

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium liberace terbinafinu z PLGA nanočástic

Hradec Králové 2019

Dominika Bielešová

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

V Hradci Králové 30. 4. 2019

Dominika Bieleszová

Poděkování

Velké poděkování patří PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, vedení a lidský přístup. Poděkování patří také Mgr. Juraji Martiškovi za věcné a odborné konzultace a Dr. Georgiosu Paraskevopoulosovi, Ph.D. a PharmDr. Andreji Kováčikovi za permeační studie. Také bych chtěla poděkovat paní Romaně Nobilisové za pomoc a praktické rady při realizaci experimentu. Další poděkování patří Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. z Katedry biofyziky a fyzikální chemie za cenné rady a pomoc při HPLC.

OBSAH

Poděkování.....	3
1 ABSTRAKT	6
2 ABSTRACT.....	7
3 ZADÁNÍ.....	8
4 ÚVOD.....	9
5 Seznam zkratk.....	10
6 TEORETICKÁ ČÁST	11
6.1 Terbinafin.....	11
6.2 Klotrimazol	13
6.3 Cetrimid.....	16
6.4 Enkapsulace léčiv do PLGA nanočástic	17
6.4.1 Vybrané metody enkapsulace léčiv	20
6.4.2 Typy enkapsulovaných molekul	23
6.5 Liberace léčiva z PLGA nosičových systémů.....	25
6.5.1 Faktory ovlivňující liberaci léčiva	25
6.5.2 Mechanismy liberace léčiva.....	26
6.5.3 Fáze liberace léčiva.....	30
7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
7.1 Použité přístroje	32
7.2 Použité materiály.....	33
7.3 Příprava nanočástic	34
7.4 Měření velikosti, polydisperzity a ζ -potenciálu nanočástic	36
7.5 Stanovení enkapsulační účinnosti	37
7.6 Příprava pufrů.....	37
7.7 Sestrojení kalibračních přímk.....	38
7.8 Disoluční testy.....	41

7.9	Stanovení terbinafinu spektrofotometricky.....	42
7.10	Stanovení terbinafinu HPLC	42
7.11	Penetrace terbinafinu do kůže	43
7.12	Stanovení antimikrobní aktivity terbinafinu <i>in vitro</i>	44
8	VÝSLEDKY	45
8.1	Nanočástice s klotrimazolem	45
8.2	Nanočástice s terbinafinem	47
9	DISKUSE.....	55
9.1	Nanočástice s klotrimazolem	55
9.2	Nanočástice s terbinafinem	57
9.3	Vstup terbinafinu do kůže	59
9.4	Antimikrobní účinnost terbinafinu.....	60
10	ZÁVĚR	62
11	seznam literatury.....	63

1 ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

Autorka: Dominika Bieleszová
Název diplomové práce: Liberace terbinafinu z polyesterových nanočástic
Školitelka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Účinnost a biodostupnost antimykotik je často limitována biofarmaceutickými a farmakokinetickými faktory. Tyto problémy by mohla vyřešit enkapsulace molekul do nanočástic. Biodegradabilní polymerní nanočástice tvořené větvenými kopolymery kyseliny mléčné a glykolové byly enkapsulovány terbinafinem nebo klotrimazolem. Byla měřena velikost částic, polydisperzita a ζ -potenciál a stanovena enkapsulační účinnost. Byla testována liberace terbinafinu z nanočástic při pH 3.0, pH 5.0. Množství uvolněného léčiva bylo stanoveno spektrofotometricky i metodou HPLC. Byla testována *in vitro* permeace terbinafinu přes kůži ve Franzových celách a antimikrobní aktivita na *Candida albicans*. Z výsledků vyplývá, že stabilní nanočástice s klotrimazolem lze připravit z polyesteru větveném na tripentaerythritolu. Pro nanočástice s terbinafinem je vhodný polyester větvený na kyselině polyakrylové. Disoluční testy ukázaly vliv pH prostředí i typ polyesteru na rychlost liberace terbinafinu z nanočástic. V kyselejších prostředí docházelo k rychlejšímu uvolnění terbinafinu. Tenzid v koncentraci 0,05 % v disolučním médiu zpomalil liberaci léčiva. Z polyesteru větveném na dipentaerythritolu se terbinafin uvolnil rychleji než z polyesteru větveném na kyselině polyakrylové. Permeační testy prokázaly detekovatelné množství terbinafinu v epidermis, přes kůži po topické aplikaci kůží neprochází. Byla potvrzena antimikrobní aktivita nanočástic s terbinafinem *in vitro*.

Klíčová slova: terbinafin, klotrimazol, větvené PLGA, nanočástice, disoluce, permeace přes kůži, antimikrobní aktivita

2 ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

Author: Dominika Bieleszová
Title of Diploma thesis: Terbinafine release from polyester nanoparticles
Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Efficiency and bioavailability of antimycotic drugs are limited due to many biopharmaceutical and pharmacokinetics factors. Nanoparticles hold great promise to overcome these limitations. Biodegradable polymeric nanoparticles (NPs) based on branched poly(lactide-co-glycolide) loaded by terbinafine and clotrimazole were prepared. The particle size, polydispersity, ζ -potential were measured. Encapsulation efficiency was calculated. Dissolution tests with terbinafine were carried out at pH 3.0 and pH 5.0. The amount of drug released was determined spectrophotometrically and high performance liquid chromatography. Permeation experiment with terbinafine was performed with the human skin using Franz cells. The antimicrobial activity of terbinafine was tested. Results showed, that NPs with clotrimazole based on polyester branched on tripentaerythritole can be prepared. Polyester branched on polyacrylic acid is suitable for a preparation of NPs with terbinafine. The dissolution tests showed influence of medium pH and type of polyester on velocity of terbinafine release from NPs. Liberation of terbinafine was faster in more acidic medium. Tenside in concentration 0,05 % slowed down liberation of terbinafine. Terbinafine release proceeded more rapidly from polyester branched on dipentaerythritole than from polyester branched on polyacrylic acid. Permeation experiment showed detectable amount of terbinafine in the epidermis, through the skin terbinafine does not penetrate. The antimicrobial activity in vitro of terbinafine loaded in NPs was confirmed.

Key words: terbinafine, clotrimazole, branched PLGA, nanoparticles, dissolution, skin penetration, antimicrobial activity

3 ZADÁNÍ

Zadáním diplomové práce byla příprava nanočástic s klotrimazolem a terbinafinem, stanovení enkapsulační účinnosti, studium liberace a penetrace terbinafinu do kůže.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Připravit nanočástice enkapsulované terbinafinem a klotrimazolem nanoprecipitační metodou. Jako nosič léčiva použít polyester kyseliny glykolové a mléčné (PLGA) v poměru kyselin 50:50, větvený na kyselině polyakrylové, dipentaerythritolu, nebo tripentaerythritolu. Použít roztok cetrimidu ve vodě v koncentracích 0,05 %, 0,01 %, 0,005 % nebo 0,001 % jako vnější fázi.
2. Provést disoluční testy terbinafinu z nanočástic do pufrů citrát-fosfátového pH 5,0; citrát-fosfátového pH 5,0 s 0,05 % cetrimidu a citrátového pufru pH 3,0 při teplotě 37,0 °C. Množství uvolněného terbinafinu z polymerních systémů stanovit spektrofotometricky a metodou HPLC.
3. Změřit velikost, ζ -potenciál a polydisperzitu nanočástic s klotrimazolem.
4. Zjistit vliv formulačních faktorů na průběh liberace terbinafinu z polymerních systémů a vliv formulačních faktorů na velikost a stabilitu nanočástic s enkapsulovaným klotrimazolem.
5. Připravit nanočástice s terbinafinem pro permeační testy terbinafinu do kůže a pro hodnocení protimikrobní aktivity terbinafinu *in vitro*.

4 ÚVOD

Účinnost a biodostupnost antimykotik je často limitována biofarmaceutickými a farmakokinetickými faktory. Tyto problémy by mohly vyřešit nanočásticové systémy s řízeným uvolňováním léčiva. Velmi často používaným polymerem pro tvorbu nanočástic je polyester kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Je to biodegradabilní polymer, který je netoxický a degraduje se na produkty, které jsou metabolizovány a eliminovány fyziologickými metabolickými cestami. Tato práce navazuje na diplomové práce Vlastimila Baráka a Adama Holase.^{1,2} Zabývá se nanoformulacemi z polyesteru PLGA s enkapsulovanými antimykotiky terbinafinem a klotrimazolem a studuje vliv formulačních faktorů na velikost nanočástic, profil liberace a penetraci léčiva do kůže a antimikrobní účinek terbinafinu ve formulaci s polyestrem PLGA.

5 SEZNAM ZKRATEK

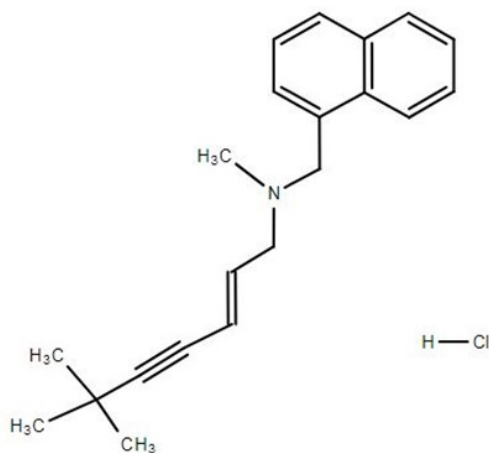
2A	polyester kyseliny mléčné a glykolové větvený na kyselině polyakrylové
3T	polyester kyseliny mléčné a glykolové větvený na tripentaerythritolu
8D	polyester kyseliny mléčné a glykolové větvený na dipentaerythritolu
API	účinná látka
ATC	anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv
ATP	adesinosintrifosfát
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém
EE	enkapsulační účinnost
FAD	flavinadenindinukleotid
g'	stupeň větvení
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
M_n	číselně střední molární hmotnost
M_w	hmotnostně střední molární hmotnost
M_w/M_n	index polydisperzity
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PLGA	polyester kyseliny mléčné a glykolové
RI	index lomu
Ter	terbinafin
Ter-HCl	terbinafin-hydrochlorid
T_g	teplota skelného přechodu

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Terbinafin

Lékopisný název:	Terbinafin-hydrochlorid
Název IUPAC:	(E)-N,6,6-trimethyl-N-(naphthalen-1-yl (hept-2-en-4-yn-1-amin; hydrochlorid
Sumární vzorec:	C ₁₂ H ₂₅ ClN
Molekulová hmotnost:	327,896 g/mol

Obr 1: Strukturní vzorec terbinafin-hydrochloridu.³



Terbinafin je allylaminové fungistatické až fungicidní antimykotikum s poměrně širokým antifungálním spektrem: *Trichophyton* spp., *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum* spp., *Malassezia* spp, *Leishmania major*, *L. mexicana*, méně citlivé jsou kandidy. Mezi jeho indikace patří dermatofytózy, onychomykózy vyvolané dermatofyty, chronická mukotónní kandidóza a kožní leishmanióza.⁴ Tato látka je inhibitorem skvalenepoxidázy, což je klíčový FAD-dependentní enzym v biosyntetické dráze ergosterolu u hub a cholesterolu u savců, který katalyzuje stereospecifickou epoxidaci skvalenu na 2,3-skvalenoxid. K savčímu enzymu vykazuje mnohem nižší afinitu než k tomuto enzymu vyskytujícímu se u hub. Po perorálním podání se vstřebá přibližně 70 % terbinafinu z aplikované dávky nezávisle na jídle. Absorpce probíhá lineárně ze žaludku. Optimální pH pro absorpci je tedy rozmezí pH 3,0 až pH 5,0. Po topickém podání krému nebo gelu dosahuje koncentrace terbinafinu od 746 do 949 ng/cm². Koncentrace terbinafinu naměřené v horní vrstvě kůže mohou být až o řád nižší u jedinců trpících infekcí v porovnání se zdravými jedinci. Distribuční objem terbinafinu je 20 l/kg.

Terbinafin je molekula lipofilní povahy, kumuluje se proto v tucích a nehtech. Po perorálním podání se eliminuje až po jednom měsíci od vysazení léčiva, a to z velké části ledvinami. Terbinafin je také silným inhibitorem oxidázy CYP2D6. Mezi substráty této oxidázy patří např. venlafaxin, amitriptylin. Mezi další léčiva, se kterými terbinafin interaguje, lze zařadit metoprolol, propafenon nebo cimetidin. Clearance terbinafinu po jednorázovém podání je 100 hodin, eliminační poločas po dlouhodobém několika měsíčním podání je až 22 dnů. Tato látka se vylučuje s 80 % ledvinami.⁵ Terbinafin je obecně dobře tolerován i když se vyskytují případy hepatotoxicity po orální aplikaci tohoto léčiva.⁶

Terbinafin se řadí dle biofarmaceutického klasifikačního systému do třídy dva, což znamená, že je špatně rozpustný ve vodném prostředí a dobře prostupuje v gastrointestinálním traktu (vysoká permeabilita léčiva). Problém s rozpustností lze vyřešit např. přípravou tuhé disperze s poloxamerem, případně jinými polymery.⁷ Terbinafin jako léčivo se používá v Evropské unii v několika lékových formách: krém, roztok a tablety. V komerčních krémech se používá jako vehikulum pro terbinafin kombinace cetylaloholu, cetylstearylalkoholu v 1 % Terbistad krému a v 10 mg/g Lamisil krému se používá jako vehikulum kombinace cetylalkoholu a stearylalkoholu. Zajímavým léčivem je Lamisil 1x kožní roztok 1 %. Toto léčivo obsahuje jako pomocné látky akrylatooktylakrylamidový kopolymer, hyprolosu, střední nasycené triacylglyceroly a ethanol 96% (V/V). Zmíněný kopolymer vytvoří na povrchu kůže tenký okluzivní film. Po aplikaci nesmí pacient po dobu 24 hodin tuto plochu omývat, aby měl terbinafin dostatečný čas penetrovat do stratum corneum. V souhrnu údajů o přípravku se uvádí, že při aplikaci tohoto kožního roztoku se předpokládá až 2x vyšší množství penetrovaného terbinafinu v porovnání s konvenčními krémy. K relapsu onemocnění po 3 měsících dochází jen u 12,5 % léčených tímto roztokem.⁸

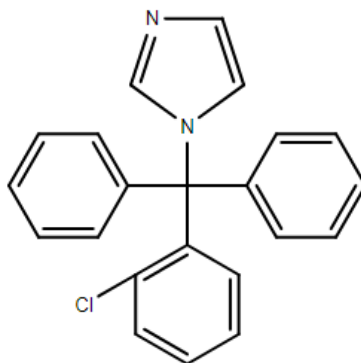
Tab 1: Léčivé přípravky s terbinafinem registrované v České republice.

ATC skupina	Léková forma	Název léčiva	Výrobce
D01BA02 antimykotika pro systémovou aplikaci	tablety	Lamisil 150 mg; 250 mg	Novartis s.r.o.
		Terbinafin ACTAVIS 250 mg	Actavis Group
		Terfimed 250 mg	PRO.MED.CS
D01AE15 ostatní antimykotika pro lokální aplikaci	krém	Lamisil 10 mg/g	GlaxoSmithKline
		Terbistad 1% krém	Stada
	kožní roztok	Lamisil 1x kožní roztok 1%	GlaxoSmithKline

6.2 Klotrimazol

Lékopisný název:	Klotrimazol
Název IUPAC:	1-[(2-chlorophenyl)-diphenylmethyl]imidazol
Sumární vzorec:	$C_{22}H_{17}ClN_2$
Molekulová hmotnost:	344,842 g/mol

Obr 2: Strukturální vzorec klotrimazolu.³



Klotrimazol se řadí mezi syntetická azolová antimykotika, přesněji do podskupiny imidazolových antimykotik. Podstatou mechanismu jeho účinku je inhibice 14 α -demethylázy, což je enzym důležitý pro syntézu ergosterolu v buněčné stěně. Klotrimazol je fungistatické až fungicidní antimykotikum se širokým spektrem účinku: *Malassezia furfur*, *Candida albicans*, dermatofyty, aspergily, streptokoky, stafylokoky, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides* spp., *Gardnerella vaginalis* a norkardie. Mezi indikace tohoto léčiva patří: dermatomykózy, seboroická dermatitida, *acne vulgaris*, rosacea, periorální dermatitida, kandidózy zevních genitálií, smíšené kožní infekce (bakteriální a mykotické), erytrazma, onychomykóza,

vulvovaginální kandidózy, smíšené vulvovaginitidy (kandidové a bakteriální).⁴ Na mykózy kůže a nehtů se používá ve formě kožního roztoku, krému nebo pasty v koncentraci 10 mg/g. Na vulvovaginální mykózy se používá ve formě vaginálních tablet v množství 500 mg, 200 mg, 100 mg v závislosti na délce léčby. Vaginální tablety lze kombinovat s krémy, kde klotrimazol je v koncentraci 10 mg/g; 20 mg/g. Klotrimazol při lokálním podání nemá výrazné nežadoucí účinky. Může se objevit kontaktní dermatitida, alergická reakce nebo zarudnutí kůže.⁹

Klotrimazol nevykazuje pouze antimykotický účinek, zkoumá se jeho použití v léčbě malárie a také jeho antikancerogenní účinky. Toto antimykotiku také inhibuje vápenatými ionty aktivovaný draselný kanál, který je abnormálně aktivní v malárii postižených erythrocytech. Triarylmethylová skupina klotrimazolu je nositelem antimalarického účinku.¹⁰ Klotrimazol se intenzivně studuje v kombinaci s 4-aminoquinolinem, jako nadějný antimalarikum. Tato kombinace sloučenin je účinná na chlorochin-senzitivní i rezistentní kmeny *Plasmodium falciparum*.¹¹ Klotrimazol vykazuje antikancerogenní aktivitu tím, že např. navozuje apoptózu postižených buněk, depolarizuje mitochondrie, inhibuje klíčové glykolytické regulační enzymy, snižuje množství intracelulárního ATP.¹² Také indukuje inhibici růstu buněk v G₁ a M-fázi buněčného cyklu. Klotrimazol se studuje v kombinaci s paklitaxelem, jako slibná kombinace pro léčbu rakoviny prsu.¹³ Zkoumá se také jeho antikancerogenní aktivita ve formě komplexu s ionty Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ru²⁺ a Ni²⁺, kde se nachází ve formě biologicky aktivního ligandu.^{14,15}

Klotrimazol se řadí dle BCS do třídy dva, proto se hledají formulace, které by zvýšily rozpustnost léčiva, případně by prodloužily čas adheze léčiva na epitel. Pro vyřešení tohoto problému se testují bioadhezivní polymerní vaginální tablety, formulace klotrimazolu ve formě liposomů, vaginální gel na bázi mikroemulze, bioadhezivní gel, vaginální gel na bázi mikrosfér a vaginální tablety se sprejově sušenými mikrosférami.¹⁶ Silné kyseliny a báze a vysoká teplota působí rozklad klotrimazolu. Rozkladnými produkty klotrimazolu při použití silných kyselin je imidazol a (o-chlorfenyl)-difenyl methanol.¹⁷

Klotrimazol se používá při přípravě individuálně připravovaných léčivých přípravků. V případě hromadně vyráběných léčivých přípravků se používá ve formě vaginálních tablet, krémů a kožních roztoků.

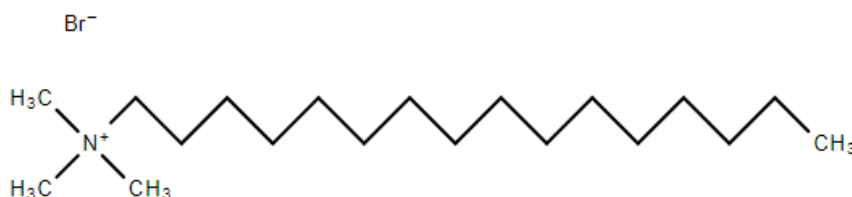
Tab 2: Léčivé přípravky s klotrimazolem registrované v České republice.

ATC skupina	Léková forma	Název léčiva	Výrobce
D01AC01 antimykotika pro lokální aplikaci	pasta	Aknecolor krémpasta 10 mg/g	Galderma International
		Acnecolor light krémpasta 10 mg/g	Galderma International
		Imazol krémpasta 10 mg/g	Balilleul
	krém	Candinene krém 10 mg/g	Ratiopharm
		Canesten 10 mg/g	Bayer
		Clotrimazol AL 1%	Aliud Pharma
		Clotrimazole recordati 10 mg/g	Herbacos Recordati
	kožní roztok	Candibene 1% spray	Ratiopharm
		Canifug-Lösung 1%	Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel
Clotrimazol AL spray 1%		Aliud Pharma	
G01AF02 gynekologická antiinfektiva a antiseptika	tablety	Candibene 100 mg; 200 mg	Ratiopharm
		Canesten Gyn 1 den 500 mg	Bayer
		Clotrimazol AL 100; 200	Aliud Pharma
	tablety a krém	Canesten Gyn combi pack	Bayer
	krém	Canesten Gyn 6 dní 10 mg/g	Bayer
Jenamazol 2 %		Quintessence	
Kombinované přípravky	krém	Imacort (+ prednisolon)	Balilleul
		Imazol Plus (+ hexamidin diisetionas)	Balilleul

6.3 Cetrimid

Lékopisný název:	Cetrimid
Název IUPAC:	trimethyl(tetradecyl)azanium; bromid
Sumární vzorec:	$C_{17}H_{38}BrN$
Molekulová hmotnost:	336,402 g/mol

Obr 3: Strukturální vzorec cetrimidu.³



Cetrimid je kvartérní amoniové antiseptikum a surfaktant. Obsahuje především trimethyltetradecylamonium bromid a menší množství hexadexyltrimethylamonium bromid. Ve vodném prostředí dochází k disociaci cetrimidu na biologicky aktivní kation a neaktivní anion. Cetrimid působí antisepticky na bakterie G⁺ i G⁻, kvasinky, plísně. Je účinný také proti některým virům, avšak neúčinný vůči bakteriálním spórám. Přípravky obsahující tuto látku jsou určeny převážně k topickému podání. V koncentraci 1-3 % se používá ve formě šampónů v léčbě seborrhoické dermatitidy. V koncentraci 0,1-1 % se používá ve formě vodných roztoků a krémů jako antiseptikum a čisticí prostředek.¹⁸ V koncentraci 0,005 % se používá jako protimikrobní přísada v očních přípravcích. Používá se také jako čisticí a dezinfekční prostředek pro tuhé kontaktní čočky. Nejvyšší účinnost má v neutrálním a mírně alkalickém pH, v kyselém pH jeho účinek významně klesá.¹⁹ Cetrimid se po topickém podání váže především na kolagen, keratin a tvoří s nimi cetrimid-proteinové komplexy. Z topických lékových forem se téměř nevstřebává.¹⁸ Nežádoucím účinkem po aplikaci této látky je kontaktní alergická dermatitida, byly zaznamenány i případy popálenin a kožní nekrózy po aplikaci na kůži v kombinaci s jinými antiseptiky.²⁰

Cetrimid také vykazuje antikancerogenní účinky vůči rakovinným buňkám hlavy a krku. Navozuje apoptózu buněk, pomocí svého delokalizovaného pozitivního náboje a lipofilní struktury se tento kation dostane přes hydrofobní membránu do mitochondrie, kde působí

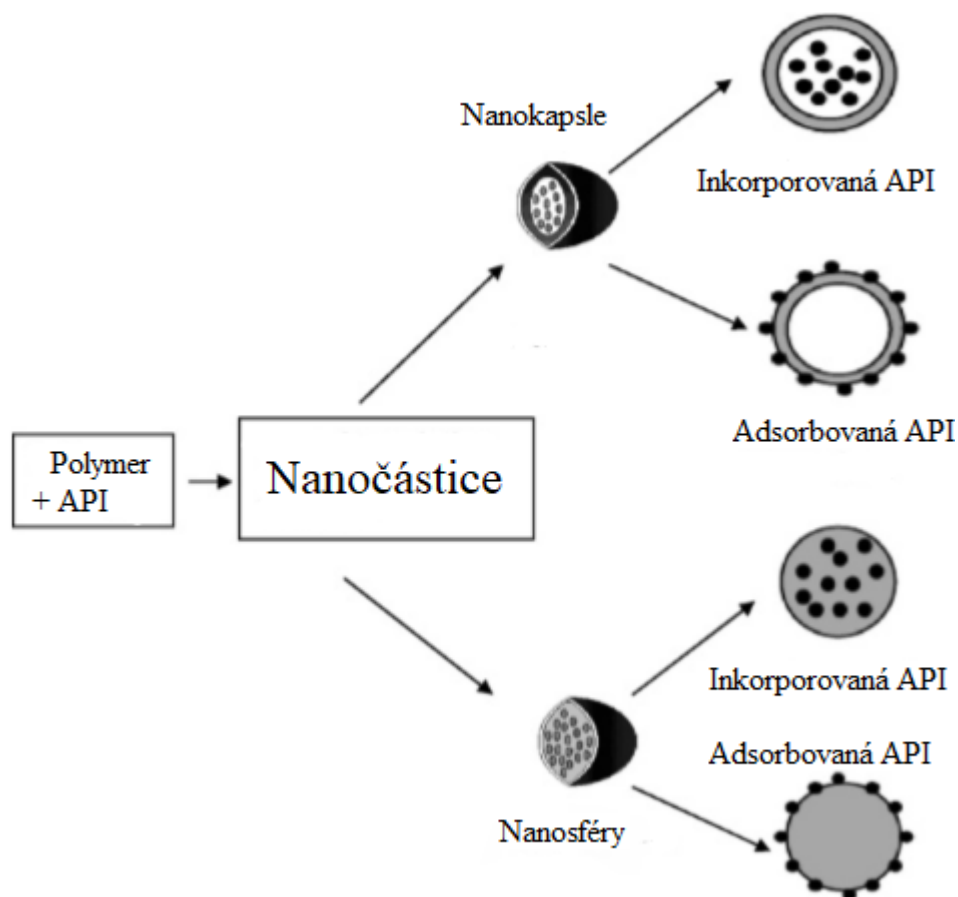
silně toxicky. V aplikovaných dávkách působí toxicky na rakovinné buňky, ale nikoli na buňky zdravé. Všechny tyto experimenty se prováděly v podmínkách *in vitro*.²¹

V České republice není registrovaný žádný léčivý přípravek, který by obsahoval jako účinnou látku cetrimid.

6.4 Enkapsulace léčiv do PLGA nanočástic

Enkapsulace je technologická metoda, kdy látky v pevné, tekuté nebo plynné formě jsou inkorporovány do matrix nebo obaleny sekundárním obalem, případně adsorbovány na povrch polymeru za vzniku nanočástic. Účinné látky jsou chráněny před vlivy prostředí. Takto enkapsulované aktivní látky lze transportovat na požadované místo v těle nebo pouze zpomalit jejich uvolňování do okolního prostředí.^{22,23}

Obr 4: Klasifikace biodegradabilních nanočástic a typy zachycení aktivní látky do nosičových systémů.²⁴

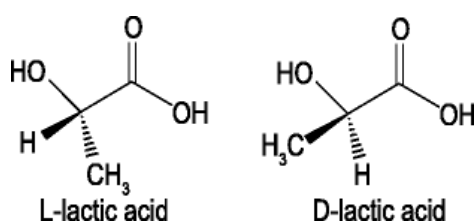


Důvody enkapsulace léčiv:

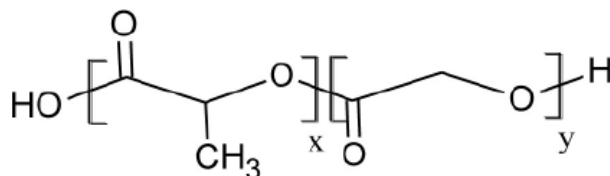
- Prodloužení uvolňování léčiva
- Cílená distribuce
- Maskování nežádoucích organoleptických vlastností: chuť, vůně, barva
- Ochrana senzitivních látek před prostředím v trávicím systému
- Udržení stability léčiva před oxidací, teplotou, vlhkostí nebo světlem
- Snížení odpařování těkavých látek
- Ochrana před inkompatibilitou mezi léčivy
- Snížení toxicity léčiva
- Snížení hygrokopických vlastností léčiva²⁵

Polyester kyseliny mléčné a glykolové je syntetický biodegradabilní polymer. Syntetizuje se celou řadou metod: katalytickou polykondenzací za sníženého tlaku, azeotropickou polykondenzací, polymerací v pevném stavu nebo polymerací za otevření kruhu.²⁶ Kyselina mléčná (kyselina 2-hydroxypropanová) má jedno centrum chirality a vyskytuje se ve formě D a L enantiomeru. Tako kyselina se získává mléčným kvašením kukuřice a jiných agrikulturních surovin. Kyselina glykolová (kyselina 2-hydroxyethanová) se produkuje biochemickými enzymatickými metodami nebo chemickou cestou z kyseliny chloroctové a hydroxidu sodného.²⁷

Obr 5: Enantiomery D a L kyseliny mléčné.²⁸



Obr 6: Struktura kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové.²⁹



Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové má amorfni strukturu a teplotou skelného přechodu v rozmezí 45,0 až 55,0 °C. Chemicko-fyzikální vlastnosti tohoto polymeru závisí na molekulární hmotnosti, poměru kyseliny mléčné a glykolové, krystalinitě, teplotě skelného přechodu, hydrofobicitě a povrchovému napětí.

Poměr kyseliny mléčné a glykolové ve struktuře řetězce polymeru ovlivňuje stupeň krystalinity, schopnost hydrolyzovat, mechanickou sílu, teplotu skelného přechodu. Kyselina glykolová, která v bočním řetězci neobsahuje methylovou skupinu, má v porovnání s kyselinou mléčnou vysokou schopnost krystalizace. Kyselina mléčná je proto více hydrofobní. To je také důvod, proč kopolymery PLGA s obsahem vyššího poměru kyseliny mléčné jsou méně hydrofilní a podléhají degradaci pomaleji.

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové má na konci řetězce hydroxylovou nebo karboxylovou skupinu. Polymer PLGA hydroxylovou skupinou na konci řetězce je více odolný vůči hydrolýze.⁶⁴

Připravují se také modifikované nosiče s PLGA polymerem pro zlepšení formulačních vlastností. Pro tyto modifikace se používá např. PEG, PEO pro zvýšení hydrofility.

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové je široce používaný jako nosič léčiv a v teranostice. Americká Food and Drug Agency již schválila použití několika léčiv obsahujících jako nosiče léčiv tento polymer.³⁰

Množství navázaného léčiva a typ interakce mezi léčivem a nanočásticí závisí na chemické struktuře léčiva a polymeru. Adsorpční isoterma je jednou z možností, jak predikovat typ vazby mezi léčivem a polymerem a také vazebný poměr množství léčiva ku množství polymeru. Adsorpční isoterma pomáhá také v určení vhodné metody enkapsulace. Jelikož nanočástice jsou koloidním systémem, výpočet enkapsulovaného léčiva je poměrně nesnadný. Jednou z nejspolehlivějších metod, jak získat tuto hodnotu je odstranění supernatantu s nenavázaným léčivem centrifugací nebo filtrací. Následuje promytí nanočástic, aby došlo k úplnému odstranění neenkapsulované látky. A poté se EE stanovuje z nanočástic např. metodou HPLC. Enkapsulační účinnost (EE) udává reálné množství léčiva, které se inkorpovalo do nanočástice v poměru vůči celkovému množství této látky použité při přípravě nanočástic. Modifikací enkapsulačních metod se cílí na zvyšování enkapsulační účinnosti.³¹

$$EE = \frac{\text{množství navázaného léčiva}}{\text{celkové množství použitého léčiva}}$$

6.4.1 Vybrané metody enkapsulace léčiv

Metody přípravy nanočástic lze rozdělit do dvou základních skupin:

- Chemické metody (např. koacervace)
- Fyzikálně-chemické metody (např. sprejové sušení)³⁵

Při volbě metody přípravy nanočásticového systému je zapotřebí přihlížet k několika faktorům, jako je kompatibilita polymeru se zvoleným léčivem, dostatečná enkapsulační účinnost, vhodné podmínky přípravy v závislosti na použitém léčivu (teplota, rozpustnost, pH).

Nanoprecipitace je metoda, kdy se hydrofobní léčivo a polymer rozpustí v organickém rozpouštědle. Tento roztok se poté přidává do vodného roztoku, ve kterém jsou polymer i léčivo nerozpustné a zároveň je organické rozpouštědlo neomezeně mísitelné. Difuze rozpouštědla do vody způsobí precipitaci polymeru a léčiva za vytvoření nanočástic. Metoda nanoprecipitace bez použití surfaktantu se nazývá Ouzo efekt. Nanoprecipitace se skládá ze čtyř po sobě navazujících kroků: supersaturace, nukleace, růst částic pomocí kondenzace, růst částic pomocí koagulace. Metoda je vhodná především pro malé hydrofobní molekuly, kdy enkapsulační účinnost dosahuje téměř 100%.³² Nanoprecipitace se skládá ze čtyř po sobě navazujících kroků: supersaturace, nukleace, růst částic pomocí kondenzace, růst částic pomocí koagulace. Metoda je vhodná především pro malé hydrofobní molekuly, kdy enkapsulační účinnost dosahuje téměř 100%. Pomocí nanoprecipitace lze také připravit nanočástice s enkapsulovanou biomakromolekulou. Tyto nanočástice se připravují ve dvou krocích: nejprve se do vodného roztoku obsahujícího makromolekulu přidá organické rozpouštědlo, kdy se vytvoří makromolekulové částice. Takto vzniklé makromolekulové nanočástice se přidají do organického rozpouštědla s rozpuštěným polymerem. Tato směs polymeru a makromolekul v organickém rozpouštědle se pomalu přidává do vodného roztoku za vzniku nanočástic s enkapsulovanou makromolekulou.³³

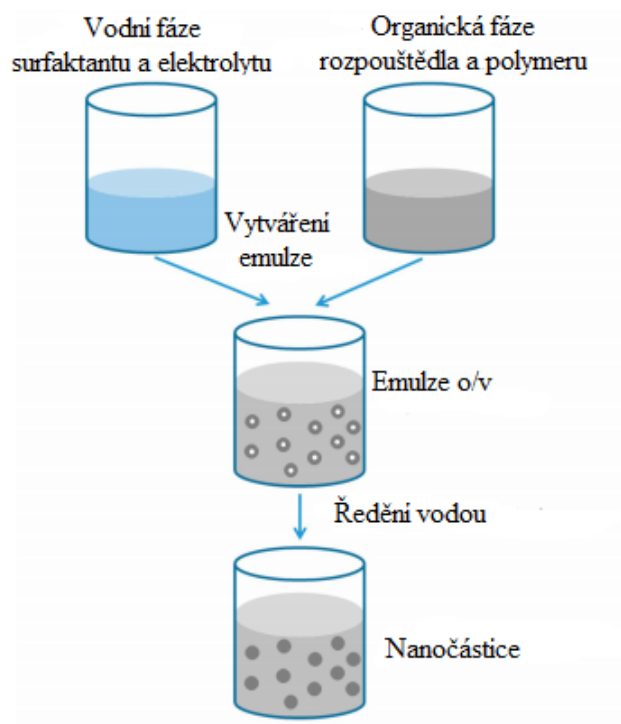
Evaporace rozpouštědla z emulze je metoda, kdy polymer je rozpuštěný v těkavém rozpouštědle. Do tohoto roztoku polymeru se disperguje nebo rozpustí léčivo a připraví se takto vnitřní fáze. Tento roztok polymeru a léčiva se poté smísí s kontinuální vodní fází, která obsahuje vhodný emulgátor za vzniku. Poté dochází k difuzi rozpouštědla do kontinuální fáze, přičemž na rozhraní vody a vzduchu se odpařuje. Během odpařování

rozpouštědla dochází k tvorbě nanočástic.³⁴ Existuje několik typů této metody. První z nich je evaporace rozpouštědla z emulze o/v, kdy se použije pro rozpuštění polymeru s vodou nemísitelné rozpouštědlo. Tato metoda je vhodná spíše pro hydrofobní léčiva.³⁵ Další možností je evaporace rozpouštědla z násobné emulze v/o/v. Nejprve vzniká primární v/o emulze, která se dále zpracovává do vnější vodné fáze za vzniku dvojité emulze. Prostřední, olejová fáze působí jako bariéra proti úniku léčiva z vnitřní vodné fáze do vnější vodné fáze. Metoda je vhodná pro léčiva dobře rozpustná ve vodě.³⁶

Další metodou přípravy nanočástic je *emulgace s difuzí rozpouštědla*. Rozpouštědlo mírně rozpustné ve vodě se nasatí vodou (kontinuální fáze). Polymer a léčivo se rozpustí ve vnitřní fázi (voda nasycena rozpouštědlem). Za stálého míchání se do kontinuální fáze přidává vnitřní fáze za vzniku emulze. Aby se vytvořily nanočástice do vzniklé emulze se přidá voda. Do kontinuální fáze difunduje zbylé organické rozpouštědlo za tvorby nanočástic.^{37,38}

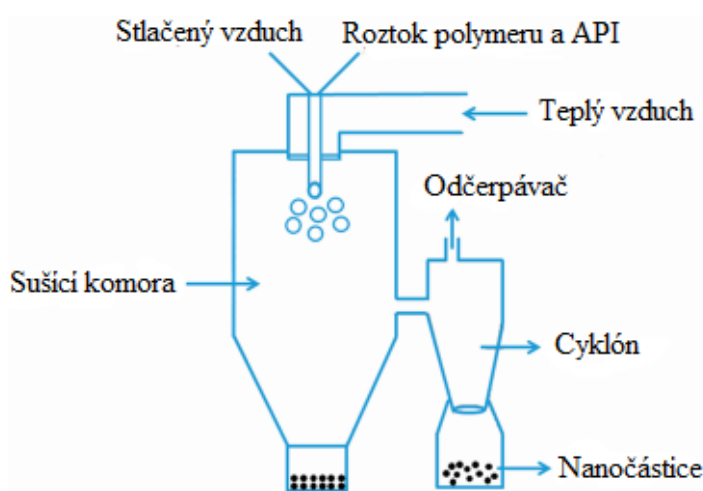
Metoda *emulgace s reverzním vysolováním* je metoda podobná emulgaci s difuzí rozpouštědla. Hlavním rozdílem je použití vodou mísitelného rozpouštědla pro polymer.

Obr 7: Schéma přípravy nanočástic pomocí emulgace s reverzním vysolováním.³⁹



Sprejové sušení je proces, kdy se kontinuálně z kapaliny (roztok, emulze, disperze) odpařuje vodná fáze za vzniku tuhých částic – v tomto případě nanočástice s nastavitelnými parametry (velikost, porozita, tvar, hustota, chemické složení, distribuce). Tento proces probíhá celkem ve čtyřech krocích: 1. ohřev vzduchu 2. tvorba mikrokapek 3. sušení částic 4. sbírání vzniklých nanočástic.⁴⁰ Chladicí efekt evaporace rozpouštědla udržuje teplotu částic relativně nízkou, proto lze také tuto metodu používat u termolabilních látek.⁴¹ Polymer PLGA má relativně nízké teploty skelného přechodu, proto je zapotřebí zvolit nižší vstupní teploty, aby se předešlo pozdějšímu slepování částic.⁴²

Obr 8: Schéma přípravy nanočástic metodou sprejového sušení.³⁹



Koacervace (fázová separace) je metoda, kdy se po změně podmínek (pH, teplota) vytvoří koacervát (systém s vysokou koncentrací makromolekul) a rovnovážná fáze (systém s nízkou koncentrací makromolekul). Jsou dva typy koacervace: jednoduchá a komplexní. Během jednoduché koacervace se použije pouze jeden polymer, kdy po přidání soli (síran sodný) nebo desolubilitačního roztoku (ethanol) se médium dehydratuje a dochází ke koacervaci. Komplexní koacervace je metoda, při které se používá dva i více polymerů s opačným nábojem. Následně dochází k iontové interakci a vytvoření koacervátu. Tato metoda se často používá při enkapsulaci makromolekulárních látek (peptidy, proteiny, genová informace). Enkapsulační účinnosti je vysoká, dosahuje až 99,0 %.⁴³

6.4.2 *Typy enkapsulovaných molekul*

Polyester PLGA je často používaným polymerem pro enkapsulaci širokého spektra molekul. Níže jsou popsány, které malé hydrofilní, amfifilní a hydrofóbní molekuly, makromolekuly byly v četných vědeckých pracích enkapsulovány do polyesteru PLGA.

Malé molekuly BCS třídy I a III se řadí mezi hydrofilní nebo amfifilní látky. Jsou velmi dobře rozpustné ve vodě. Jejich terapeutické použití je ve značné míře omezené z důvodu nutnosti častého podávání a rychlé eliminace. Pro snížení dávek, četnosti aplikace a snížení výskytu nežádoucích účinků se tato léčiva často formulují do nanonosičových systémů.⁴⁴ Mezi hydrofilní molekuly, které byly enkapsulovány do PLGA nanočástic, lze zařadit 5-fluorouracil, antimetabolit kyseliny listové, který se používá k léčbě kolorektálního karcinomu. Nanočástice s tímto cytostatikem byly připraveny sprejovým sušením, enkapsulační účinnost byla 20 %.⁴⁵ Dalším léčivem je antimetabolit a cytostatikum cytarabin, který se používá v léčbě akutní myeloidní leukémie a non-Hodgkinova lymfomu. Nanočástice s cytarabinem byly připraveny odpařením rozpouštědla z emulze v/o. Enkapsulační účinnost byla 42 %.⁴⁶ Vinkristin je antimitotikum a cytostatikum, který se používá k léčbě nádorových onemocnění a AIDS. Nanočástice s vinkristinem byly připraveny odpařením rozpouštědla z emulze v/o a enkapsulační účinnost byla 68 %.⁴⁷

Hydrofóbní molekuly jsou sloučeniny špatně rozpustné ve vodě a obecně dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Většina těchto malých hydrofóbních molekul se řadí do BCS třídy IV, kdy se jedná o látky špatně rozpustné ve vodném prostředí a špatnou permeabilitou. Do této skupiny látek se řadí mezi jinými široce používané steroidy. Většina enkapsulačních metod hydrofóbních metod využívá těkavá organická rozpouštědla pro rozpuštění polymeru a případně i účinné látky. Při tvorbě nanočástic s hydrofóbními látkami může docházet k interakcím polymer-léčivo, a to v podobě adsorpce. Léčiva, které jsou používány pro tvorbu nanočástic by měly být termodynamicky stabilní, jelikož během enkapsulace nebo uchovávání nestabilní sloučeniny mohou krystalizovat. Další komplikací při tvorbě nanočástic s enkapsulovanou hydrofóbní látkou je nízká enkapsulační účinnost, proto je potřeba vybrat vhodnou metodu přípravy.⁴⁸

Mezi hydrofóbní látky, se kterými byly připraveny nanočástice, lze zařadit také velké množství protinádorových léčiv. Paklitaxel je cytostatikum používané k léčbě karcinomu prsu nebo ovárií. Nanočástice s paklitaxelem se produkuje nanoprecipitační metodou

s enkapsulační účinností 84%.⁴⁹ Dalším cytostatikem enkapsulovaným do PLGA nanočástic byla cis-platina, tyto nanočástice byly připraveny nanoprecipitační metodou s enkapsulační účinností 63 %.⁵⁰ Další enkapsulovanou látkou bylo imunosupresivum cyklosporin A používané v prevenci rejekce transplantovaného orgánu. Nanočástice s cyklosporinem byly připraveny emulgací s difuzí rozpouštědla s enkapsulační účinností 20 %.⁵¹ Z látek steroidní povahy byl enkapsulován estradiol pomocí emulgace s difuzí rozpouštědla s enkapsulační účinností 48-75 %.⁵²

Mezi biomakromolekuly řadíme: peptidy, proteiny, nukleové kyseliny. Jedná se o látky které jsou velmi náchylné na vlivy okolního prostředí: pH, teplota, enzymy. Tyto molekuly se používají ve farmacii jako vakcíny, nosiče genové informace, protilátky, biologika. Aplikace samotných biomakromolekul jako léčiv má omezené využití. Bylo enkapsulováno široké spektrum makromolekul do nanočástic PLGA: insulin, růstové faktory, protilátky, vakcíny (antigeny), oligonukleotidy, siRNA, plasmidová DNA, DNA a RNA.⁵³

Insulin je peptidový hormon, jehož jedním z hlavních účinků je regulace hladiny glukózy v krvi. Tento hormon byl enkapsulován pomocí odpaření rozpouštědla z emulze v/o/v. Enkapsulační účinnost byla 57-74 %.⁵⁴ Další makromolekulou je vaskulární endoteliální růstový faktor, který byl enkapsulován pomocí odpaření rozpouštědla z emulze v/o/v s enkapsulační účinností v rozmezí 75,8-80,5 %. Tento růstový faktor pomáhá hojit rány.⁵⁵ Z protilátek byl enkapsulován např. bevacizumab, jež je rekombinantní monoklonální humanizovanou protilátkou inhibující vaskulární endoteliální růstový faktor. Nanočástice s bevacizumabem byly vytvořeny metodou odpaření rozpouštědla z emulze v/o/v s enkapsulační účinností 80,0 %.⁵⁶ Vakcína proti *Pseudomonas aeruginosa* obsahovala antigen PopB a chaperonový protein PcrH. Tato vakcína byla enkapsulována metodou odpaření rozpouštědla z emulze v/o/v s enkapsulační účinností 2,1-2,3 %.⁵⁷

6.5 Liberace léčiva z PLGA nosičových systémů

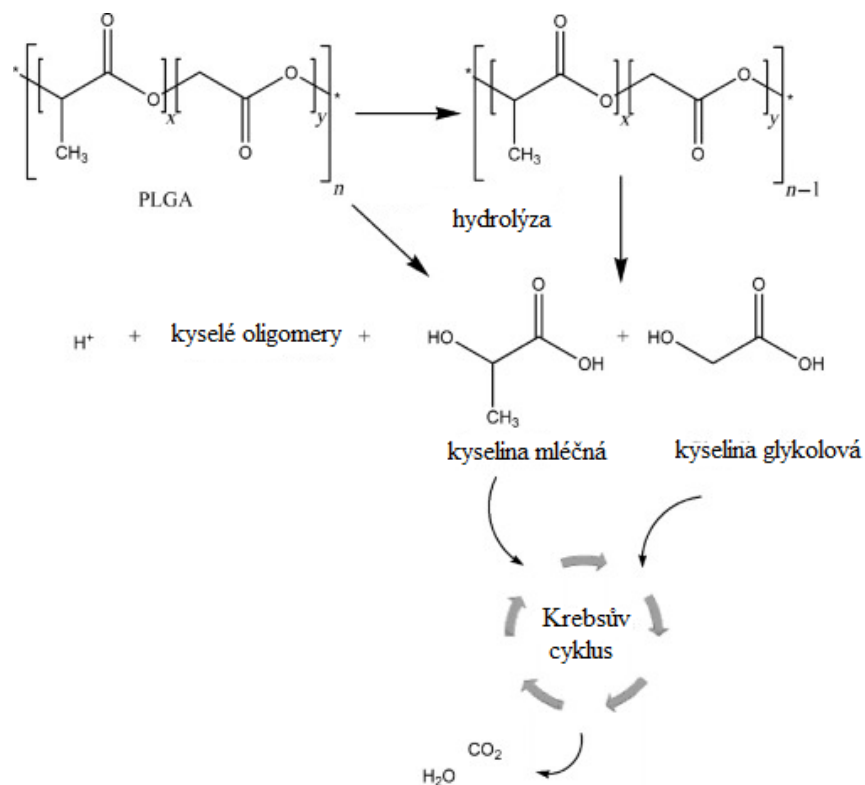
Liberace léčiva z nanočástic je popisována jako proces, kdy dochází k uvolnění enkapsulovaného léčiva z nanočástice do média. Proces liberace léčiva z polymeru ovlivňuje řada faktorů.⁵⁸

6.5.1 Faktory ovlivňující liberaci léčiva

Mezi faktory ovlivňující liberaci léčiva se řadí: poměr kyseliny mléčné a glykolové má vliv na rychlost liberace. Studie ukázaly, že polymery PLGA s vyšším poměrem kyseliny glykolové, rychleji snižují svou molekulární hmotnost. Důvodem je zvýšená hydrofilita polymeru díky zvýšenému obsahu kyseliny glykolové. U polymerů PLGA s rostoucí molekulární hmotností roste délka řetězců. Čím jsou řetězce delší, tím pomaleji degradují.⁵⁹ Poměr povrchu a objemu hraje v liberaci také důležitou roli. S rostoucí plochou povrchu nanočástice se degradace zvyšuje.⁶⁰ Také pH prostředí má vliv na rychlost degradace. *In vitro* testy prokázaly, že polymer PLGA degraduje rychleji v silně kyselém nebo naopak silně alkalickém prostředí.⁶¹ Další vliv má také enkapsulační účinnost. Čím více léčiva je enkapsulováno, tím rychleji polymer degraduje v průběhu iniciální fáze liberace léčiva v důsledku prasknutí (burst) nanočástice.⁶² Vliv na teplota rychlost degradace má i teplota. Se zvyšující se teplotou dochází k rychlejší degradaci.⁶³

Samotný polyester PLGA podléhá hydrolyze ve vodném prostředí. Polymerní základní řetězec, který obsahuje esterové vazby je hydrolyzován náhodně. Hydrolyzou každé esterové vazby vzniká jedna skupina hydroxylová a jedna skupina karboxylová. V důsledku štěpení dlouhých polymerních řetězců dochází ke snižování molekulové hmotnosti a zvyšování hydrofility polymeru. Výsledné odštěpené fragmenty jsou dále degradovány za vzniku kyseliny glykolové a mléčné, které jsou biologicky inertní vůči buňkám a jsou z těla vylučovány běžnými metabolickými cestami.⁶⁴

Obr 9: Biodegradace polyesteru kyseliny mléčné a glykolové.⁶⁵

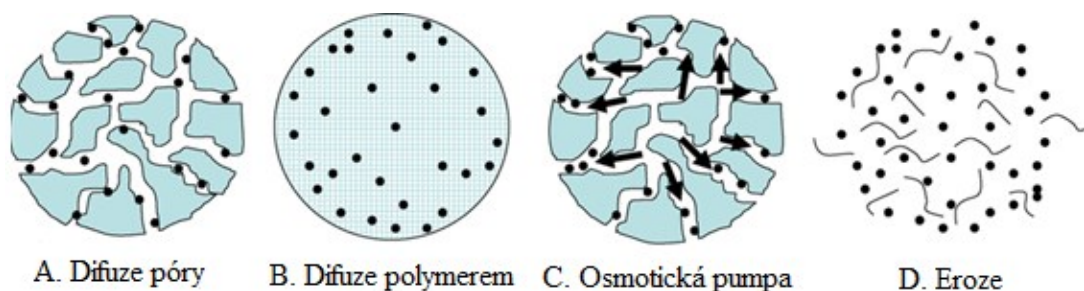


6.5.2 Mechanismy liberace léčiva

Léčiva se uvolňují z nanočástic několika mechanismy. V této podkapitole budou popsány mechanismy, které přímo ovlivňují uvolnění léčiva s polymerních systémů. Léčiva se uvolňují z nanočástic tvořených polyesterem PLGA několika mechanismy:

- difuzí přes vodou naplněné póry
- difuzí léčiva přes polymer
- osmotickou pumpou
- erozí⁶⁶

Obr 10: Mechanizmy uvolňování léčiva z polymerních systémů.⁶⁶



Mechanismus liberace *difúzí přes vodou naplněné póry* byl v mnoha studiích popisován jako první fáze liberace léčiva erozí polymeru. Lze najít ale také studie, kdy proběhla kompletní liberace léčiva ještě před erozí polymeru. Tento mechanismus liberace je závislý na porositě polymeru a velikosti pórů. Jsou-li dostatečně velké, léčivo uvolněné do vody může těmito póry projít. Tento mechanismus se často vyskytuje u nanočástic s enkapsulovaným hydrofilním léčivem. Je zapotřebí, aby póry kontinuálně vedly až k povrchu nanočástice. Uzavřené póry a případně malé póry a jejich propojení má vliv na pórovitost a turtuozitost polymeru. Konstantní difúzní koeficient se často vyskytuje v malých pórech, ve velkých nanočásticích s hladkým povrchem, také v nanočásticích s porózním povrchem tvořených polyesterem PLGA, který je hydrofóbní, má vysokou molekulovou hmotnost, bobtná a podléhá degradaci velmi pomalu.⁶⁶

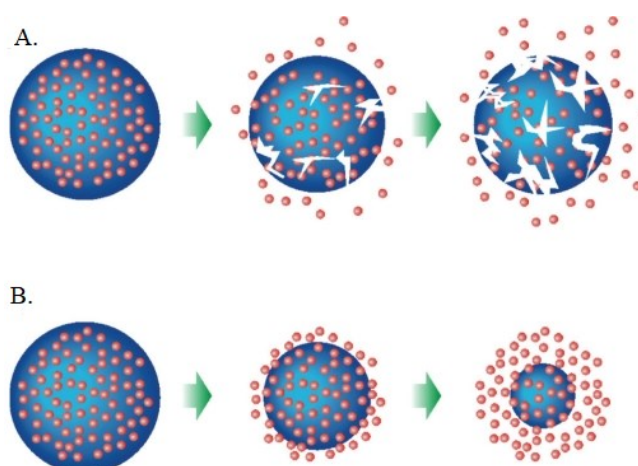
Difuze polymerem je mechanismus liberace, kdy léčivo difunduje do média napříč polymerem. Tento způsob liberace je častý u malých hydrofobních molekul jako je např. ropivakain. PLGA i ropivakain jsou hydrofobní látky. Methylové skupiny PLGA a ropivakainu se vzájemně přitahují a vytvářejí mezi sebou hydrofobní interakci. PLGA zakončená karboxylovou skupinou interaguje s aminovou skupinou ropivakainu a vznikají tak elektrostatické interakce. Tyto vzájemné interakce léčiva a polymeru zabraňují léčivu v liberaci a zpomalují uvolňování léčiva z nanočástic.⁶⁷

Osmotická pumpa je dalším mechanismem liberace léčiva z nanočástic. Osmóza je definována jako soubor pohybů vody napříč permeabilní membránou mezi dvěma kompartmenty v závislosti na rozdílném osmotickém tlaku v kompartmentech. Například lékové formy pro perorální podání fungující na principu osmotické pumpy obsahují polymer, který má schopnost bobtnat. Tento polymer tvoří jádro, které je obaleno membránou obsahující jeden nebo několik pórů určených pro průchod léčiva. Po absorpci vody polymer začíná bobtnat a léčivo ve formě roztoku nebo suspenze se začíná

uvolňovat a prostupovat do média přes póry. Důležitou roli v tomto systému hrají osmogeny, které se rozpouštějí v absorbované vodě a vytvářejí tak osmotický tlak, jež vytlačuje léčivo ven. Jako osmogeny se používají často chlorid draselný, chlorid sodný a mannitol.⁶⁸

Eroze je dalším možným mechanismem liberace s tím rozdílem, že v tomto případě nedochází k transportu léčiva, ale k „poškození“ nanočástice a uvolnění léčiva. Existují dva typy eroze. První je eroze povrchová, kdy při kontaktu s vodou dochází k degradaci nanočástic na povrchu a po stupně proniká do dalších vrstev. Povrchová eroze probíhá tehdy, kdy míra eroze na povrchu je větší než penetrace vody do nanočástic. Dalším typem je eroze objemová (bulk erosion), kdy dochází k penetraci vody a k homogenní degradaci celé matrice nanočástice. Velké části polymeru jsou postupně hydrolyticky degradovány. Tento jev nastává, když míra povrchové eroze je menší než průnik vody do nanočástice.⁶⁹

Obr 11: Typy eroze nanočástic: A. eroze masivní (bulk), B. eroze povrchová.⁷⁰



Mezi další mechanismy uvolňování léčiva z nanočástic lze zařadit *bobtnání*. Tento jev se projeví ihned po kontaktu s vodním prostředím. Absorpce vody způsobuje hydrolyzu řetězců PLGA. Tento jev zvyšuje rychlost liberace léčiva.⁷¹

Rozpouštění léčiva udává míru liberace, jestliže je pomalejší než míra transportu léčiva.⁷²

Heterogenní degradace je autokatalytický jev charakterizovaný dvěma teplotami skelného přechodu. Jedna hodnota skelného přechodu polymeru je uvnitř nanočástice, kdy dochází k rychlé degradaci. Druhá teplota skelného přechodu polymeru je na povrchu nanočástice, kde dochází k pomalejší degradaci vůči jádru nanočástice.⁷³

Změna mobility a density řetězců polymeru má vliv na hydrolyzu polymeru, jeho plastifikaci a krystalizaci oligomerů zachycených do matrice.

Tvorba pórů je proces, který je řízený absorpcí vody a erozí nanočástic. Tento proces je důležitý během liberace velkých hydrofilních molekul, které jsou uvolňovány pomocí difuze přes vodou naplněné póry.⁶⁶

Uzavření pórů je spojeno se změnou polohy řetězců polymeru způsobenou např. zvýšením teploty, degradací mobilitou řetězců. Tento jev zpomaluje liberaci léčiva. Interakce léčiva s léčivem, případně interakce léčiva s polymerem zpomalují uvolňování léčiva z nanočástic.⁷⁴

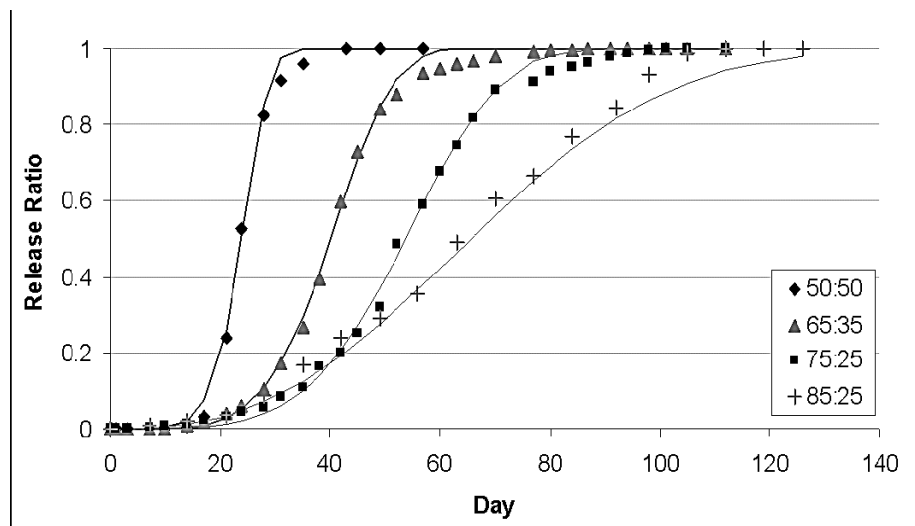
Kolaps nanočástic je často spojen s degradací a snížením teploty skelného přechodu. Jestliže se tímto sníží porosita nanočástice, zpomalí se tím i liberace léčiva. Jestliže se tímto zvýší povrch nanočástice, dochází ke zrychlení liberace léčiva.^{75, 76, 77}

6.5.3 Fáze liberace léčiva

Nanočástice tvořené kyselinou mléčnou a glykolovou mohou mít jednofázový, dvojfázový, třífázový profil liberace léčiva a také liberace 0. řádu.⁶⁶

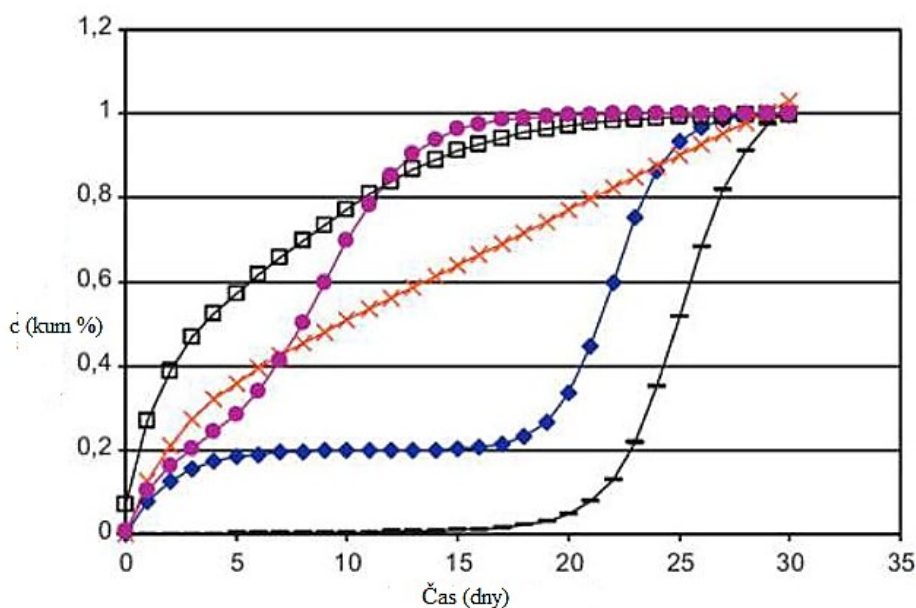
U dvojfázového profilu liberace dochází nejprve v iniciální fázi k prasknutí (burst) nanočástice a léčivo je uvolňováno v závislosti na typu molekuly, jeho koncentraci a hydrofobicitě polymeru. Léčivo na povrchu v kontaktu s vodou se uvolní v závislosti na jeho rozpustnosti a průniku vody do polymeru. V průběhu této fáze dochází také ke štěpení PLGA, ale netvoří se solubilní produkty. Ve druhé fázi liberace dochází k hydrolyze PLGA uvnitř matrice a tvorbě solubilních oligomerů a monomerů. Léčivo je uvolňováno pomocí difuze a eroze nanočástice.⁷⁸ Na obr. 12 jsou modelové *in vitro* profily liberace polyesteru kyseliny mléčné a glykolové v poměru 50:50, 65:35, 75:25, 85:15. Je patrný dvojfázový profil liberace s počátečním nulovým uvolňováním (lag-time) následovaným rapidním uvolněním. Profily zobrazují zvýšenou rychlost uvolňování ve formulacích obsahujících snížené množství kyseliny mléčné vůči kyselině glykolové.

Obr 12: Liberační profily PLGA s různým poměrem kyseliny mléčné a glykolové.⁷⁸



Nejčastější je trojfázový profil liberace léčiva z polymeru PLGA. Během iniciální fáze dochází k rychlé liberaci léčiva (burst efekt), které je adsorbováno nebo enkapsulováno u povrchu nanočástice. V další fázi probíhá liberace léčiva difuzí přes polymer nebo vodou naplněné póry v závislosti na vlastnostech léčiva. Ve finální fázi dochází k významné degradaci polymeru PLGA díky tvorbě velkých pórů, kterými proniká voda a také možným bobtnáním nanočástice. Ve finální fázi dochází tedy k erozi nanočástice.⁷⁹ Možné průběhy liberace jsou znázorněny na obr. 13. Prázdné čtverce znázorňují burst následovaný rychlou liberací ve druhé fázi. Plné kruhy trojfázovou liberace s krátkou druhou fází. Kříže burst následovaný liberací 0. řádu. Plné čtverce: trojfázovou liberace. Čárky dvojfázovou liberaci podobná trojfázové, ale bez počátečního burstu.⁶⁶

Obr 13: Fáze liberace léčiv z PLGA.⁶⁶



7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použité přístroje

Analytická kolona KinetexTM 1,7 μ m-Bifenyl 100 A (50 x 2,1 mm)

Analytická váha, Discovery OHAUS

Analytická váha, Kern 572

Analytická váha, Kern FKB

Centrifuga Micro 7, Fisher Scientific

Dialyzační membrána 10 mm, 14 000 M_w, Sigma-Aldrich

Disoluční přístroj Julabo SW, Julabo

HPLC systém Liquid Chromatograph-Nexera X2-Shimadzu, Japonsko

Magnetická deska Variomag, Telenyon

Pipety s nastavitelným objemem Research, Eppendorf

Skleněná kyveta, Hellma Analytics

Složená kapilární kyveta DTS 1060, Malvern

Spektrofotometr Specord 205, Analytic Jena

Spektroskopická kyveta PS, Brand

Ultrazvuk Sonorex super 10 P, Bandelin

Zetasizer Nano ZS, Malvern

7.2 Použité materiály

Acetonitril, Sigma-Aldrich

Čištěná voda, FaF UK

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Dr. Kulich Pharma s.r.o.

Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich

Hydroxid sodný, Dr. Kulich Pharma s.r.o.

Klotrimazol, Zentiva a.s.

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové 50:50, Faf UK

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové větvený na dipentaerythritolu, Faf UK

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové větvený na kyselině polyakrylové, Faf UK

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové větvený na tripentaerythritolu, Faf UK

Kyselina citronová monohdrát, Dr. Kulich Pharma s.r.o.

Kyselina chlorovodíková 35 %, Lachema, a.s.

Terbinafin-hydrochlorid, Zentiva a.s.

7.3 Příprava nanočástic

Nanočástice tvořené PLGA lineární a větvené struktury s enkapsulovaným terbinafinem nebo klotrimazolem byly připraveny nanoprecipitační metodou. Vnitřní fáze tvořená roztokem polymeru a léčiva (bylo vždy použito 25,0 mg léčivé látky) v DMSO byla kapkovou metodou přidána do vnější fáze tvořené roztokem tenzidu, čímž došlo k tvorbě nanočástic. Pro nanočástice s klotrimazolem byly použity: kopolymer kyseliny glykolové a mléčné větvený na kyselině polyakrylové (A2), kopolymer kyseliny glykolové a mléčné větvený na dipentaerythritolu (D8), kopolymer kyseliny glykolové a mléčné větvený na tripentaerythritolu (3T), kopolymer kyseliny glykolové a mléčné 50:50 (PLGA) v koncentraci 5 % a 7 %. Koncentrace cetrimidu ve vodě byla 0,05 %; 0,01 %; 0,005 %; 0,001 %. Pro přípravu nanočástic s terbinafinem byly použity polyestery A2, D8 v koncentraci 7 % a 0,05 % roztok cetrimidu ve vodě.

Tab 3: Základní charakteristika použitých polymerů pro přípravu nanočástic.

Typ polymeru	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	$[\eta]_w$ (mL/g)	$g'(M_w)$	T_g (°C)
A2	8 600	14 400	8,9	0,54	32,8
D8	1 600	2 500	2,9	0,45	12,4
T3	5 300	17 400	7,7	0,43	27,6
PLGA 50:50	1 700	2 400	5,9	1,00	29,8

M_n (g/mol) číselně střední molární hmotnost

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

$[\eta]_w$ (mL/g) vnitřní viskozita

$g'(M_w)$ poměr vnitřních viskozit větveného a lineárního polymeru při shodné molární hmotnosti

T_g (°C) teplota skelného přechodu

Tab. 4: Charakteristika použitých léčivých látek a tenzid pro přípravu nanočástic^{80, 81}

Typ látky	M _n (g/mol)	Log P	pKa	T _t (°C)
Terbinafin	327,89	5,9	8,86	195-198
Klotrimazol	344,84	6,1	4,10	148
Cetrimid	284,55	2,5	-	240

M_n (g/mol) molární hmotnost

Log P rozdělovací koeficient n-oktanol / voda

pKa záporný dekadický logaritmus disociační konstanty

T_t (°C) teplota tání

Byla připravena vnitřní fáze pro tvorbu nanočástic. Byly připraveny zásobní roztoky polymerů v DMSO o koncentraci 5 % a 7 %. Pro urychlení rozpouštění polymeru se tato směs nechala na elektromagnetické míchačce intenzivně míchat. Následně se na analytických váhách navážilo do pěti malých kádinek 25,0 mg terbinafinu nebo klotrimazolu. Do těchto kádinek s léčivem se poté napipetovalo 1,0 ml předem připraveného zásobního roztoku polymeru v DMSO a pomocí ultrazvuku se léčivo rozpustilo. Dalším krokem byla příprava vnější fáze. Na analytických váhách byl navážen cetrimid, který byl poté rozpuštěn v čištěné vodě na požadovanou koncentraci cetrimidu 0,05 %; 0,005 %; 0,01 % nebo 0,001 %. Do pěti 25 ml kádinek s vloženým křížovým míchadlem bylo odměřeno 10,0 ml vnější fáze a kádinky byly vloženy na magnetickou míchačku. Za stálého míchání vnější fáze byl pipetou po kapkách přidáván 1 ml vnitřní fáze. Vzniklá nanosuspenze byla míchána ještě 20 minut.

Nanosuspenze v uzavíratelných zkumavkách byly 20 minut centrifugovány při 4 000 G. Byl odstraněn čirý supernatant a sediment byl resuspendován 2,5 ml 0,05 % roztoku CET ve vodě pomocí ultrazvuku. Pro disoluční testy byly resuspendované nanočástice adjustovány pipetou do dialyzačních membrán a dobře uzavřeny.

7.4 Měření velikosti, polydisperzity a ζ -potenciálu nanočástic

Parametry nanočástic s klotrimazolem a terbinafinem, velikost částic, polydisperzita, ζ -potenciál, byly měřeny na přístroji Zetasizer ihned po jejich přípravě. Pro měření ζ -potenciálu se do složených kapilárních kyvet napipetoval 1,0 ml nanosuspenze, kyvety se vložily do Zetasizeru a spustilo se měření. V softwaru přístroje Zetasizer byly navoleny tyto parametry:

- disperzní prostředí: voda
- RI disperzního prostředí: 1,330
- dynamická viskozita: 0,8872 mP·s
- dielektrická konstanta disperzního prostředí: 78,5
- teplota: 25,0 °C
- pozice při měření: 2,0 mm

Pro měření velikosti nanočástic a polydisperzity bylo do kyvety napipetováno 0,5 ml nanosuspenze. Jestliže vzorek byl zcela neprůhledný, byl naředěn čistou vodou. Takto připravený vzorek byl vložen do přístroje a spuštěno měření. Před samotným měřením byly navoleny tyto parametry:

- název disperzního prostředí: voda
- RI materiálu: 1,50
- absorpce materiálu: 0,010
- RI disperzního prostředí: 1,330
- dynamická viskozita: 0,8872 mP·s
- dielektrická konstanta disperzního prostředí: 78,5
- teplota: 25,0 °C
- pozice při měření: 0,85 mm
- počet měření vzorku v jednom cyklu: 3krát

7.5 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena bezprostředně po přípravě nanočástic. 2,0 ml nanosuspenze bylo napipetováno do uzavíratelných vialek a centrifugováno 20 minut při 8 000 G. Po centrifugaci byl oddělen supernatant od sedimentu. Sediment byl rozpuštěn ve 2,0 ml acetonitrilu a poté ještě desetkrát zředěný tímto organickým rozpouštědlem. Supernatant byl zředěn padesátkrát acetonitrem. Takto naředěné vzorky se přefiltrovaly přes filtr 0,22 μm . Terbinafin byl analyzován pomocí HPLC. Pro výpočet enkapsulační účinnosti byl použit vzorec:

$$EE = \frac{(1-m_o)}{m} \times 100 \quad (1)$$

EE – enkapsulační účinnost [%]

m_o – množství terbinafinu v supernatantu [mg]

m – celkové množství terbinafinu použitého při přípravě [mg]

7.6 Příprava pufrů

Byly připraveny tyto pufrы:

- citrátový pH 3,0
- citrát-fosfátový pH 5,0

Pufrы byly použity jako disoluční médium při disolucích nanočástic s terbinafinem a také jako slepé vzorky při spektrofotometrickém stanovení množství uvolněného léčiva. Byly připraveny dle chemických tabulek společnosti Merck⁸² a vycházelo se z obecného vzorce: x dílů A + $(100 - x)$ dílů B (2)

Citrátový pufr pH 3,0: 21,6 dílů A + $(100 - 21,6)$ dílů B. Roztok A byl připraven tak, že se ve 200,0 ml vody rozpustilo 8,0 g hydroxidu sodného a v další kádince bylo rozpuštěno 21,0 g kyseliny citrónové monohydrátu v 1 000,0 ml vody. Tyto roztoky se poté smísily dohromady. Roztok B byl připraven z 3,65 g 35 % kyseliny chlorovodíkové, která byla nalita do 1 000,0 ml vody. Poté byly roztoky A a B smíseny v poměru 21,6 dílů roztoku A a 79,4 dílů roztoku B za vzniku pufru o pH 3,0. Byla provedena kontrola hodnoty pH pomocí pH metru.

Citrát-fosfátový pufr pH 5,0: 49 dílů A + (100 – 49) dílů B

Roztok A vznikl rozpuštěním 21,0 g kyseliny citrónové monohydrátu v 1 000,0 ml vody. Roztok B vznikl rozpuštěním 35,6 g hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu v 1 000,0 ml vody. Poté byly roztoky A a B smíseny v poměru 49 dílů roztoku A a 51 dílů roztoku B za vzniku pufru o pH 5,0. Byla provedena kontrola hodnoty pH pomocí pH metru.

7.7 Sestrojení kalibračních přímk

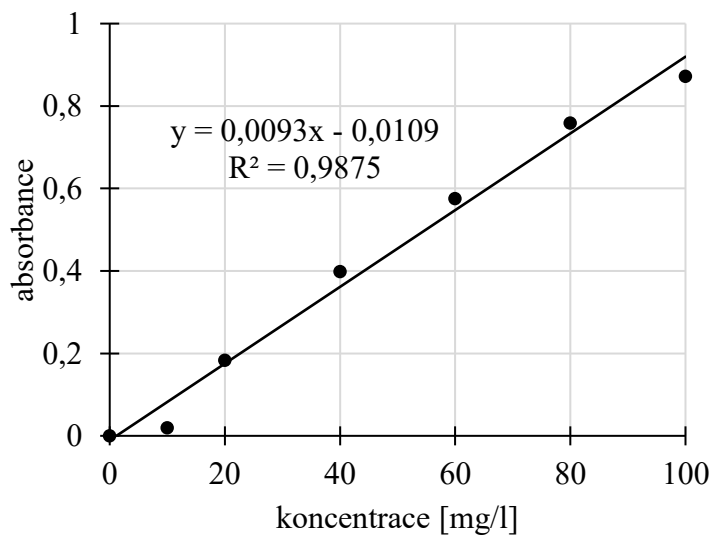
Pro stanovení množství terbinafinu uvolněného do disolučního média byla zjištěna rovnice kalibrační přímk. Byly připraveny roztoky terbinafinu v koncentracích: 100,0 mg/l, 80,0 mg/l, 60,0 mg/l, 40,0 mg/l, 20,0 mg/l, 10,0 mg/l. Jako rozpouštědla pro terbinafinu byla použita tato média: acetonitril, citrátový pufr pH 3,0; citrát-fosfátový pufr pH 5,0 a citrát-fosfátový pufr pH 5,0 s přidavkem 0,05 % CET.

Na analytických váhách bylo naváženo 10,0 mg terbinafinu a přeneseno do odměrné baňky na 100,0 ml. Bylo přidáno asi poloviční množství rozpouštědla a pomocí ultrazvuku se nechal terbinafin rozpustit. Bylo doplněno rozpouštědlo po rysku odměrné baňky. Tento roztok terbinafinu byl použit pro přípravu roztoků terbinafinu o nižších koncentracích. Spektrofotometricky při vlnové délce 283 nm byla měřena absorbance. Každý vzorek byl proměřen třikrát.

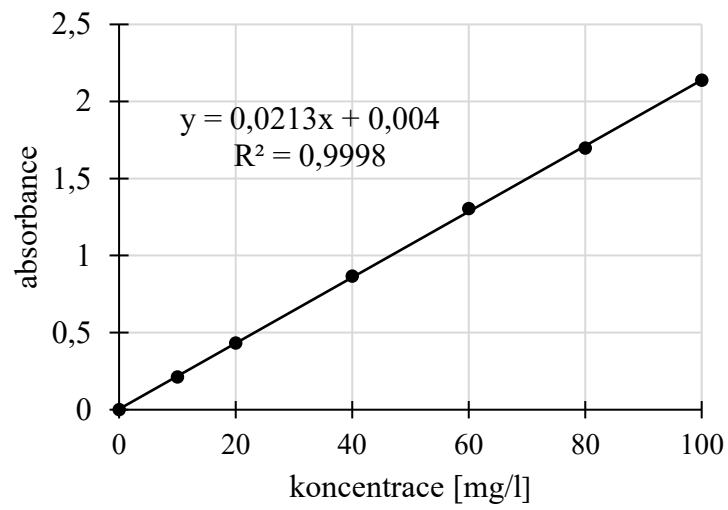
Tab 5: Absorbance zásobních roztoků terbinafinu při vlnové délce 283 nm.

koncentrace [mg/l]		100	80	60	40	20	10
A	c-f pH 5,0	0,8723	0,7590	0,5753	0,3987	0,1837	0,0197
	rovnice grafu	$y = 0,0093x - 0,0109$					
	c-f pH 5,0 + 0,05 % CET	2,1370	1,6967	1,3035	0,8654	0,4313	0,2115
	rovnice grafu	$y = 0,0213x + 0,004$					
	cit. pH 3,0	2,2403	1,7685	1,3517	0,9106	0,4524	0,2317
	rovnice grafu	$y = 0,0223x + 0,0076$					
	ACN	2,2730	1,8584	1,3935	0,9243	0,4554	0,2337
	rovnice grafu	$y = 0,0229x + 0,0047$					

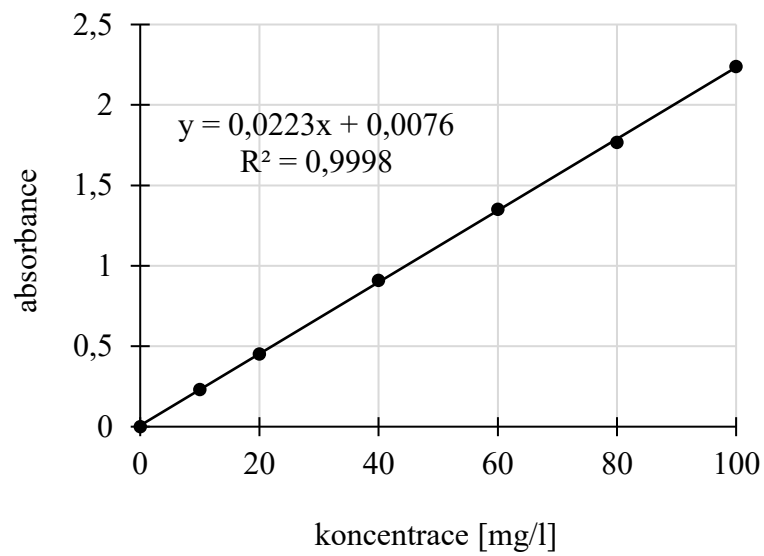
Obr 14: Kalibrační přímka terbinafinu ve citrát-fosfátovém pufru pH 5,0.



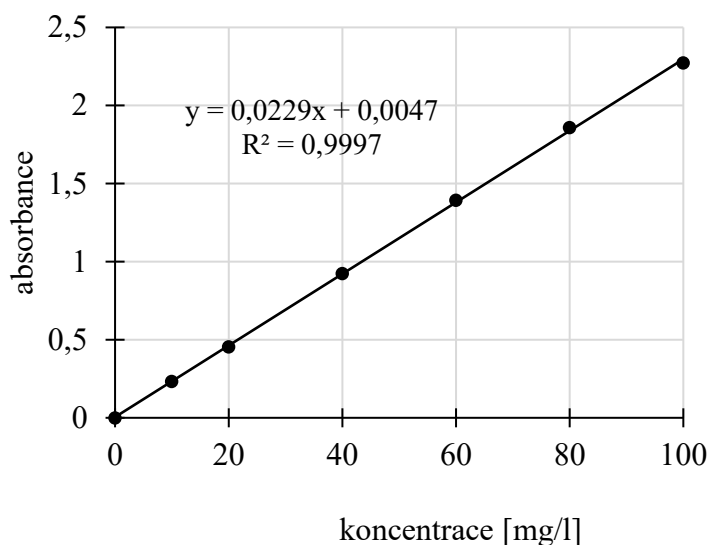
Obr 15: Kalibrační přímka terbinafinu v citrát-fosfátovém pufru pH 5,0 s 0,05 % cetrimidu.



Obr 16: Kalibrační přímka terbinafinu v citrátovém pufru pH 3,0.



Obr 17: Kalibrační přímka terbinafinu v acetonitrilu.



7.8 Disoluční testy

Do širokohrdých lékovek bylo odměřeno 50,0 ml disolučního média předem zahřátého na 37,0 °C. Byly vloženy dialyzační membrány se suspenzí nanočástic tak, aby byly celé ponořeny (Obr. 18). Lékovky byly dobře uzavřeny a vloženy do třepací vodní lázně o teplotě 37,0 °C.



Obr 18: Lékovka se vzorkem pro test disoluce.

V daných časových intervalech byly vyjmuty dialyzační membrány s nanosuspenzí z disoluční nádoby, přenesly do nové nádoby s 50,0 ml disolučního média předehřátého na 37,0 °C, umístily se zpět do třepací vodní lázně a pokračovalo se v disolučním testu. Bylo stanoveno množství terbinafinu uvolněné v daném časovém intervalu do disolučního média. Z důvodu možné adsorpce terbinafinu na stěny disoluční nádoby byly nádoby vymyty 25,0 ml ACN a spektrofotometricky stanovena koncentrace terbinafinu v ACN.

7.9 Stanovení terbinafinu spektrofotometricky

Pro stanovení vzorku spektrofotometricky se pracovalo v programu WinAspect. Každý vzorek se proměřil v jednom cyklu celkem třikrát při vlnové délce 283 nm. Jako slepý vzorek se vždy použilo médium, ve kterém byl terbinafin rozpuštěn, tedy citrátový pufr pH 3,0; citrát-fosfátový pufr pH 5,0 a citrát-fosfátový pufr pH 5,0 s 0,05 % CET.

Výpočet množství uvolněného terbinafinu:

$$m = \frac{[(A-b)/a]}{EE} \quad (2)$$

m – množství terbinafinu [mg/50 ml]

A – absorbance terbinafinu při $\lambda_{\max} = 283$ nm

a, b – reálné číslo z rovnice grafu kalibrační přímky $y = a x + b$

EE – enkapsulační účinnost [%]

Výpočet množství terbinafinu uvolněného v procentech:

$$c_{\%} = \frac{(c \times 100)}{m_0} \quad (3)$$

$c_{\%}$ – koncentrace uvolněného terbinafinu [%]

c – koncentrace terbinafinu [mg/50 ml]

m_0 – množství enkapsulovaného terbinafinu [mg]; polymer A2 $m_0 = 5$ mg; polymer D8 $m_0 = 3,25$ mg

7.10 Stanovení terbinafinu HPLC

Ve spolupráci s Ing. Martinem Drastíkem, Ph.D. z Katedry biofyziky a fyzikální chemie se pomocí separační metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovilo enkapsulační účinnost terbinafinu a množství uvolněného terbinafinu do disolučního média z kopolymerů polyesterů D8, A2. Před samotným měřením množství terbinafinu uvolněného z kopolymerů polyesterů D8, A2 do disolučních médií se odebraly vzorky o objemu 2,0 ml. Tyto vzorky se následně přefiltrovaly přes mikrobiální filtr do vialek. Dále se připravilo mobilní fázi, která obsahovala citrát-fosfátový pufr pH 4,5 a acetonitril v poměru 60:40. Přefiltrované vzorky byly připravené k měření. Nástřik vzorku na kolonu s reverzní fází byl 5,0 μ l. Cela měřila absorbanci terbinafinu při vlnové délce 226 nm, retenční čas terbinafinu byl 4,1 minuty. Celé měření probíhalo při teplotě 25,0 °C.

7.11 Penetrace terbinafinu do kůže

Ve spolupráci s týmem Skin Barrier Research prof. Vávrové byla testována penetrace terbinafinu do kůže z 1 % Terbistad krému a z nanočástic kopolymeru polyesteru D8 s inkorporovaným terbinafinem. Byla provedena celkem dva měření (experiment 1; experiment 2). Pro každé z těchto dvou měření se použilo 12 Franzových cel. Lidskou kůži se nakrájelo na segmenty o velikosti 2×2 cm. Takto připravenou kůži se namontovalo do teflonových držáků (epidermis byla nahoře), které se předem namazaly silikonovým olejem, aby se zajistila dobrá přilnavost kůže. Držáky s kůží se poté vložilo do Franzových cel s míchadlem (horní díl cely-donorová část; spodní část cely-akceptorová část). Pro experiment 1 se použily 3 vzorky: 1 % Terbistad krém; 1 % terbinafin v isopropylu myristátu a ethanolu v poměru 50:50; 1 % terbinafinu v propylenglykolu a vodě v poměru 60:40. Pro experiment 2 se použily 2 vzorky: 1 % Terbistad krém a nanočástice z polyesteru D8 obsahující 1 % terbinafinu. Akceptorovou část Franzovy cely se naplnilo v experimentu 1 směsí fosfátového pufru pH 5,8 a 95 % ethanolu ve vodě v poměru 1:3 nebo pouze fosfátovým pufrem pH 5,8. V experimentu 2 akceptorová část cely byla naplněna fosfátovým pufrem pH 7,0. Takto připravené Franzovy cely se umístilo do lázně pro disoluci, ve které voda měla teplotu 32,0 °C. Po ekvilibrační době, která činila přibližně 1 hodinu, se na kůži aplikovaly testované vzorky obsahující 1,0 mg terbinafinu. Během experimentu 1 se v intervalech po 24, 36 a 48 hodinách se odebíralo 0,7 ml akceptorové fáze. Tento úbytek se nahradil novou akceptorovou fází ve stejném objemu. V experimentu 2 se odebralo vzorek akceptorové fáze po 24 hodinách. Po ukončení penetrace léčiva v experimentu 1 se kůže promyla vodou, zvažila se a extrahovala se v methanolu po dobu 24 hodin. V experimentu 2 se nejprve oddělila epidermis od zbylé části kůže, tyto vzorky byly zvaženy a poté extrahovány v methanolu po dobu 24 hodin. Takto získané extrakty byly přefiltrovány a dále měřeny pomocí metody HPLC. Na reverzní kolonu byly vzorky nastříkovány v objemu 50,0 μ l při teplotě 25,0 °C na kolonu s reverzní fází. Jako mobilní fáze se použil 95 % methanol ve vodě, cela měřila absorbancí při 226 nm, retenční čas terbinafinu byl 4,1 minuty. Experiment 1 sloužil pouze k prokázání účinnosti tohoto měření. Účinnost testu byla prokázána.

7.12 Stanovení antimikrobní aktivity terbinafinu *in vitro*

Ve spolupráci s týmem Design and Development of New Antimicrobial Agents prof. Doležala byla testována antimikrobní aktivita 1 % Terbistad krému a nanočástic kopolymeru polyesteru D8 s inkorporovaným terbinafinem v koncentraci 1 %. Pro hodnocení antimikrobního účinku se použil standardní postup uváděný v literatuře.⁸³ Jako testovací mikroorganismy se použily definované kmeny určené k standardnímu hodnocení antimikrobního účinku. Pro tento experiment byl vybrán kmen kvasinek *Candida albicans*. Testování probíhalo v Petriho miskách, kdy povrch kultivační půdy (Sabouraudův agar) byl inokulován 0,5 ml suspenze testovacího kmene. Poté do kultivační půdy byly vyříznuty 3 otvory se vzdáleností 5,5 cm od sebe. Do těchto otvorů se aplikovaly vzorky – placebo (polyester PLGA/D8), 1 % Terbistad krém, nanočástice kopolymeru polyesteru D8 s inkorporovaným terbinafinem v koncentraci 1 %. Tyto formulace vyplňovaly zcela otvory, aby mohly difundovat do okolí. Samotná kultivace probíhala za aerobních podmínek po dobu 24 hod. při teplotě 37,0 °C. Během kultivace mohly látky difundovat a případně inhibovat růst testovacího mikroba. Odečet výsledků se prováděl pomocí fotografické dokumentace.

8 VÝSLEDKY

8.1 Nanočástice s klotrimazolem

Tab. 6: Charakteristiky T3 nanočástic s klotrimazolem (5 % polyesteru).

CET [%]	Velikost částic [nm]	PDI	ζ-potenciál [mV]
0,050	210,4	0,099	45,7
	210,6	0,086	46,1
	210,7	0,072	46,2
Průměr ± SD	210,6 ± 0,125	0,086 ± 0,011	46,0 ± 0,216
0,010	206,5	0,106	35,4
	210,7	0,072	46,2
	208,9	0,090	40,9
Průměr ± SD	208,7 ± 1,72	0,089 ± 0,014	40,8 ± 4,41
0,005	SRAŽENINA		
0,001	SRAŽENINA		

Tab 7: Charakteristiky T3 nanočástic s klotrimazolem (7 % polyesteru).

Koncentrace CET [%]	Velikost částic [nm]	PDI	ζ-potenciál [mV]
0,050	221,4	0,126	43,2
	224,3	0,135	46,4
	223,1	0,133	44,9
Průměr ± SD	222,9 ± 1,19	0,131 ± 0,004	44,8 ± 1,31
0,010	248,6	0,181	32,5
	246,2	0,128	33,3
	247,5	0,156	33,0
Průměr ± SD	247,4 ± 0,98	0,155 ± 0,022	32,9 ± 0,33
0,005	254,6	0,109	22,7
	247,2	0,183	26,4
	251,1	0,147	24,6
Průměr ± SD	251,0 ± 3,02	0,146 ± 0,03	24,6 ± 1,51
0,001	SRAŽENINA		

Tab 8: Charakteristiky D8 nanočástic s klotrimazolem (5 % polyesteru).

Koncentrace CET [%]	Velikost částic [nm]	PDI	ζ-potenciál [mV]
0,050	589,5	0,186	29,0
	526,7	0,239	32,2
	558,1	0,211	30,7
Průměr ± SD	558,1 ± 25,64	0,212 ± 0,02	30,6 ± 1,31
0,010	603,1	0,25	19,1
	554,4	0,322	24,4
	578,8	0,288	21,6
Průměr ± SD	578,8 ± 19,88	0,287 ± 0,03	21,7 ± 2,16
0,005	441,3	0,174	19,8
	476,6	0,218	18,5
	458,9	0,197	19,0
Průměr ± SD	458,9 ± 14,41	0,196 ± 0,02	19,1 ± 0,54
0,001	454,0	0,157	18,10
	479,4	0,078	20,3
	466,8	0,117	18,9
Průměr ± SD	466,7 ± 10,37	0,117 ± 0,03	19,1 ± 0,91

Tab 9: Charakteristiky D8 nanočástic s klotrimazolem (7 % polyesteru).

Koncentrace CET [%]	Velikost částic [nm]	PDI	ζ-potenciál [mV]
0,050	581,1	0,188	26,3
	564,5	0,169	26,2
	572,9	0,179	26,3
Průměr ± SD	572,8 ± 6,78	0,179 ± 0,01	26,3 ± 0,05
0,010	478,3	0,139	17,2
	495,2	0,162	19
	487,0	0,152	18,2
Průměr ± SD	486,8 ± 6,90	0,151 ± 0,01	18,1 ± 0,24
0,005	476,4	0,157	19,8
	484,7	0,186	20,3
	480,8	0,173	20,3
Průměr ± SD	480,6 ± 3,39	0,172 ± 0,01	20,1 ± 0,24
0,001	SRAŽENINA		

8.2 Nanočástice s terbinafinem

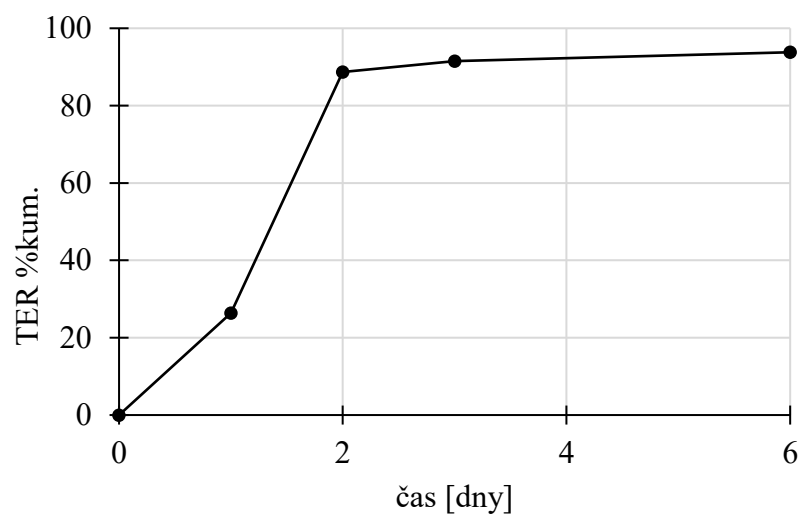
Tab 10: Charakteristiky A2 a D8 nanočástic s terbinafinem (7 % polyesteru).

Typ polymeru	7 % A2	7 % D8
Velikost částic [nm]	205,5	448,8
	207,4	427,1
	212,1	443,5
Průměr ± SD	208,3 ± 2,77	439,8 ± 9,24
PDI	0,108	0,246
	0,104	0,164
	0,170	0,204
ζ- potenciál [mV]	53,7	37,0
	52,8	35,0
	52,6	37,9
Průměr ± SD	53,0 ± 0,48	36,6 ± 1,21
Enkapsulační účinnost [%]	20,0	13,0

Tab 11: Množství terbinafinu uvolněného z A2 při pH 3,0.

Čas [dny]	A	TER [mg/50 ml]	TER [%]	Průměr [%] ± SD	TER [kum. %]
1	0,8790	1,80	36,0	26,4 ± 6,8	26,4
	0,5696	1,11	22,1		
	0,5479	1,06	21,2		
2	1,5564	3,32	66,4	62,2 ± 7,8	88,7
	1,6148	3,45	69,0		
	1,2192	2,56	51,3		
3	0,1307	0,12	2,5	2,8 ± 0,77	91,5
	0,1221	0,10	2,1		
	0,1630	0,20	3,9		
6	0,1232	0,11	2,1	2,3 ± 0,12	93,8
	0,1278	0,12	2,3		
	0,1305	0,12	2,4		

Obr 19: Průběh disoluce terbinafinu z A2 při pH 3,0.



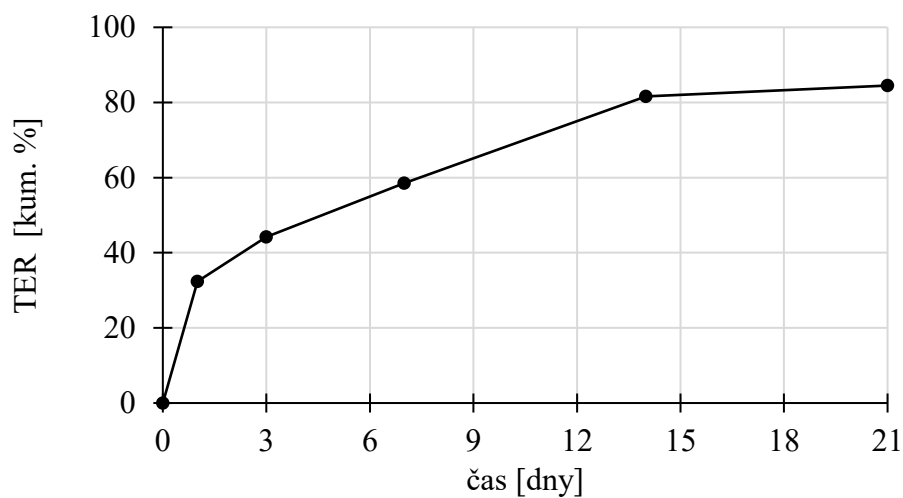
Tab. 12: Množství terbinafinu uvolněného z D8 při pH 3,0.

Čas [dny]	Médium	A	TER [mg/50 ml]	TER [%]	Průměr [%] ± SD	TER [kum. %]
1	pufr	0,3213	0,85	26,0	25,4 ± 2,85	25,4
		0,2793	0,70	21,6		
		0,3445	0,93	28,5		
	ACN	1,4330	4,80	127,9	84,4 ± 48.92	109,8
		1,2230	4,09	109,1		
		0,1833	0,60	16,0		

Tab 13: Množství terbinafinu uvolněného z A2 při pH 5,0.

Čas [dny]	Médium	A	TER [mg/50 ml]	TER [%]	Průměr [%] ± SD	TER [kum. %]
1	pufr	0,2737	1,26	25,2	31,6 ± 4,53	32,4
		0,3597	1,77	35,4		
		0,3487	1,71	34,1		
	ACN	0,0176	0,03	0,6	0,8 ± 0,17	
		0,0266	0,05	1		
		0,0218	0,04	0,7		
3	pufr	0,1566	0,56	11,3	9,8 ± 1,07	42,2
		0,1356	0,44	8,8		
		0,1406	0,47	9,4		
	3	0,0803	0,17	3,3	2,0 ± 1,06	
		0,0516	0,10	2,0		
		0,0213	0,04	0,7		
7	pufr	0,1643	0,61	12,2	8,0 ± 4,20	52,2
		0,1569	0,54	8,0		
		0,094	0,19	3,8		
	ACN	0,1330	0,28	5,6	6,3 ± 1,09	
		0,1293	0,27	5,4		
		0,1836	0,39	7,8		
14	pufr	0,1366	0,44	8,9	15,8 ± 8,90	74,3
		0,1476	0,51	10,2		
		0,3006	1,42	28,4		
	ACN	0,2176	0,46	9,3	7,3 ± 1,63	
		0,1726	0,37	7,3		
		0,1270	0,27	5,3		
21	ACN	0,0943	0,20	3,9	2,9 ± 1,11	84,5
		0,0813	0,17	3,3		
		0,0356	0,07	1,3		

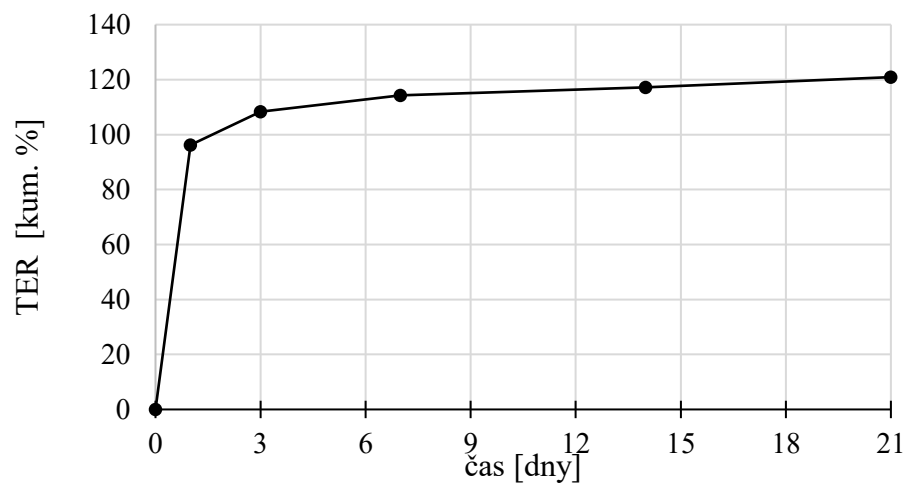
Obr 20: Průběh disoluce terbinafinu z A2 při pH 5,0.



Tab 14: Množství terbinafinu uvolněného z D8 při pH 5,0.

Čas [dny]	Médium	A	TER [mg/50 ml]	TER [%]	Průměr [%] ± SD	TER [kum. %]
1	pufr	0,2270	1,51	46,5	47,8 ± 1,55	47,8
		0,2287	1,53	47,0		
		0,2393	1,62	50,0		
	ACN	0,0276	0,08	2,4	48,4 ± 65,57	
		0,0203	0,05	1,6		
		1,3700	4,59	141,1		
3	ACN	0,1686	0,55	16,9	12,1 ± 4,23	108,3
		0,1276	0,41	12,7		
		0,0686	0,21	6,6		
7	ACN	0,0783	0,25	7,6	6,0 ± 1,60	114,3
		0,0673	0,21	6,5		
		0,0416	0,12	3,8		
18	ACN	0,0293	0,08	2,5	2,9 ± 0,37	117,2
		0,0320	0,09	2,8		
		0,0373	0,11	3,4		
21	ACN	0,0373	0,11	3,4	3,7 ± 0,45	120,9
		0,0473	0,14	4,4		
		0,0383	0,11	3,5		

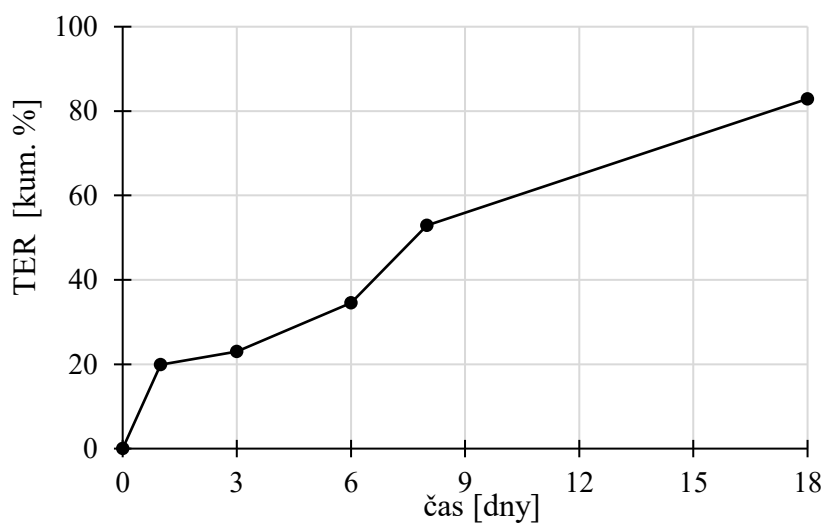
Obr 21: Průběh disoluce terbinafinu z D8 při pH 5,0.



Tab 15: Množství terbinafinu uvolněného z A2 při pH 5,0 do média s 0,05 % CET.

Čas [dny]	Médium	A	TER [mg/50 ml]	TER [%]	Průměr [%] ± SD	TER [kum. %]
1	pufr	0,1478	0,97	19,3	19,9 ± 0,68	19,9
		0,1635	1,04	20,8		
		0,1484	0,97	19,4		
3	ACN	0,0699	0,14	2,8	3,1 ± 0,40	23,0
		0,0673	0,14	2,7		
		0,0877	0,18	3,6		
6	pufr	0,0403	0,46	9,1	8,9 ± 0,31	31,9
		0,0395	0,45	9,0		
		0,0333	0,42	8,4		
	ACN	0,0677	0,14	2,8	2,6 ± 0,16	34,5
		0,0607	0,12	2,4		
		0,0637	0,13	2,6		
8	pufr	0,1152	0,81	16,2	16,1 ± 0,70	50,6
		0,1216	0,84	16,8		
		0,1035	0,76	15,1		
	ACN	0,0715	0,15	2,9	2,3 ± 0,50	52,9
		0,0530	0,11	2,1		
		0,0445	0,09	1,7		
18	pufr	0,1582	1,02	20,3	19,8 ± 0,66	72,7
		0,1419	0,94	18,8		
		0,1562	1,01	20,1		
	ACN	0,1931	0,41	8,2	10,2 ± 1,81	82,9
		0,2934	0,63	12,6		
		0,2312	0,49	9,9		

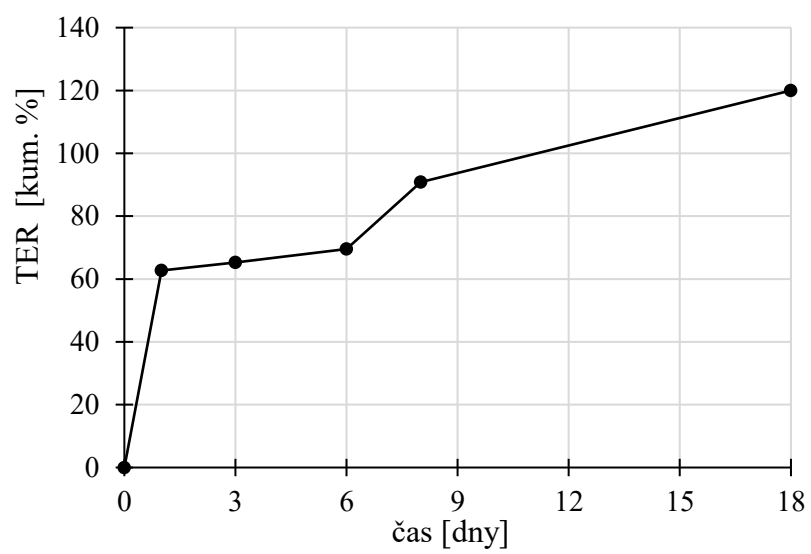
Obr 22: Průběh liberace terbinafinu z A2 při pH 5,0 do média s 0,05 % CET.



Tab 16: Množství terbinafinu uvolněného z D8 při pH 5,0 do média s 0,05 % CET.

Čas [dny]	Médium	A	TER [mg/50 ml]	TER [%]	Průměr [%] ± SD	TER [kum. %]
1	PUFR	0,2246	2,05	63,1	62,7 ± 0,90	62,7
		0,2176	2,00	61,5		
		0,2267	2,07	63,6		
3	ACN	0,0264	0,07	2,2	2,6 ± 0,45	65,3
		0,0271	0,08	2,3		
		0,0356	0,10	3,2		
6	ACN	0,0520	0,16	4,9	4,2 ± 0,52	69,5
		0,0417	0,12	3,8		
		0,0414	0,12	3,8		
8	pufr	0,0187	0,54	16,7	16,7 ± 0,86	86,2
		0,0236	0,58	17,8		
		0,0144	0,51	15,7		
	ACN	0,0519	0,16	4,9	4,6 ± 0,25	
		0,0481	0,15	4,5		
		0,0466	0,14	4,3		
18	pufr	0,0230	0,57	17,7	18,2 ± 0,68	109,0
		0,0297	0,62	19,2		
		0,0236	0,58	17,8		
	ACN	0,1105	0,36	10,9	11,0 ± 0,45	
		0,1161	0,37	11,5		
		0,1054	0,34	10,4		

Obr 23: Průběh liberace terbinafinu z D8 při pH 5,0 do média s 0,05 % CET.



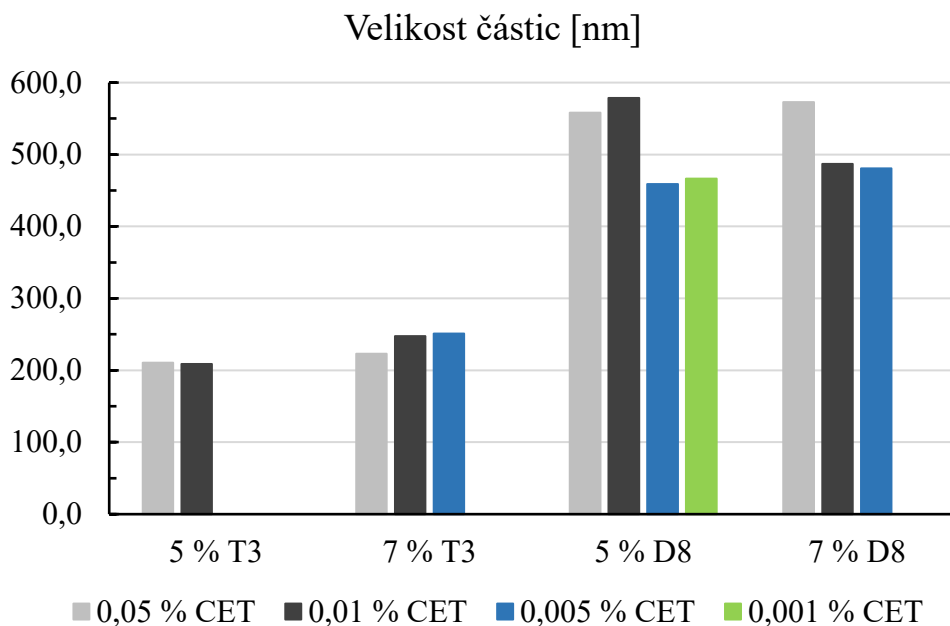
9 DISKUSE

Pro formulaci nanočástic s terbinafinem a klotrimazolem byly použity polyestery kyseliny mléčné a glykolové lineární a větvené struktury syntetizované polykondenzační reakcí ze směsi ekvimolárního množství kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, v případě větvených struktur ještě s přísadou větvicího monomeru. Lineární struktury získané touto syntézou mají relativně nižší molární hmotnost v porovnání s komerčně dostupnými PLGA (Resomery), prezentovanými v mnoha vědeckých pracích.^{84,85} Pokud jsou použity vícesytné alkoholy, výsledky polyester má koncové hydroxylové skupiny. Pokud je větvicím monomerem při syntéze použita kyselina polyakrylová, vznikne polyester s koncovými karboxylovými skupinami. To se projeví snížením hydrofobicity polymeru a vyšší kapacitou pro enkapsulaci léčiv.

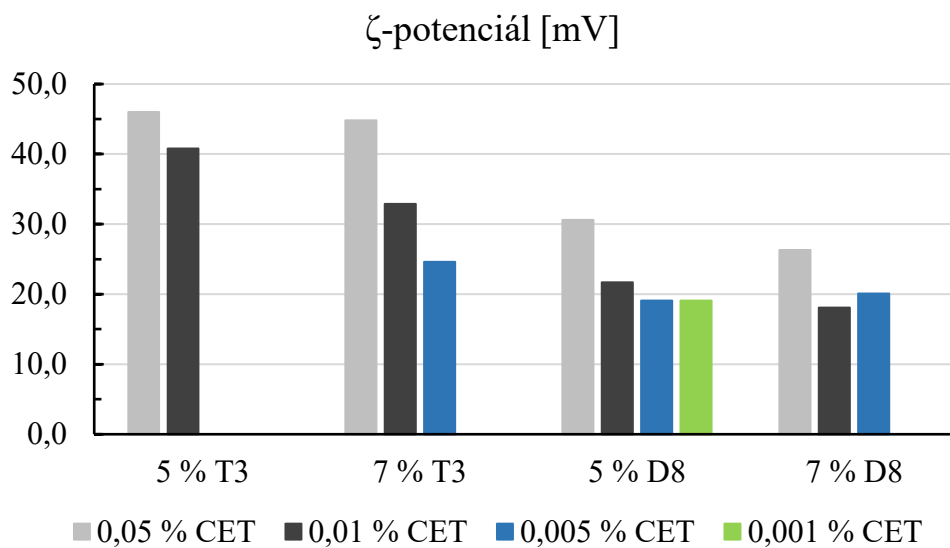
9.1 Nanočástice s klotrimazolem

Nanočástice s klotrimazolem byly připraveny nanoprecipitační metodou z polyesterů PLGA větvených na kyselině polyakrylové, dipentaerythritolu, nebo tripentaerithritolu. Jako vnější fáze byl zvolen roztok cetrimidu ve čtyřech koncentracích. Z lineárního PLGA a polyesteru A2 se nepodařilo nanočástice připravit, a to ani při nejvyšší koncentraci cetrimidu 0,05 %. Porovnání nanočástic s klotrimazolem zobrazují přehledně obrázky 24 a 25. Při použití polyesteru 3T došlo při nízkých koncentracích tenzidu k tvorbě sraženiny. Zvýšením koncentrace tenzidu vznikly nanočástice o velikosti 200 nm až 250 nm. Z výsledků v Tab. 6 a 7 vyplývá, že s rostoucí koncentrací polyesteru T3 roste velikost nanočástic a jejich polydisperzita. ζ -potenciál je ovlivněn koncentrací cetrimidu. Velikost nanočástic s klotrimazolem, tvořených polyesterem 8D, byla v rozmezí 480 nm až 580 nm, měly vyšší polydisperzitu a nižší ζ -potenciál (Tab. 8 a 9).

Obr 24: Velikost nanočástic s klotrimazolem tvořených polyestery 8D a 3T.



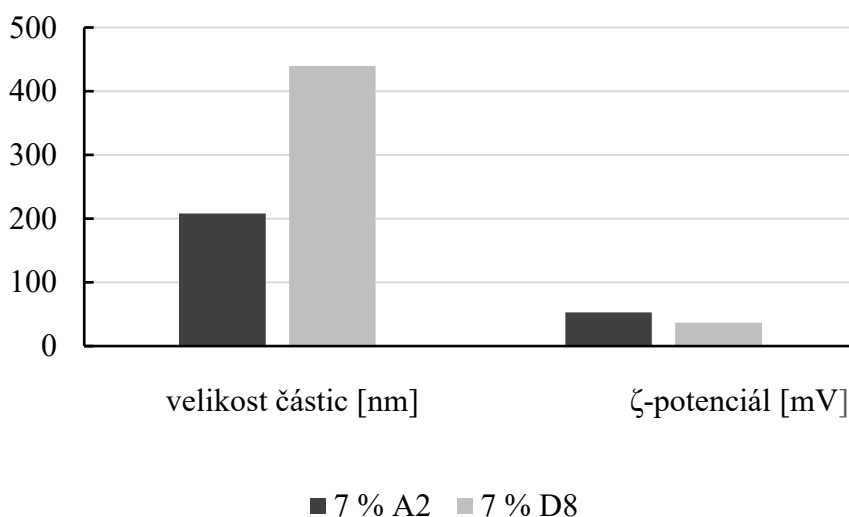
Obr 25: ζ -potenciál nanočástic s klotrimazolem tvořených polyestery 8D a 3T.



9.2 Nanočástice s terbinafinem

Nanočástice s terbinafinem byly připraveny nanoprecipitační metodou z polyesteru PLGA větveném na kyselině polyakrylové nebo dipentaerythritolu. Jako vnější fáze byl zvolen roztok 0,05 % cetrimidu. Nanočástice tvořené polyesterem A2 se vyznačují vyšším ζ -potenciálem a jsou menší velikostí v porovnání s nanočásticemi tvořenými polyesterem D8 (Tab. 10). Vliv typu polyesteru na charakteristiky nanočástic přehledně zobrazuje obrázek 26.

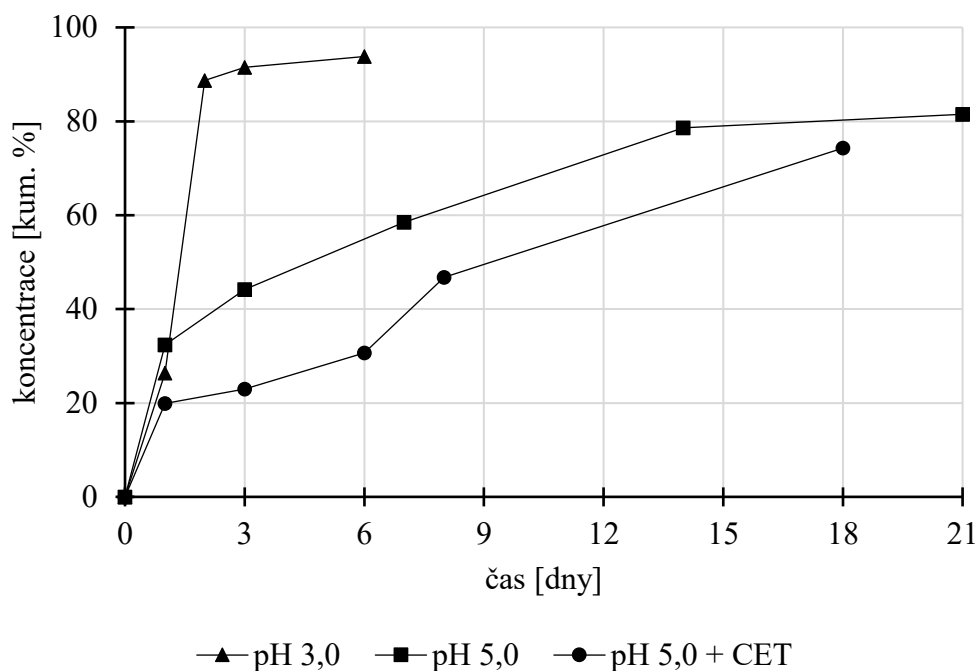
Obr 26: Vliv typu polyesteru na charakteristiky nanočástic.



Nanočástice se po centrifugaci, odstranění supernatantu a následné resuspendaci v roztoku tenzidu použily pro disoluční testy. Hodnota pH disolučního média byla upravena s ohledem na rozpustnost terbinafinu a byl přidán tenzid, což je v souladu s lékopisem.⁸⁶ Polyester větvený na kyselině polyakrylové (A2) má na konci řetězců volné karboxylové skupiny, což zvyšuje jeho hydrofilitu a zkracuje dobu degradace v porovnání s polyester větveným dipentaerythritolem (D8), obsahujícím koncové hydroxyly.

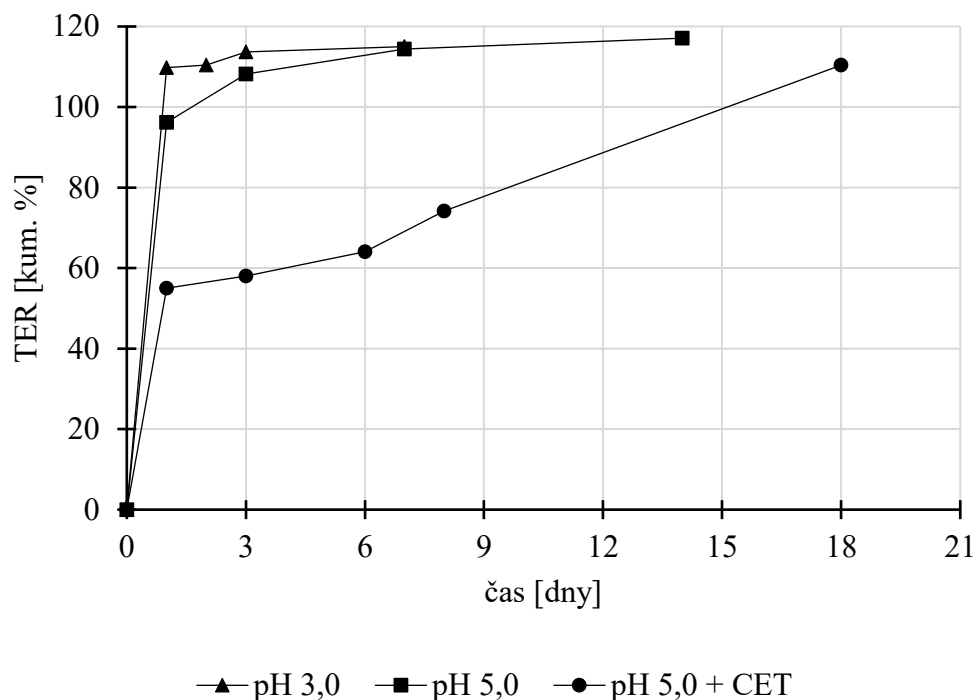
Množství uvolněného terbinafinu bylo stanoveno spektrofotometricky i HPLC. Problémem spektrofotometrického stanovení terbinafinu byla nízká citlivost metody a pravděpodobně i adsorpce léčiva na stěny vialky. Vialky byly vypláchnuty acetonitrilem, stanoveno množství terbinafinu a připočteno k množství terbinafinu uvolněného do disolučního média.

Obr 27: Vliv pH na průběh liberace terbinafinu z polyesteru A2.



Vliv pH disolučního média na průběh liberace terbinafinu z nanočástic tvořených polymerem A2 je na obr. 27. Terbinafin se nejrychleji uvolňoval Při pH 3,0 se téměř veškeré množství terbinafinu uvolnilo z nanočástic za 2 dny. Jsou dva důvody proč, liberace probíhala nejrychleji do média pH 3,0. Terbinafin je nejvíce rozpustný při tomto pH a také polyester A2 degraduje rychleji v silně kyselém prostředí. Při pH 5,0 byl zjištěn nejvyšší jednodenní burst, více než 30 %, po kterém následovalo prodloužené uvolňování terbinafinu po dobu 13 dnů. Z obrázku 27 je dále patrné, že disoluce probíhala nejpomaleji do média o pH 5,0 s přídavkem cetrimidu. Nesplnil se předpoklad, že přídavek tenzidu zvýší disoluci léčiva. Důvodem může být, že byla použita nízká koncentrace tenzidu. V literatuře bylo zjištěno, že se při disolučních testech používají i koncentrace cetrimidu 1 %.⁸⁷ Dalším důvodem mohla být interference cetrimidu a terbinafinu během spektrofotometrického měření. Toto bylo ale vyloučeno, jelikož cetrimid má absorpční maximum při vlnové délce 293 nm a terbinafin při 283 nm. Vliv hodnoty pH na liberaci terbinafinu z nanočástic tvořených polyesterem D8 je na obrázku 28. Terbinafin se uvolnil již během prvních 24 hodin. Opět probíhala liberace pomaleji do média s přídavkem tenzidu.

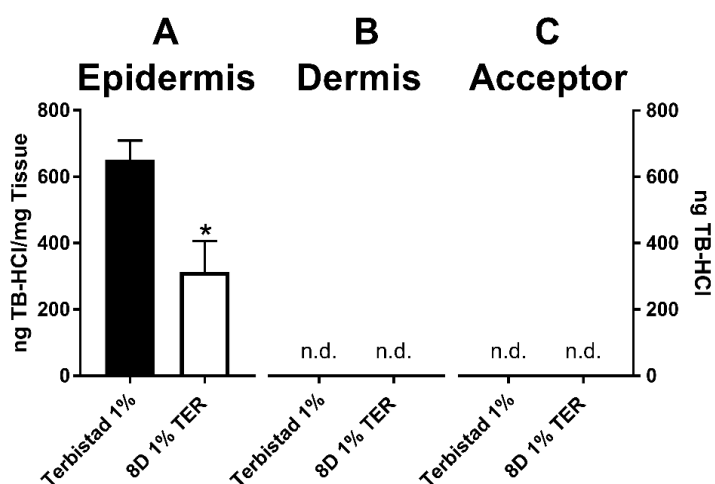
Obr 28: Vliv pH na průběh liberace terbinafinu z polyesteru D8.



9.3 Vstup terbinafinu do kůže

Průnik terbinafinu do kůže byl testován ve Franzových celách při teplotě 32,0 °C. Jako akceptorová fáze byl použit pufr pH 7,4. Po ekvilibraci se na kůži aplikovaly nanočástice tvořené polyesterem D8 s daným množstvím terbinafinu. Po 24 hodinách byly odděleny jednotlivé vrstvy epidermis a množství permeovaného terbinafinu bylo stanoveno metodou HPLC. Z grafu 29 je patrné, že se po aplikaci nanočástic na kůži terbinafin z polyesteru uvolňuje a vstupuje do epidermis. V dermis ani v akceptorové fázi nebyl terbinafin detegován. Dá se předpokládat, že po topické aplikaci polyesterových nanočástic s terbinafinem nedojde k jeho průniku přes kůži a vyvolání nežádoucích účinků. Souběžně byla testována permeace terbinafinu z komerčně dostupného přípravku Terbistad. V porovnání s polyesterovými nanočásticemi penetrovalo více terbinafinu do epidermis z komerčního 1 % Terbistad krému.

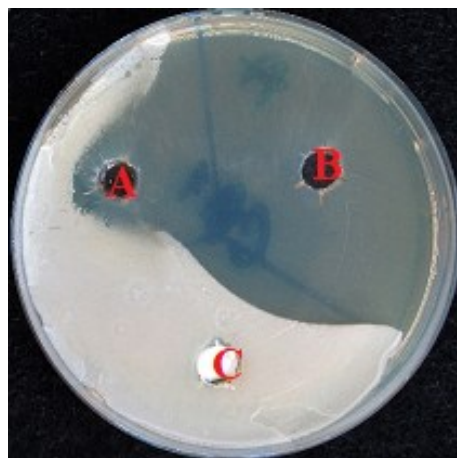
Obr 29: Penetrace terbinafinu do kůže po aplikaci Terbistad krému a polyesterových nanočástic s terbinafinem.



9.4 Antimikrobní účinnost terbinafinu

Pro stanovení antimikrobní aktivity terbinafinu byl zvolen testovací kmen *Candida albicans*. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 37,0 °C. Na obrázku 30 je zobrazena aktivita terbinafinu z jednotlivých formulací, tedy z komerčního 1 % Terbistad krému a nanočástic tvořených polyesterem D8. Bílá plocha Petriho misky zobrazuje růst testovacího kmene kvasinek. Průhledná plocha Petriho misky zobrazuje zónu zábrany růstu testovacího kmene. Byla potvrzena antimikrobní aktivita terbinafinu z polyesteru D8, nikoli z komerčního krému 1 % Terbistad krém. Určitou antimikrobní aktivitu vykazoval i samotný polyester D8 použitý jako placebo.

Obr 30: Fotografická dokumentace antimikrobní aktivity *in vitro*.



- A - placebo (polyester D8)
- B - terbinafin v polyesteru D8
- C - 1 % Terbistad

vzorek A

10 ZÁVĚR

Byly připraveny nanočástice tvořené polyesterem větveným na dipentaerythritolu (D8), enkapsulované klotrimazolem o velikosti 200 nm, PDI 0,09 a zeta potenciálu vyšším než 40 mV. Při použití polyesteru větveném na tripentaerythritolu (T3) byla velikost i polydisperzita nanočástic mírně vyšší. Z výsledků práce vyplývá, že vliv na velikost nanočástic má zejména koncentrace použitého polymeru, dále typ polymeru a rovněž koncentrace tenzidu.

Disoluční testy ukázaly vliv pH prostředí i typ polyesteru na rychlost liberace terbinafinu z nanočástic. V kyslejších prostředí docházelo k rychlejšímu uvolnění terbinafinu. Tenzid v koncentraci 0,05 % v disolučním médiu zpomalil liberaci léčiva. Z polyesteru D8 se terbinafin uvolnil rychleji než z polyesteru A2.

Na základě permeačních testů bylo zjištěno, že terbinafin proniká do epidermis, ale neprostupuje přes kůži. Kultivační testy prokázaly antimikrobní aktivitu nanočástic s terbinafinem.

11 SEZNAM LITERATURY

¹ BARÁK, V. Vliv formulačních faktorů na charakteristiky nanočástic s terbinafinem. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové.

² HOLAS, A. Hodnocení inkorporace terbinafinu do polyesterových nanočástic. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové.

³ *ChemSpider* [online]. Royal Society of Chemistry [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>

⁴ SUCHOPÁR, J., et al. Compendium - Léčiva používaná v podmínkách ČR. 5. Praha: Panax Co s.r.o., 2018, s. 951-955. ISBN 978-80-902806-7-0.

⁵ NEWLAND, J., ABDEL-RAHMAN S. Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses. *Clinical, Cosmetics and Investigational Dermatology*. 2009, 2009(2), 44-63.

⁶ DOLTON, M., PERERA M., PONT L., MCLACHLAN A. Terbinafine in Combination with Other Antifungal Agents for Treatment of Resistant or Refractory Mycoses: Investigating Optimal Dosing Regimens Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013, 58(1), 48-54.

⁷ KAREKAR, P., SALUNKHE N., YADAV A., BANGAR D. Modulation of Physico-Chemical Properties of Terbinafine HCl by Using Solid Dispersion Technique. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2014, 7(4), 450-453.

⁸ Databáze léků/terbinafin. Státní úřad pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2019-04-17].

Dostupné z:

http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Bgroup%5D=&data%5Bmaterial%5D=terbinafin&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20

⁹ CROWLEY, P., GALLAGHER H. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *Journal of Applied Microbiology*. 2014, 117(3), 611-617.

¹⁰ TUBMAN, V., MEJIA P., SHMUKLER B., BEI A., ALPER S., MITCHELL J., BRUGNARA C., DURAISINGH M. The Clinically Tested Gardos Channel Inhibitor Senicapoc Exhibits Antimalarial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, 60(1), 613-616.

¹¹ NQORO, X., N. TOBEKA, B. ADERIBIGBE. Quinoline-Based Hybrid Compounds with Antimalarial Activity. *Molecules*. 2017, 22(12), 2268.

¹² FURTADO, C., M. MARCONDES, R. CARVALHO, M. SOLLA-PENNA, P. ZANCAN. Phosphatidylinositol-3-kinase as a putative target for anticancer action of clotrimazol. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2015, 62(5), 132-141.

¹³ SHARMA, A., V. MEHTA, A. PARASHAR, U. MALAIRAMAN. Combinational effect of Paclitaxel and Clotrimazole on human breast cancer: proof for synergistic interaction. *Synergy*. 2017, 12(5), 13-20.

¹⁴ BETANZOS-LARA, S., et al. Redox-active and DNA-binding coordination complexes of clotrimazole. *Dalton Transactions*. 2014, 44(8), 3673-3685.

¹⁵ SCHATZSCHNEIDER, U. Antimicrobial Activity of Organometal Compounds: Past, Present, and Future Prospects. *Advances in Bioorganometallic Chemistry*. Japan: Elsevier, 2019, s. 173-192. ISBN 978-0-12-814197-7.

¹⁶ JOHAL, H., T. GARG, G. RATH, A. GOYAL. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Delivery*. 2016, 23(2), 550-563.

¹⁷ MITTAPALLI, S., et al. Soluble Salts and Cocrystals of Clotrimazole. *Crystal Growth & Design*. 2015, 15(5), 2493-2504.

¹⁸ Cetrimide - summary report. In: European Medicines Agency- Committee for Veterinary Chemical Products [online]. London: EMA, 1996, s. 1-3 [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/.../WC500012001.pdf

¹⁹ Pomocné látky v očních kapkách. ŠKLUBALOVÁ, Z., B. VRANÍKOVÁ. *Oční přípravky (Ocularia, Ophthalmica)*. Praha: Maxdorf, 2018, s. 61. ISBN 13: 978-80-7345-572-9.

²⁰ ENGBRETTSEN, K., et al. Allergic contact dermatitis caused by an antiseptic containing cetrimid. *Contact Dermatitis*. 2015, 72(1), 60-61.

²¹ ITO, E., et al. Potential Use of Cetrimonium Bromide as an Apoptosis-Promoting Anticancer Agent for Head and Neck Cancer. *Molecular Pharmacology*. 2009, 76(5), 969-983.

²² VENKATA NAGA JYOTHI, N., P. MUTHU PRASANNA, S. NARAYAN SAKARKAR, K. SURYA PRABHA, P. SEETHA RAMAIAH, G. SRAWAN. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* 2010, 27(3), 187-197.

²³ CANO-SARABIA, M., D. MASPOCH. Nanoencapsulation. *Encyklopedia of nanotechnology*. Springer, Dordrecht, 2015, 1.

-
- ²⁴ SARANYA,S., K. V. RADHA. Review of Nanobiopolymers for Controlled Drug Delivery. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 2014, 53(15), 1636-1646.
- ²⁵ MARTÍNEZ, R. a et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2017,532(1), 1-38.
- ²⁶ ŠNEJDROVÁ, E. a M. DITTRICH. Poly(α -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chem. Listy*. 2011, 105, 27-33.
- ²⁷ KAPOOR, D. N., A. BHATIA, R. KAUR, R. SHARMA, G. KAUR, S. DHAWAN. PLGA: A Unique Polymer for Drug Delivery. *Ther. Deliv.* 2015, 6(1), 41-58.
- ²⁸ Biodegradable Fibres based on Poly(lactic acid) PLA. In: NPTEL [online]. 2013 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z:
<https://nptel.ac.in/courses/116102006/Flash/6.1%20figure%202.jpg>
- ²⁹ SHABIR, A., F. ALHUSBAN, Y. PIERRE, MOHAMMED. Effects of ball-milling on PLGA polymer and its implication on lansoprazole-loaded nanoparticles. *J. Basic Clin. Pharm.* 2011, 2, 71-82.
- ³⁰ BALA, I., S. HARIHARAN, M.N.V. KUMAR. PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2004, 21(5), 387-422.
- ³¹ KUMARI, A., YADAV, S. H., S. C. YADAV. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, 75, 1-18.
- ³² LEPERTIER, E., C. BOURGAUX, P. COUVREUR. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014, 71, 86-97.
- ³³ MORALES-CRUZ, M., G. FLORES-FERNÁNDEZ, M. MORALES-CRUZ, E. ORELLANO, J. RODRIGUEZ-MARTINEZ, M. RUIZ, G. GRIEBENOW. Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. *Results Pharma Sci.* 2012, 2, 79-85.

-
- ³⁴ O'DONNELL, P., J. MCGINITY. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997, 28(1), 25-42.
- ³⁵ BAJEROVÁ, M., K. DVOŘÁČKOVÁ, J. GAJZIOK, R. MASTEIKOVÁ, M. RABIŠKOVÁ. Metody přípravy mikročastic ve farmaceutické technologii. *Česká a slovenská farmacie.* 2009, 58, 191-199.
- ³⁶ VYSLOUŽIL, J., K. DVOŘÁČKOVÁ, M. KEJDUŠOVÁ, M. RABIŠKOVÁ. Příprava léčivých mikročastic metodou odpařování rozpouštědla. *Chem. Listy.* 2013, 107, 16-23.
- ³⁷ BATTAGLIA, L., M. GALLARATE, E. CARLOTTI, M. TROTTA, P. ZARA, A. BARGONI. Solid lipid nanoparticles formed by solvent-in-water emulsion–diffusion technique: Development and influence on insulin stability. *J. Microencapsul.* 2007, 24(7), 672-784.
- ³⁸ SOUGUIR, H., F. SALAÜN, P. DOUILLET, I. VROMAN, S. CHATTERJEE. Nanoencapsulation of curcumin in polyurethane and polyurea shells by an emulsion diffusion method. *Chemical Engineering Journal.* 2013, 221, 133-145.
- ³⁹ WANG, Y., P. LI, T. TRUONG-DINH TRAN, J. ZHANG, L. KONG. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials (Basel).* 2016, 6(2), 1-26.
- ⁴⁰ ARPAGAUS, C., A. COLLENBERG, D. RUTTI, E. ASSADPOUR, S. JAFARI. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 2018, 1-2(546), 194-214.
- ⁴¹ ASPARAGAUS, C., et al. Nanocapsules formation by nano spray drying. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries.* Elsevier, 2017, s. 346-401. ISBN 978-0-12-809436-5.
- ⁴² SCHAFROTH, N., C. ARPAGAUS, U. JADHAV, S. MAKNE, D. DOUROUMIS. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2012, (90), 8-15.

-
- ⁴³ TIMILSENA, Y. P., T. O. AKANBI, N. KHALID, B. ADHIKARI, C. J. BARROW. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 121, 1276-1286.
- ⁴⁴ RAMAZANI, W. CHEN, C. F. VAN NOSTRUM, F. KIESSLING, T. LAMMERS, W. E. HENNINK, R. J. KOK. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges. *Int. J. Pharm.* 2016, 499(1-2), 358-367.
- ⁴⁵ LI, J., Y. PU, S. WANG, M. DING, D. CHEN, M. ZHU. Pharmacokinetic study and effectiveness evaluation of slow-release PLGA-5-fluorouracil microsphere. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013, 71, 351-359.
- ⁴⁶ GÓMEZ, C., M. D. BLANCO, M. V. BERNARDO, R. OLMO, E. MUNIZ, J. M. TEIJÓN. Cytarabine release from comatrices of albumin microspheres in a poly(lactide-co-glycolide) film: *in vitro* and *in vivo* studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 57, 225-233.
- ⁴⁷ SONG, X. R., Z. CAI, Y. ZHENG, et al. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 37(3-4), 300-305.
- ⁴⁸ WISCHKE, C., S. P. SCHWENDEMAN. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 2008, 364(2), 298-327.
- ⁴⁹ LE BROU-RYCKEWAERT, D., R. CARPENTIER, E. LIPKA, S. DAHER, C. VACCHER, D. BETBEDER, C. FURMAN. Development of innovative paclitaxel-loaded small PLGA nanoparticles: study of their antiproliferative activity and their molecular interactions on prostatic cancer cells. *Int. J. Pharm.* 2013, 454(2), 712-719.
- ⁵⁰ DOMÍNGUEZ-RÍOS, R., D.R. SÁNCHEZ-RAMÍREZ, P. E. RUIZ-SARAY, et al. Cisplatin-loaded PLGA nanoparticles for HER2 targeted ovarian cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019, 178, 199-207.

-
- ⁵¹ ITALIA, J. L., D. K. BHAT, V. BHARDWAJ, M. N. V. RAVI KUMAR. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: Nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral®. *J. Controlled Release*. 2007, 119, 197-206.
- ⁵² SAHANA, D. K., V. BHARDWAJ, M. N. KUMAR. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior *in vitro* and *in vivo* using estradiol as a model drug. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97(4), 1530-1542.
- ⁵³ DING, D., Q. ZHU. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* , 1041-1060.
- ⁵⁴ ABDELKADER, D. H., S. A. EL-GIZAWY, A. M. FAHEEM, P. A. MCCARRON, M. A. OSMAN. Effect of process variables on formulation, in-vitro characterisation and subcutaneous delivery of insulin PLGA nanoparticles: An optimisation study. *J Drug Deliv. Sci. Technol.* 2018, 43, 160-171.
- ⁵⁵ CHEREDDY, K. K., A. LOPES, S. KOUSSOROPLIS, et al. Combined effects of PLGA and vascular endothelial growth factor promote the healing of non-diabetic and diabetic wounds. *Nanomedicine*. 2015, 11(8), 1975-1984.
- ⁵⁶ ZHANG, X. P., J. G. SUN, J. YAO, et al. Effect of nanoencapsulation using poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) on anti-angiogenic activity of bevacizumab for ocular angiogenesis therapy. *Biomed. Pharmacother.* 107, 1056-1063.
- ⁵⁷ SCHAEFERS, M. M., B. DUAN, B. MIZHARI, R. LU, G. REZNOR, D. S. KOHANE, G. P. PRIEBE. PLGA-encapsulation of the *Pseudomonas aeruginosa* PopB vaccine antigen improves Th17 responses and confers protection against experimental acute pneumonia. *Vaccine*. 2018, 36(46), 6926-6932.

-
- ⁵⁸ FU, J., W. KAO. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Nondegradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2010, 7(4), 429–444.
- ⁵⁹ LIGGINS, R. T., H. M. BURT. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers. *Int. J. Pharm.* 2001, 222(1), 19-33.
- ⁶⁰ GRIZZI, I., H. GARREAU, S. LI, M. VERT. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials.* 1995, 16(4), 305-311.
- ⁶¹ LI, J., G. JIANG, F. DING. The Effect of pH on the Polymer Degradation and Drug Release from PLGA-mPEG Microparticles. *Journal of Applied Polymer Science.* 2008, 109, 475-482.
- ⁶² YEO, Y., K. PARK. Control of Encapsulation Efficiency and Initial Burst in Polymeric Microparticle Systems. *Arch. Pharm. Res.* 2004, 27(1), 1-12.
- ⁶³ KELES, H., A. NAYLOR, F. CLEGG, C. SAMMON. Investigation of factors influencing the hydrolytic degradation of single PLGA microparticles. *Polymer Degradation and Stability.* 2015, 119, 228-241.
- ⁶⁴ MIR, M., N. AHMED, A. REHMAN. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids and Surf. B Biointerfaces.* 2017, 159, 217-231.
- ⁶⁵ SEQUEIRA, J. A. D., A. C. SANTOS, J. SERRA, F. VEIGA, A. J. ROBEIRO. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix implants. *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs.* William Andrew, 2018, s. 375-402. ISBN 978-0-12-813665-2.
- ⁶⁶ FREDENBERG, S., M. WAHLGREN, M. RESLOW, A. AXELSSON. The mechanism of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery system-A review. *Int. J. Pharm.* 2011, 415, 34-52.

-
- ⁶⁷ LI, X., Y. WEI, P. LV, Y. WU, K. OGINO, G. MA. Preparation of ropivacaine loaded PLGA microspheres as controlled-release system with narrow size distribution and high loading efficiency. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019, 562, 237-246.
- ⁶⁸ KERALIYA, R.A., P. PATEL, V. KERALIYA, T.G. SONI, R.C. PATEL, M.M. PATEL. Osmotic drug delivery system as a part of modified release dosage form. *ISRN Pharmaceutics*. 2012, 2012:528079, 1-9.
- ⁶⁹ KAMALY, N., B. YAMEEN, J. WU, O.C. FAROKHZAD. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem. Rev.* 2016, 116(4), 2602-2663.
- ⁷⁰ DINARVAND, R., N. SEPEHRI, S. MANOOCHEHRI, H. ROUHANI a F. ATYABI. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomedicine*. 2011, 6, 877-895.
- ⁷¹ MOCHIZUKI, A., NIIKAWA, T., OMURA, I., YAMASHITA, S. Controlled release of argatroban from PLA film-Effect of hydroxyesters as additives on enhancement of drug release. *J. Appl. Sci.* 2008, 108, 3353-3360.
- ⁷² WONG, H. M., WANG, J. J., WANG, C. H. In vitro sustained release of human immunoglobulin G from biodegradable microspheres. *Ind. Eng. Chem.* 2001, 40, 933-948.
- ⁷³ LU, L., GARCIA, C. A., MIKOS, A. G. *In vitro* degradation of thin poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) films. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 46, 236-244.
- ⁷⁴ KANG, J., SCHWENDEMAN, S. P. Pore closing and opening in biodegradable polymers and their effect on the controlled release of proteins. *Mol. Pharm.* 2007, 4, 104-118.
- ⁷⁵ DÍEZ, S., DE ILARDUYA, C. T. Versatility of biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. *Eur. J. Pharm., Biopharm.* 2006, 63, 188-197.

⁷⁶ FRIES, W., SCHLAPP, M. Release mechanism from gentamicin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles. J. pharm. Sci. 2002, 91, 845-855.

⁷⁷ PARK, T. G., LU, W., CROTTS, G. Importance of *in vitro* experimental conditions on protein release kinetics, stability, and polymer degradation in protein encapsulated poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres. J. Control. Release. 1995, 33, 211-212.

⁷⁸ MAKADIA, H. K., S. J. SIEGEL. PolyLactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers. 2011, 3, 1377-1397.

⁷⁹ BUSATTO, C., J. PESOA, I. HELBLING, J. LUNA, D. ESTENOZ. Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: Experimental and mathematical modeling. Int. J. Pharm. 2018, 536(1), 360-361.

⁸⁰ DrugBank. DrugBank [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/>.

⁸¹ U.S. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

⁸² Buffer Solutions. Tables for the Laboratory. Merck, 57-59.

⁸³ ALALOR, CH., IGWILO, C., AZUBUIKE, CH.: Evaluation of the Anti-bacterial activity of Herbal ointments formulated with Methanolic extract of *Cassia alata*. Asian J. Biomed. Pharm.Sci. 2(13), 2012, 15-19.

⁸⁴ MANOOCHEHRI, S., DARVISHI, B., KAMALINIA, G., AMINI, M., FALLAH, M., NASER OSTAD, S. Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. J. Pharm. Sci. 2013, 21 (58), 1-10.

⁸⁵ RAFIEI, p. Haddadi, A., Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. Int J Nanomedicine. 2017, 12, 935–947.

⁸⁶ Doporučení pro zkoušku disoluce. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. Český lékopis 2017. 2017, s. 862-864. ISBN 859-404-924-045-6.

⁸⁷ PARK, S. H., CHOI, H. K.: The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. *Int. J. Pharm.* 2006, 321, 35-41.