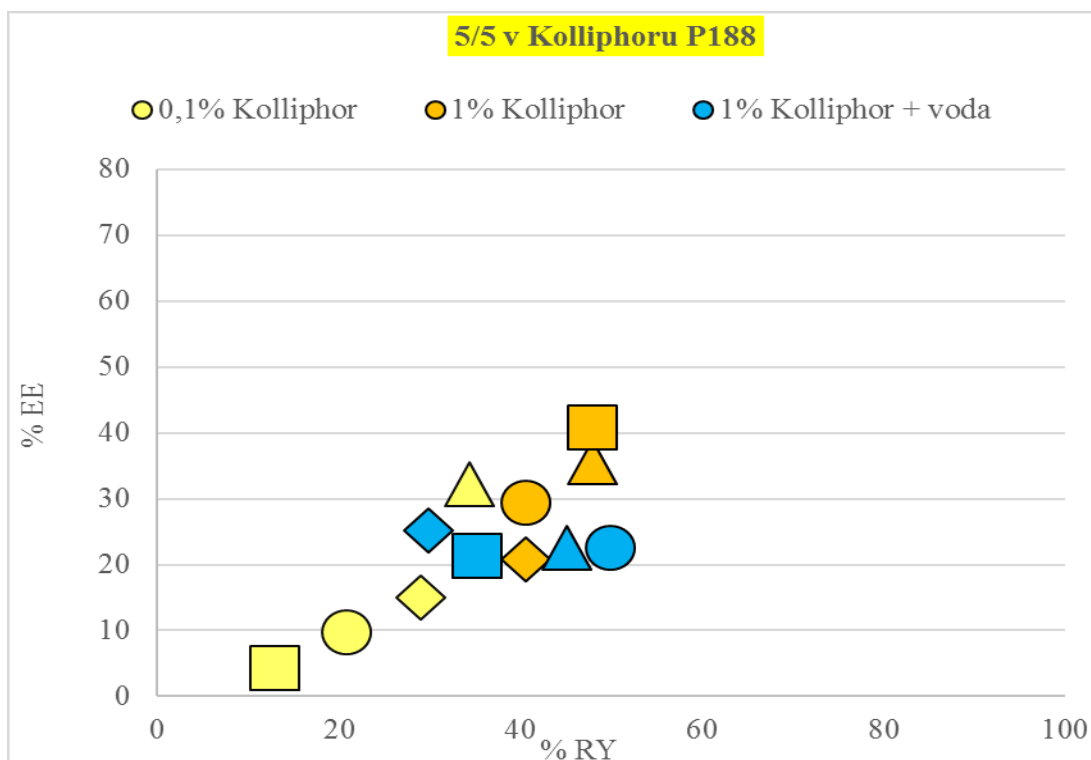
Tento polymer vykazoval za různých podmínek v různých prostředích vesměs podobné vlastnosti (*grafy 2, 3*). Má **nejnižší číselnou molekulovou hmotnost (M_n)** ze všech použitých polymerů. Při použití různých stabilizátorů a redispergačních médií byla jeho % EE celkově vyšší než u PLGA T3 a T5 (*tabulky 4, 7, 8; grafy 10, 11*). Nedosahovala však takových hodnot jako u PLGA 7/3 a T1 (*tabulka 4, 5, 6; grafy 10, 11*).

tabulka 10: nejvýhodnější podmínky pro polymer PLGA 5/5

PLGA 5/5	stabilizátor	redispergační médium	čas cyklu centrifugace	hodnoty
<i>nejvyšší % RY</i>	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	60 minut	52,58
<i>nejvyšší % EE</i>	0,1% Pluronic	voda	30 minut	42,40



graf 2: vlastnosti PLGA 5/5 při použití Pluronicu F-127 jako stabilizátoru



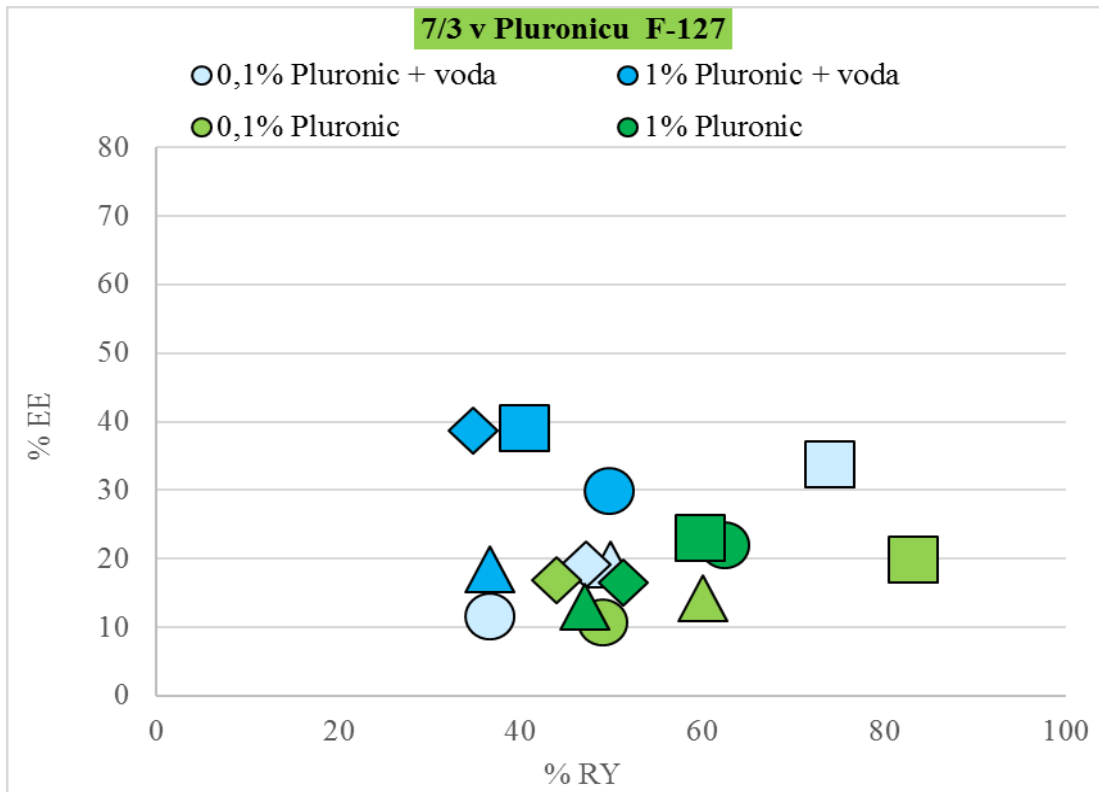
graf 3: vlastnosti PLGA 5/5 při použití Kolliphoru P188 jako stabilizátoru

2) PLGA 7/3

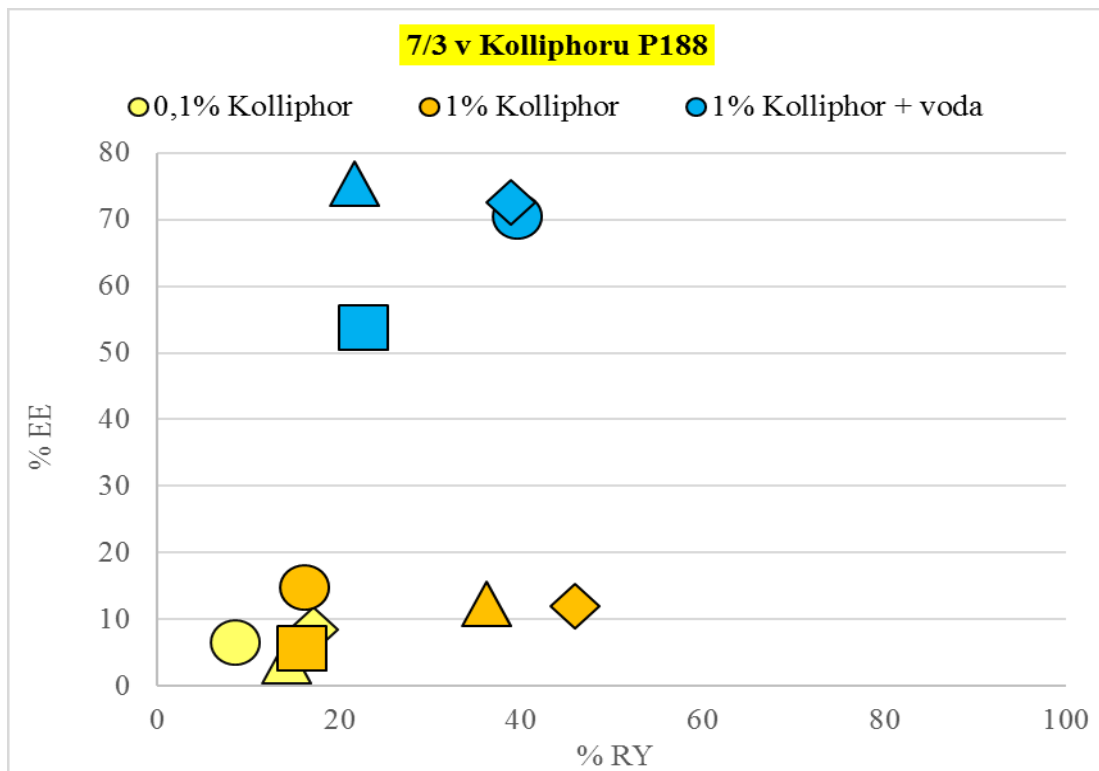
Druhým z lineárních polymerů je PLGA 7/3. Je **nejlipofilnější** ze všech použitých PLGA polymerů, protože obsahuje 70 % monomerů mléčné kyseliny. Měl vysoké procento výtěžku polymeru, které se za použití 0,1% Pluronicu jako stabilizátoru i redispergačního média vyšplhalo **přes 80 % (RY) (graf 4)**. Tento polymer vykazoval **nejlepší vlastnosti pro enkapsulaci Rhodaminu B**. Při použití 1% Kolliphoru jako stabilizátoru a vody jako redispergačního média dosahovala jeho **EE až 75 % (tabulka 5; graf 5)**. Z uvedeného vyplývá, že tento polymer má díky své zvýšené lipofilitě **nejvyšší afinitu k lipofilnímu Rhodaminu B** a připravené částice jsou stabilní ve vodném prostředí.

tabulka 11: nejvýhodnější podmínky pro polymer PLGA 7/3

PLGA 7/3	<i>stabilizátor</i>	<i>redispergační médium</i>	<i>čas cyklu centrifugace</i>	<i>hodnoty</i>
<i>nejvyšší % RY</i>	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	60 minut	83,31
<i>nejvyšší % EE</i>	1% Kolliphor	voda	20 minut	75,23



graf 4: vlastnosti PLGA 7/3 při použití Pluronicu F-127 jako stabilizátoru



graf 5: vlastnosti PLGA 7/3 při použití Kolliphoru P188 jako stabilizátoru

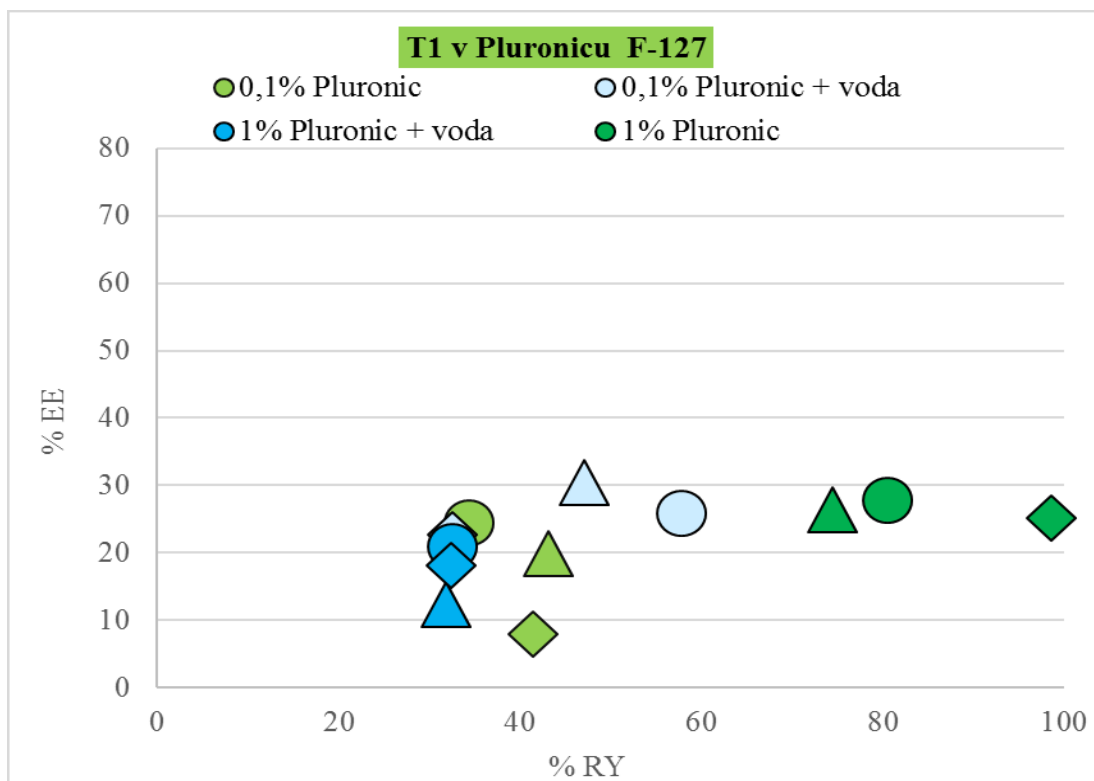
7.2.2 větvené PLGA polymery

1) PLGA T1

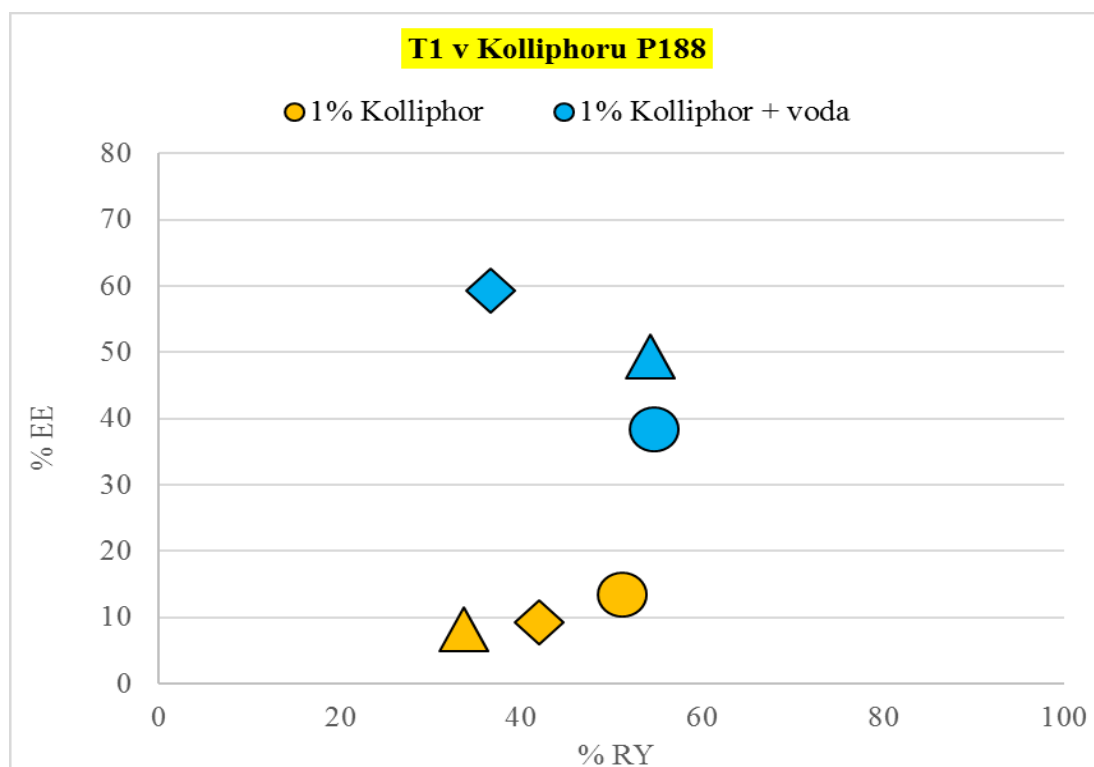
Jedním z větvených polymerů použitých pro formulaci nanočástic v tomto experimentu je PLGA T1. Při jeho syntéze bylo použito 1 % tripentaerythritolu, větvicí složky. Větvením se zvyšuje molekulová hmotnost a hydrofilita polymeru. Při použití 1% Pluronicu jako stabilizátoru i redispergačního média dosahoval hmotnostní výtěžek polymeru v částicích (RY) až 98 % (**graf 6**). PLGA T1 vykazoval **dobré vlastnosti pro enkapsulaci Rhodaminu B**, kdy hodnota EE dosahovala téměř 60 % (**tabulka 6; graf 7**). Toho bylo dosaženo při použití 1% Kolliphoru jako stabilizátoru a vody jako redispergačního média, obdobně jako u PLGA 7/3.

tabulka 12: nejvýhodnější podmínky pro polymer PLGA T1

PLGA T1	<i>stabilizátor</i>	<i>redispergační médium</i>	<i>čas cyklu centrifugace</i>	<i>hodnoty</i>
<i>nejvyšší % RY</i>	1% Pluronic	1% Pluronic	20 minut	98,72
<i>nejvyšší % EE</i>	1% Kolliphor	voda	20 minut	59,26



graf 6: vlastnosti PLGA T1 při použití Pluronicu F-127 jako stabilizátoru



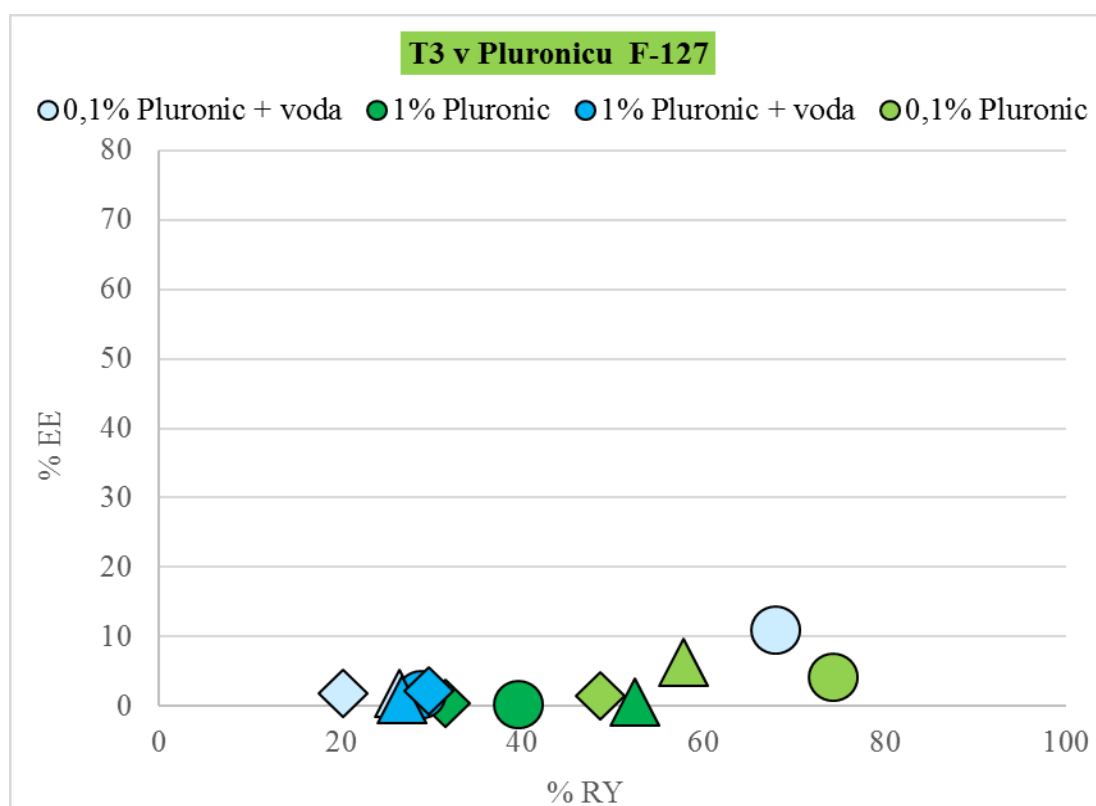
graf 7: vlastnosti PLGA T1 při použití Kolliphoru P188 jako stabilizátoru

4) PLGA T3

Tento větvený polymer má **vysokou číselnou molekulovou hmotnost** (M_n). Díky použití 3 % větvicí složky při syntéze se zvyšuje počet volných hydroxylových skupin, tím pádem roste jeho **hydrofilita**. Částice z něho připravené mají tendenci během centrifugace ireverzibilně agregovat. Při použití 0,1% Pluronicu jako stabilizátoru i redispergačního média má tento polymer poměrně vysoká % RY. Obecně však má v jakémkoliv prostředí **velice nízká % EE** jak je patrné z *grafu 8*.

tabulka 13: nejvýhodnější podmínky pro polymer PLGA T3

PLGA T3	stabilizátor	redispergační médium	čas cyklu centrifugace	hodnoty
nejvyšší % RY	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	5 minut	74,33
nejvyšší % EE	0,1% Pluronic	voda	5 minut	11,04



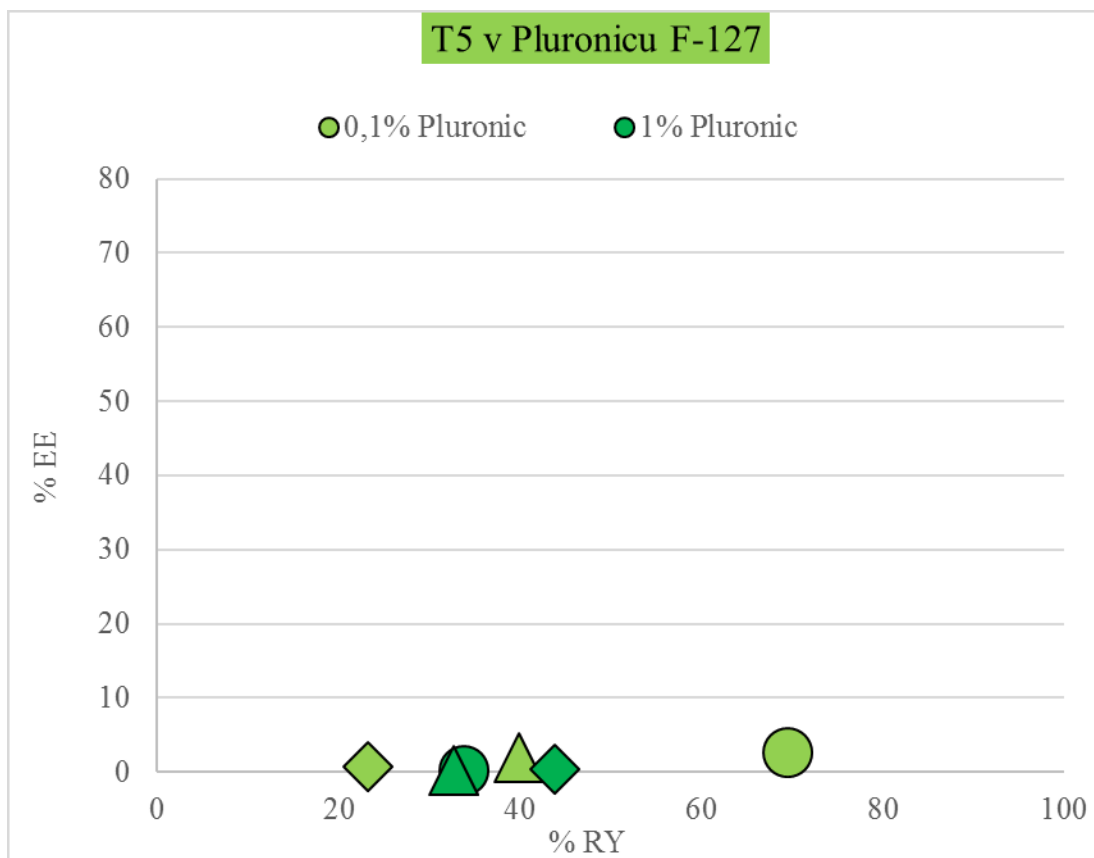
graf 8: vlastnosti PLGA T3 při použití Pluronicu F-127 jako stabilizátoru

5) PLGA T5

Tento polymer je nejvíce větvený, protože při jeho syntéze bylo použito 5 % větvicí složky. Zároveň má **nejvyšší číselnou molekulovou hmotnost (M_n)** a díky mnoha volným hydroxylovým skupinám je ze všech použitých polymerů **nejhydrofilnější**. Z těchto vlastností pravděpodobně plyne nestabilita z něho připravených částic. Ty byly totiž značně **náchylné k agregaci**. Připravit nanočástice se podařilo pouze za použití Pluronicu F-127 jako stabilizátoru i redispergačního média v obou testovaných koncentracích. % EE byla blízká nule (**tabulka 8, graf 9**), proto byl shledán **nevyhovujícím pro přípravu nanočástic** s Rhodaminem B jako enkapsulovanou látkou.

tabulka 14: nejvýhodnější podmínky pro polymer PLGA T5

PLGA T5	<i>stabilizátor</i>	<i>redispergační médium</i>	<i>čas cyklu centrifugace</i>	<i>hodnoty</i>
<i>nejvyšší % RY</i>	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	5 minut	69,53
<i>nejvyšší % EE</i>	0,1% Pluronic	0,1% Pluronic	5 minut	2,68



graf 9: vlastnosti PLGA T5 při použití Pluronicu F-127 jako stabilizátoru

7.3 Vliv použitého stabilizátoru

Také druh a koncentrace použitého stabilizátoru má velice zásadní vliv na výsledné vlastnosti nanočástic. V této práci byly použity dva stabilizátory, oba v koncentraci 0,1 % a 1 %.

1) KOLLIPHOR® P188

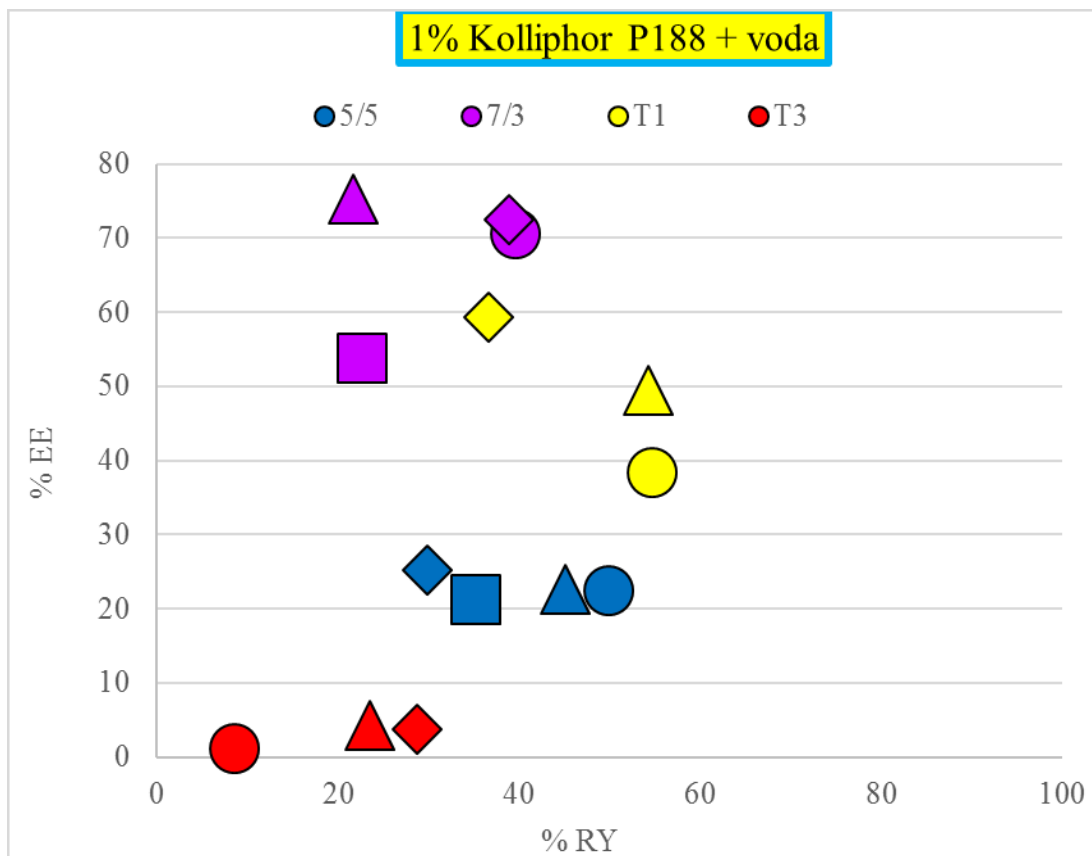
Tento poloxamer je z použitých ten hydrofilnější a má nižší průměrnou M_n (7680–9510 g/mol). HLB > 24. Při jeho použití při přípravě nanočástic vznikaly větší částice se zápornějším zeta potenciálem ve srovnání s Pluronicem (*tabulka 9*).

a) 0,1% KOLLIPHOR

Použití tohoto stabilizátoru v této koncentraci je omezené. Při nanoprecipitaci byl schopen udržet stabilní částice pouze z lineárních polymerů. Během centrifugace byly částice z PLGA 5/5 v jeho prostředí jako jediné dostatečně stabilní, aby mohly být separovány. Částice z PLGA 7/3 se ukázaly být stabilní pouze při kratších časech centrifugace. Při 60minutovém cyklu centrifugace však agregovaly (*tabulka 5*). Proto nebyl použit na přípravu ani separaci nanočástic z větvených polymerů (*tabulky 6, 7, 8*). Tyto polymery měly totiž zvýšenou tendenci agregovat. 0,1% vodný roztok Kolliphoru P188 byl shledán **nejméně vhodným pro přípravu a separaci nanočástic**.

b) 1% KOLLIPHOR

Vyšší koncentrace tohoto stabilizátoru našla v tomto experimentu značné uplatnění. Zvláště pak, když částice v něm připravené byly při centrifugaci purifikovány **vodou jako redispergačním médiem** (*tabulky 10, 11*). Tímto postupem nanočástice dosahovaly **velmi vysokých procentuálních hodnot EE**. Nejvyšších hodnot dosáhl v těchto podmínkách polymer PLGA 7/3 následovaný PLGA T1 (*grafy 5, 7, 10*).



graf 10: vliv použití 1% Kolliphoru (stabilizátor) a vody jako redispergačního média na různé druhy polymerů

2) PLURONIC® F-127

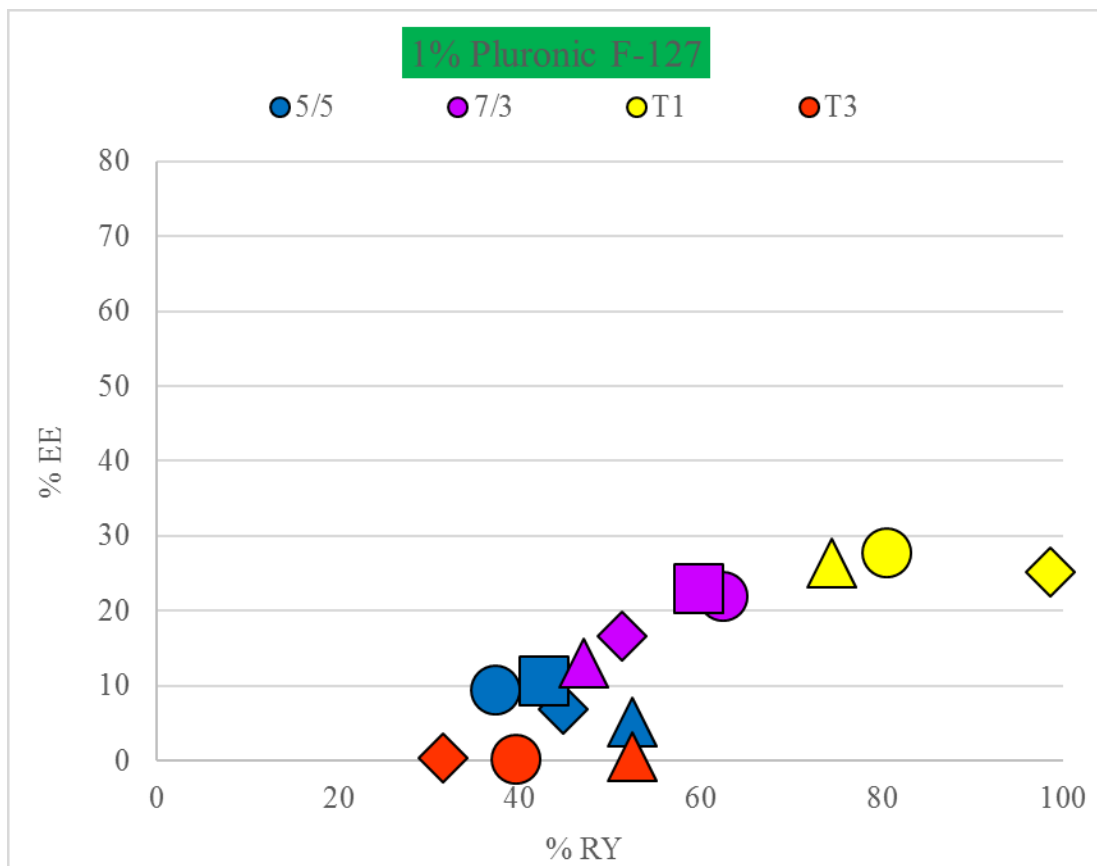
Pluronic je ve srovnání s Kolliphorem mírně lipofilnější a má vyšší průměrnou M_n (12600 g/mol). Při jeho použití k přípravě nanočástic vznikaly zpravidla menší částice (<230 nm) s méně zápornými hodnotami zeta potenciálu ve srovnání s předchozím stabilizátorem (*tabulka 9*). Jeho hodnota HLB = 22. Dá se také říci, že **částice v něm vytvořené jsou stabilnější**. Byl schopen udržet stabilní částice i z větveného polymeru PLGA T5 (*graf 9*), který má v prostředí Kolliphoru silnou tendenci agregovat (*tabulka 8*). Nemůžeme s jistotou říci, která jeho koncentrace je výhodnější. Obecně má Pluronic vhodné vlastnosti ke zvýšení % RY nanočástic.

a) **0,1% PLURONIC**

Při použití této koncentrace jako stabilizátoru i redispergačního média dosahovaly částice všech polymerů kromě PLGA T1 **nejvyšších % RY** (*tabulky 4, 5, 7, 8*).

b) **1% PLURONIC**

Celkově **nejvyššího % RY** byůp dosaženo u polymeru PLGA T1 při použití **1% Pluronicu** jako stabilizátoru i redispergačního média (*graf 6, 11*).



graf 11: vliv použití 1% Pluronicu jako stabilizátoru i redispergačního média

7.4 Vliv redispergačního média

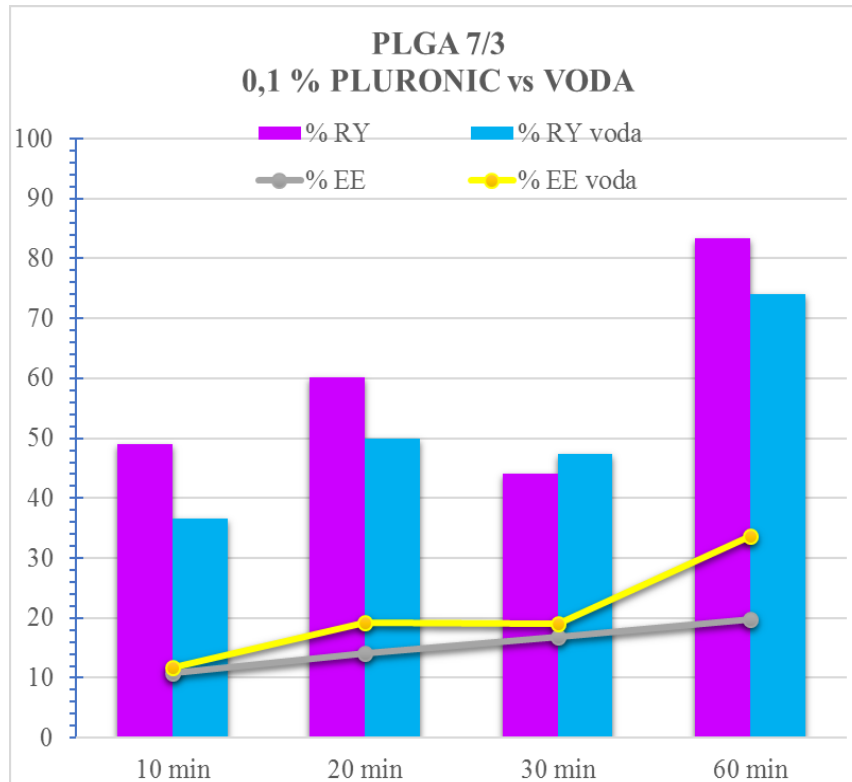
Také vliv redispergačního média použitého během centrifugace měl zásadní dopad na sledované parametry nanočástic. Jako média byly pro všechny šarže použity:

- vodný roztok stabilizátoru, ve kterém byly nanočástice připraveny
- čištěná voda

1) vodný roztok stabilizátoru

Při použití stabilizátoru jako redispergačního média během centrifugace měla většina druhů polymerů **vyšší % RY než při použití vody**. To platí pro všechny částice centrifugované v Pluronicu (*tabulky 10, 11, 12, 13, 14; grafy 2, 4, 6, 8*). Je zde patrný **protektivní efekt stabilizátoru** bránící ireverzibilní agregaci nanočástic.

Zejména použití **0,1% Pluronicu** jako redispergačního média mělo u většiny polymerů za následek **nejvyšší % RY** (*tabulky 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14*). Porovnání s vodou jako redispergačním médiem je patrné z *grafu 12*:

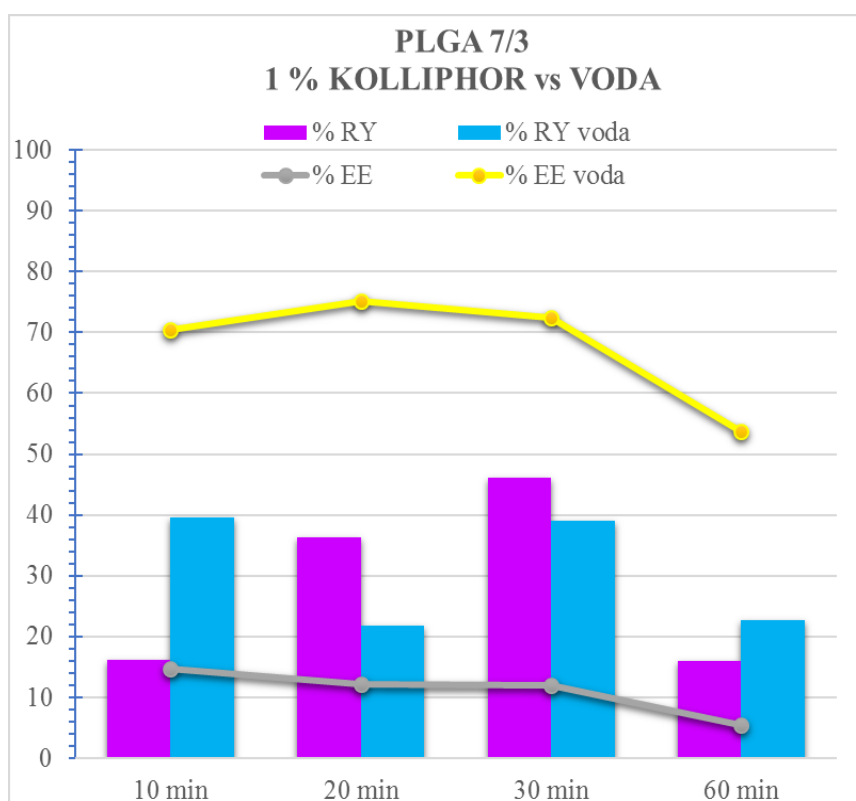


graf 12: porovnání vlivu 0,1% Pluronicu a vody jako redispergačního média

2) čištěná voda

V případě čištěné vody její použití jako redispergačního média spíše pomáhalo zvyšovat % EE nanočástic ve srovnání se stabilizátorem (*graf 12, 13, 15*). Kromě PLGA T5, který je nejméně vhodný pro přípravu nanočástic, bylo u všech druhů polymerů dosaženo **nejvyššího % EE za použití vody jako redispergačního média** (*tabulky 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13*).

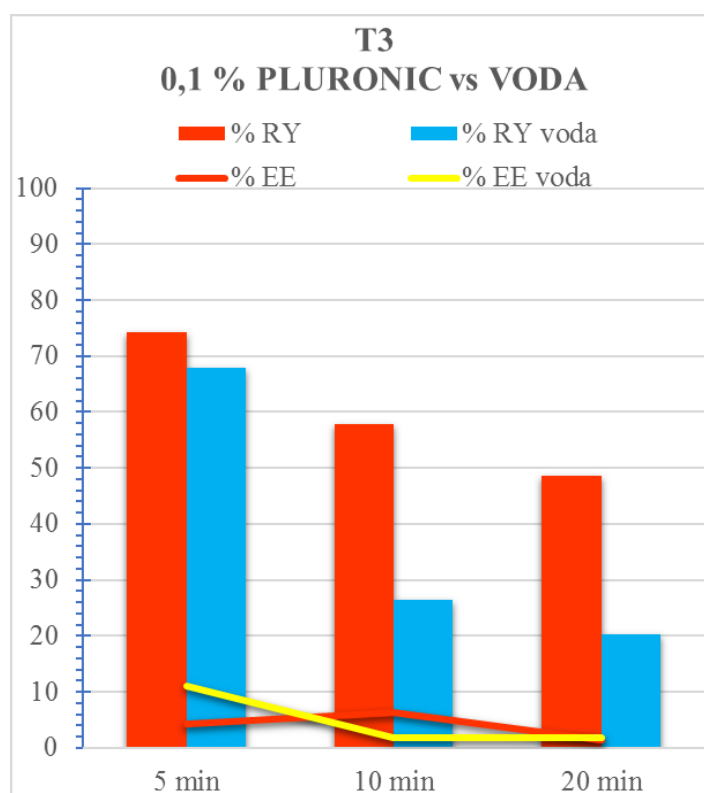
Zejména pak při použití kombinace stabilizátoru **1% Kolliphoru a vody** jako redispergačního média byly hodnoty EE značně vyšší ve srovnání se stabilizátorem. Nejvyššího % EE takto dosáhly nanočástice připravené z PLGA 7/3 a PLGA T1 (*tabulky 5, 6; grafy 5, 7*). Pro porovnání byl sestaven *graf 13*, na kterém je patrné, jak použití vody jako redispergačního média pomáhá zvyšovat enkapsulační efektivitu (EE) nanočástic. Roztok stabilizátoru na fázovém rozhraní povrchu nanočástic totiž pravděpodobně facilituje uvolňování Rhodaminu B během centrifugace.



graf 13: porovnání vlivu 0,1% Kolliphoru a vody jako redispergačního média

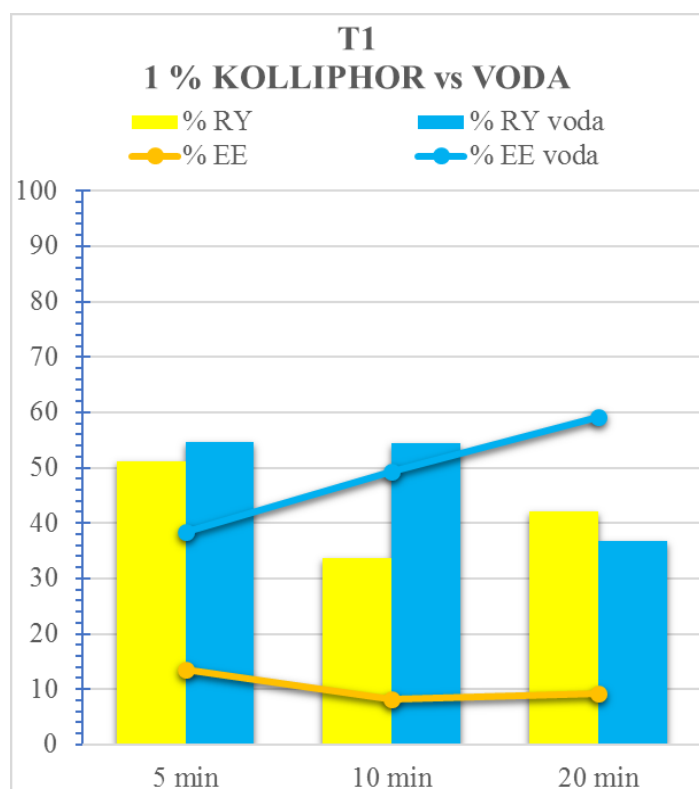
7.5 Vliv času (doby) cyklu centrifugace

Čas centrifugačního cyklu je dalším důležitým parametrem pro optimalizaci separace a purifikace polymerních nanočástic. Pro nanočástice připravené z větvených polymerů bylo třeba zkrátit dobu cyklu centrifugace kvůli jejich tendenci agregovat. Pro nanočástice připravené z **hydrofilnějších** polymerů s vyšší číselnou molekulovou hmotností (PLGA T3, T5) platí, že čím kratší centrifugační čas byl zvolen, tím vyšší byla získaná % RY a EE (*tabulky 13, 14; grafy 8, 14*). Při delším čase centrifugace mají totiž tendenci agregovat. Tyto polymery dosahovaly lepších vlastností při použití **5 minut** cyklu centrifugace. Výjimkou je však větvený polymer PLGA T1, jehož vlastnosti a parametry byly **blíží lineárním**. Ve srovnání s PLGA T3 a T5 je méně hydrofilní a má nižší číselnou molekulovou hmotnost M_n .



graf 14: vliv doby centrifugace na vlastnosti nanočástic u hydrofilnějších vícenásobně větvených polymerů s vyšší číselnou molekulovou hmotností

Lineární polymery (PLGA 5/5, 7/3) a větvený PLGA T1 se při centrifugaci chovaly odlišně v porovnání s PLGA T3 a T5. Podle *tabulek 10, 11, 12* a *grafů 12, 13* byly pro nejvyšší výnosy (% RY) vhodné delší časy (20–60 minut). Optimálním časem pro vysokou EE je více než 20 a méně než 60 minut centrifugace. Dá se předpokládat, že pro optimální hodnoty RY i EE je vhodné zvolit čas cyklu centrifugace někde **mezi 20 a 30 minutami** (*grafy 12, 13, 15*).



graf 15: vliv doby centrifugace na vlastnosti nanočástic

7.6 Vliv velikosti nanočástic

Dále byl zkoumán vliv velikosti nanočástic na % RY a % EE. Je to důležitý parametr pro centrifugaci, která je zásadní pro procentuální hodnoty RY. Význam velikosti vyplývá ze Stokesova vztahu a je zřejmé, že ovlivňuje účinnost centrifugace:

$$D = \sqrt{\frac{18\eta h}{(d_1 - d_0)gt}}$$

D = ekvivalentní sférický průměr částic

η = koeficient viskozity suspenzního média

h = výška suspenze

d_1 = hustota částice

d_0 = hustota suspenze

g = gravitační zrychlení

t = doba sedimentace

Částice připravené v Kolliphoru dosahovaly velikosti vyšší než 230 nm, v Pluronicu zpravidla nižší než 230 nm (*tabulka 9*).

Protože částice v Pluronicu vykazovaly obecně vyšší % RY u všech polymerů (*tabulky 4, 5, 6, 7, 8*), je pravděpodobné, že k tomu přispěla i jejich menší velikost.

Částice z polymerů PLGA 7/3 a T1 dosáhly nejvyššího % EE při použití 1% Kolliphoru P188 jako stabilizátoru. Částice těchto polymerů totiž dosáhly větších velikostí (pro 7/3 241 nm; pro T1 273 nm) (*tabulka 9*).

Je možné, že tento fakt přispěl, vedle dříve zmíněných parametrů, k vysokým procentuálním hodnotám EE, kdy je formulace větších částic výhodná pro enkapsulaci většího množství léčiva. Zároveň však větší částice rychleji sedimentují v gravitačním poli, což vedlo k jejich ireverzibilní agregaci (zejména v prvním cyklu centrifugace) a tím i k poklesu % RY.

8 Závěry

Cílem této práce bylo optimalizovat separační a purifikační protokol nanočástic. Bylo provedeno hodnocení vlivu různých prostředí při jejich přípravě, separaci a purifikaci. Úprava parametrů prostředí spočívala ve volbě druhu polymeru a stabilizátoru pro formulaci nanočástic. Dále bylo také možno vybrat druh redispergačního média a čas cyklu centrifugace pro separaci a purifikaci. Po zhodnocení všech těchto parametrů bylo zjištěno:

1. Nejvhodnějším materiálem pro formulaci nanočástic schopných enkapsulovat Rhodamin B vzhledem k jeho vysokým hodnotám % RY a % EE byl lineární polymer PLGA 7/3.
2. Velmi dobrých výsledků také dosáhl větvený polymer PLGA T1.
3. Pro dosažení nejvyššího výtěžku polymeru (% RY) v nanočásticích se ukázal být vhodný vodný roztok Pluronicu® F-127 v obou jeho testovaných koncentracích. Byl použit jako stabilizátor i redispergační médium (0,1% roztok pro PLGA 7/3 a 1% roztok pro PLGA T1).
4. Nejvyšších hodnot enkapsulační efektivity (% EE) nanočástic bylo docíleno za použití 1% Kolliphoru® P188 jako stabilizátoru a redispergačního média v podobě čištěné vody.
5. Vhodnými časy cyklu centrifugace pro lineární polymery (PLGA 5/5 a 7/3) a větvený PLGA T1 jsou časy mezi 20 a 30 minutami.
6. Vhodným časem pro centrifugaci větvených polymerů s vyšší číselnou molekulovou hmotností (PLGA T3 a T5) je doba kolem 5 minut na cyklus.

9 Použitá literatura

¹ KUMARI, Avnesh, Sudesh Kumar YADAV a Subhash C. YADAV. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, **75**(1), 1-18. ISSN 09277765.

² TAMMAM, Salma N., Hassan M. E. AZZAZY a Alf LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015, **11**(4), 555-577. ISSN 15507033.

³ SCHULENBURG, Mathias. *Nanotechnologie Inovace pro zítřejší svět*, 2007. Lucemburk: Úřad pro úřední tisky Evropských společenství. ISBN 92-79-00879-X.

⁴ JAIN, Kewal K. *The handbook of nanomedicine*. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. ISBN 9781603273183.

⁵ Rabišková M. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia* 2007; 17: 495–501.

⁶ WANG, Hui, Quan HUANG, Hong CHANG, Jianru XIAO a Yiyun CHENG. Stimuli-responsive dendrimers in drug delivery. *Biomaterials Science*, 2016, **4**(3), 375-390. ISSN 2047-4830.

⁷ TORCHILIN, Vladimir P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, **4**(2), 145-160. ISSN 1474-1776.

⁸ HANS, M.L a A.M LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2002, **6**(4), 319-327. ISSN 13590286.

⁹ SOPPIMATH, Kumaresh S, Tejraj M AMINABHAVI, Anandrao R KULKARNI a Walter E RUDZINSKI. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 2001, **70**(1-2), 1-20. ISSN 01683659.

¹⁰ VAUTHIER, Christine a Kawthar BOUCHEMAL. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 2009, **26**(5), 1025-1058. ISSN 0724-8741.

¹¹ CHORNY, Michael, Ilia FISHBEIN, Haim D DANENBERG a Gershon GOLOMB. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release*, 2002, **83**(3). ISSN 01683659.

¹² MURDOCK, Richard C., Laura BRAYDICH-STOLLE, Amanda M. SCHRAND, John J. SCHLAGER a Saber M. HUSSAIN. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicological Sciences*. 2008, **101**(2), 239-253. ISSN 1096-6080.

¹³ Zetasizer Nano ZS. *Malvernpanalytical.com* [online]. Malvern, United Kingdom: Malvern Panalytical, 2018 [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>

¹⁴ GAUMET, Marie, Robert GURNY a Florence DELIE. Fluorescent biodegradable PLGA particles with narrow size distributions: Preparation by means of selective centrifugation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, **342**(1-2), 222-230. ISSN 03785173.

¹⁵ GRABOWSKI, Nadège, Hervé HILLAIREAU, Juliette VERGNAUD, Nicolas TSAPIS, Marc PALLARDY, Saadia Kerdine-Römer a Elias FATTAL. Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, **482**(1-2), 75-83. ISSN 03785173.

¹⁶ ROBERTSON, James D., Loris RIZZELLO, Milagros AVILA-OLIAS, Jens GAITZSCH, Claudia CONTINI, Monika S. MAGÓN, Stephen A. RENSHAW a Giuseppe BATTAGLIA. Purification of Nanoparticles by Size and Shape. *Scientific Reports*, 2016, **6**(1). ISSN 2045-2322.

¹⁷ TIEN, Chi a Bandaru V. RAMARAO. Modeling the performance of cross-flow filtration based on particle adhesion. *Chemical Engineering Research and Design*, 2017, **117**, 336-345. ISSN 02638762.

¹⁸ BRIGGER, Irène, Catherine DUBERNET a Patrick COUVREUR. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**, 24-36. ISSN 0169409X.

¹⁹ NIEBEL, Wiebke, Katharina WALKENBACH, Arnaud BÉDUNEAU, Yann PELLEQUER a Alf LAMPRECHT. Nanoparticle-based clodronate delivery mitigates murine experimental colitis. *Journal of Controlled Release*, 2012, **160**(3), 659-665. ISSN 01683659.

²⁰ ESSA, Sherief, Jean Michel RABANEL a Patrice HILDGEN. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, **411**(1-2), 178-187. ISSN 03785173.

²¹ LEROUX, Jean-Christophe, Eric ALLÉMANN, Fanny DE JAEGHERE, Eric DOELKER a Robert GURNY. Biodegradable nanoparticles — From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 1996, **39**(2-3), 339-350. ISSN 01683659.

²² JANES, K.A., P. CALVO a M.J. ALONSO. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **47**(1), 83-97. ISSN 0169409X.

²³ ULBRICH, W. a A. LAMPRECHT. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *Journal of The Royal Society Interface*, 2009, **7**(Suppl_1), S55-S66. ISSN 1742-5689.

²⁴ YU, Mi Kyung, Jinho PARK a Sangyong JON. Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy. *Theranostics*, 2012, **2**(1), 3-44. ISSN 1838-7640.

²⁵ CALICETI, P. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, **55**(10), 1261-1277. ISSN 0169409X.

²⁶ ENSIGN, Laura M., Richard CONE a Justin HANES. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**(6), 557-570. ISSN 0169409X.

²⁷ CHO, Cheong-Weon, Chang-Gu KEUM, Young-Wook NOH a Sang-Chul SHIN. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 2225. ISSN 1178-2013.

²⁸ DI TORO, Rosanna, Vittorio BETTI a Santi SPAMPINATO. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(dl-lactide-co-glycolide) copolymers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, **21**(2-3), 161-169. ISSN 09280987.

²⁹ ŠNEJDROVÁ, Eva a Milan DITTRICH. Poly(α -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické Listy*, 2011, **105**, 27-33.

³⁰ RASAL, Rahul M., Amol V. JANORKAR a Douglas E. HIRT. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*, 2010, **35**(3), 338-356. ISSN 00796700.

³¹ GUPTA, A.P. a Vimal KUMAR. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *European Polymer Journal*, 2007, **43**(10), 4053-4074. ISSN 00143057.

³² DITTRICH, Milan a Eva SNEJDROVA. Cyclic Swelling as a Phenomenon Inherent to Biodegradable Polyesters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, **103**(11), 3560-3566. ISSN 00223549.

³³ MIDDLETON, John C. a Arthur J. TIPTON. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 2000, **21**(23), 2335-2346. ISSN 01429612.

³⁴ ALEXANDRIDIS, Paschalis a Alan T. HATTON. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1995, **96**(1-2), 1-46. ISSN 09277757.