

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

**Formulace nanočásticových polyesterových
systémů pro průnik do buněk**

Rigorózní práce

Robert Šrejma

Hradec Králové 2019

Děkuji Doc. RNDr. Milanovi Dittrichovi, CSc. za odborné vedení, rady, připomínky a podněty k mé rigorózní práci.

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

Robert Šrejma

Abstrakt

Rigorózní práce je zaměřená na studium vlivu složení soustavy na velikost nanočástic z alifatických polyesterů s lineární a větvenou konstitucí molekuly. Zvoleným postupem přípravy nanočástic byla emulzní metoda za rozdělování rozpouštědla. V teoretické části práce je pozornost zaměřena na nanočástice, jejich původ, využití a typy. Dostatečný prostor je také věnován přípravě nanonosičů. Je zde zmíněn i vliv parametrů nanočástic na jejich toxicitu.

V experimentální části práce se pracovalo se dvěma polymery odvozenými od kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) původní struktury. Do budoucna se uvažuje o ochraně jejich původnosti formou přihlášky vynálezu nebo užitého vzoru. Byly vyzkoušeny různé varianty vzorků kompozice s hlavním důrazem na volbu rozpouštědla polymerů a emulgátoru. Byly také aplikovány směsi rozpouštědel a emulgátorů. Dále byla zkoušena také inkorporace terbinafinu jako modelového léčiva.

Abstract

The rigorosum thesis is focused on the study of influence on the composition of the system to the size of the nanoparticles from aliphatic polyesters with linear and branched molecules constitution. The emulsion method for distributing of solvent was chosen for preparation of nanoparticles. The theoretical part describes the nanoparticles. Their origin, types and application. The following part is applying preparation of nanoparticles. There is also a mention influence of parameters to their toxicity.

In the experimental part of rigorosum was worked with two polymers of lactid and glycolic acid. It is possible that will be sign a patent of these polymers in the future. In the thesis were testing different composition of samples. A main emphasis is focus on the choice of polymer solvent and emulsifier. There were also applied mixtures of solvents and emulsifiers. There was also applied Terbinafine as model drug.

Úvod

Nanotechnologie jsou jednou z nejdiskutovanějších technologií současnosti. Poskytují mnoho možností výzkumů a nových znalostí. Jako nanotechnologie všeobecně označujeme vědní (někdy technický) obor výzkumu a vývoje, který se zabývá cíleným vytvářením a využíváním struktur materiálů o rozměrech pouhých několika nanometrů (1-100 nm), tedy zhruba tisícinu tloušťky lidského vlasu. Strukturními prvky nanotechnologie jsou molekuly i samotné atomy.

Využití nanotechnologií a nanomateriálů má široké spektrum. Nanotechnologie se uplatňují nejčastěji v elektronice (bioelektronika), ve strojírenství (obráběcí stroje), v chemickém a elektrotechnickém průmyslu (nanotrubice) nebo v optice (optické filtry). Také se využívají v textilním, vojenském nebo automobilovém průmyslu. Jejich význam rychle roste také ve zdravotnictví a farmacii, kde slouží například k cílené dopravě léčiv.

V této rigorózní práci jsem se zabýval formulací nanočásticových polyesterových systému pro průnik do buněk.

Zadání

Bylo zadáno vypracovat literární přehled o přípravě a testování nanočástic s obsahem terapeuticky aktivních látek na základě výběru relativně recentních kvalitních a zajímavých prací. Následně těžiště práce přenést do experimentální práce spočívající v testování velikosti a povrchového náboje samotných nanočástic z biodegradabilních polymerů s větvenou konstitucí molekul případně obsahujících inkorporovanou bázi terbinafinu.

Ve funkci rozpouštědla vnitřní fáze emulzní soustavy použít aceton a dimethylsulfoxid.

Nanočástice připravit v soustavě bez tenzidů, nebo s tenzidy. Sledovat vliv různých tenzidů, jako je cetrimid, disodium kokoamfoacetát, tegobetain, poloxamer a leurethsíran sodný na velikost nanočástic. Na základě dosažených výsledků vyzkoušet vliv změny aktuální acidity vnější fáze na sledované parametry produktů.

Zhodnotit velikost nanočástic produktů přípravy z hlediska intenzity míchání soustavy.

Prozkoumat a zhodnotit případný vliv objemu vzorků na velikost nanočástic.

Sledovat stabilitu připravených nanočástic po dobu jednoho dne.

Ve spolupráci se školitelem vyhodnotit dosažené výsledky a prezentovat je vhodným způsobem.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Úvod.....	6
Zadání.....	7
Obsah	8
1. Teoretická část	9
1.1.1. Využití nanočástic v medicíně	9
1.1.2. Hlavní typy nanočástic	10
1.2 Nanochemické přístupy při přípravě nanonosičů	13
1.2.1. Hot koloidní chemie	13
1.2.2. Chemie mikroemulzí.....	14
1.2.3. Organická chemická syntéza dendrimerů	15
1.2.4. Metoda reprecipitace	16
1.2.5. Vlastní montáž	17
1.2.6. Biosyntéza	18
1.3 Chemie pro „interface engineering“	18
1.3.1. Povrchové inženýrství pro biokompatibilitu	19
1.3.1.1. Chemický makeup	19
1.3.1.2. Enkapsulace micel	19
1.4 Terapie založená na nanočásticích a kontrolované uvolnění.....	20
1.4.1. Nanofarmakoterapie	21
1.4.2. Nanoterapie	22
1.4.3. Antimikrobiální terapie	24
1.5 Fyzikálně chemická kontrola toxicity nanočástic.....	24
1.5.1. Povrch nanočástic	24
1.5.2. Rozměry nanočástic	26
1.5.3. Složení nanočástic	26
2. Experimentální část	28
2.1. Použité přístroje	28
2.2. Použité chemikálie.....	28
2.3. Postup přípravy a měření vzorků	29
2.3.1. Příprava báze terbinafinu	29
2.3.2. Příprava vnější fáze	29
2.3.3. Příprava vnitřní fáze.....	29
2.3.4. Příprava nanočástic	29
2.3.5. Měření velikosti a zeta potenciálu částic.....	30
3. Výsledky	31
4. Obrázky	60
5. Diskuse.....	62
6. Závěry	68
7. Seznam použitých tabulek	68
8. Seznam použitých obrázků.....	71
9. Seznam použité literatury	72

1. Teoretická část

1.1 Nanočástice

Nanočástice jsou obecně definovány jako jakýkoliv částicový materiál, kde alespoň jeden rozměr je v rozmezí 1-100 nm. Mohou existovat v různých tvarech - kulovitých, tyčovitých, rovinných, hvězdicovitých a dalších. Nejrůznější chemické procesy, které řídí syntézu materiálů v nanometrickém měřítku, mohou být definovány jako nanochemie, jež hraje významnou roli ve fyzikálních a chemických vlastnostech částic. Nanočástice mají mnoho jedinečných mechanických, tepelných, elektrických, magnetických a optických vlastností. Dále mají velký poměr plochy k objemu v porovnání s běžnými konfiguracemi materiálů a vysokou povrchovou energií. Jejich chemická reaktivita a rozpustnost v různých rozpouštědlech může být regulována úpravou jejich povrchu s požadovanou funkční skupinou vyhovující konkrétní aplikaci. Jsou široce aplikovatelné jak v oblasti elektroniky, získávání a ukládání energie, biologií i v medicíně. [1,2,3,4]

Aplikace nanočástic v medicíně se nazývá nanomedicína. Tato pokročilá oblast medicíny se snaží řešit různé zdravotní problémy a vady. Čelí přitom konvenční medicíně se špatnou biologickou dostupností, poškozenou cílovou specifitou, systémovou a orgánovou toxicitou apod. Nanočástice určené pro lékařské použití byly inspirovány rozmanitými „přírodními“ částicemi objevenými v lidském těle – váčky, lipidy, proteiny a komplexem biomakromolekul, které regulují biologické funkce v těle a mohou fungovat jako nosiče aktivních molekul. [4,5]

V minulosti byly v nanomedicíně využívány nanonosiče na bázi lipidů a polymerů se zapouzdřenými léčivy pro cílený transport léčiv. V dnešní době jsou nanodiagnostika a nanočásticemi zprostředkovatelný transport léčiv považovány za doplňkové technologie a mohou přinést nebývalý rozvoj lékařství. Další moderní lékařské metody, které kriticky závisí na rozvoji nanomedicíny zahrnují například modulaci kmenových buněk a tkáňové inženýrství. [1,4,6,7,8]

1.1.1. Využití nanočástic v medicíně

Nanočástice hrají v nanomedicíně klíčovou roli při efektivním přenášení a doručování zobrazovacích sond, terapeutických činidel nebo biologických materiálů k cílům, tedy specifickým orgánům, tkáním nebo dokonce podkladovým buňkám. Dále slouží jako

vynikající nosiče jiných aktivních molekulárních nebo makromolekulárních látek, které se do nich mohou začlenit a připojit se k jejich povrchu. Nosiče nanočástic nebo nanonosiče mají v lékařství několik zásadních výhod oproti konvenčním molekulárním činidlům. Například tvoří stabilní vodné disperze aktivních, ale ve vodě špatně rozpustných molekulárních látek, vhodných pro transport do biologického prostředí. Složení, velikost, tvar a povrchové vlastnosti nanočástic umožňují ochranu zapouzdřených látek před degradací nejrůznějšími endogenními obrannými mechanismy. Mezi tyto mechanismy patří enzymatická degradace, imunodegradace, sekvestrace retikuloendoteliálním systémem v krevním řečišti, kyselá hydrolyza v žaludku, mukociliární clearance v plicích apod. Regulace jejich velikosti, tvaru a povrchových vlastností jim také dovoluje cílit nejen na specifické orgány tkáně v těle, ale dokonce na buněčné a subbuněčné specifity. [4,9,10,11]

Velkým přínosem je i skutečnost, že matrix nanočástic může být navržena ke kontrolovanému uvolňování léčiv v cílové oblasti k optimálnímu a trvalému působení léčiva. Zajímavým aspektem nanomedicíny je i tzv. multimodalita neboli vykonávání několika diagnostických či terapeutických funkcí zároveň. [4]

Je nutné dodat, že nanonosiče by neměly působit toxicky a měly by být bezpečně vyloučeny z těla, a to buď v nezměněné nebo v biodegradovatelné formě. [4]

1.1.2. Hlavní typy nanočástic

Kromě jednoduchých nanostruktur se vyskytují také struktury s různými začleněnými terapeutickými nebo diagnostickými látkami v jádře nebo v obalu a jsou vhodné pro nejrůznější multimodální využití. [4]

Prvním typem nanočástic jsou nanonosiče na bázi lipidů. Tři hlavní nanočásticové buňky na bázi lipidů jsou fosfolipidové nanomicely, vezikulární nanostruktury lipidové dvojvrstvy (liposomy) a nanočástice pevných lipidů (SLNs). Zatímco první dvě třídy využívají diglyceridy jako svoji součást, třetí třída je tvořena triglyceridy s vysokou teplotou tání. Liposomální nanonosiče, které obecně využívají fosfolipidy, sestávají z jedné či několika lipidových dvojvrstev s polárním vodním „jádre“, lipofilním dvojvrstevným oddělením a hydrofilním exteriérem. Vodní interiér může obsahovat ve vodě rozpustné léky, zatímco lipofilní část může být zahrnuta do dvouvrstvé oblasti. Kationtové liposomy jsou používány jako nosiče genů pro genovou terapii. Polyethylenglykol (PEG) řetězce jsou obvykle zabudovány do jejich povrchu pro lepší oběh a biologickou dostupnost. SLN se

vyrábějí ve velikostech 10-1000 nm za použití lipidů s vysokou teplotou tání. Jsou pevné při pokojové teplotě a jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné. [4, 12,13,14]

Dalším typem nanočástic jsou uhlíkové nanostruktury, které zahrnují fullereny, uhlíkové tečky, uhlíkové nanotrubičky (CNT) a grafenové tečky. Mají jedinečné elektrické a tahové vlastnosti. CNT jsou zvláště užitečné v biomedicínských aplikacích jako je snímání, sledování

a doručování léků. [15]

Zajímavé jsou nanonosiče anorganické, které nabízejí tu výhodu, že jsou extrémně robustní a proto jsou velmi stabilní a vysoce odolné vůči enzymové degradaci. Mohou být připraveny v ultramalých velikostech (<20 nm), mohou se vylučovat renálním nebo fekálním způsobem. Navíc jejich vnitřní elektronické, optické a magnetické vlastnosti mohou být přizpůsobeny řízením jejich krystalové fáze, velikosti, tvaru, složení a povrchových charakteristik tak, aby byly skutečně multifunkční pro sledování a terapii. Nanotoxicita je hlavním problémem u anorganických nanonosičů obsahujících atomy těžkých kovů (např. Cd). Tyto nanonosiče vyžadují biokompatibilní povlak na povrchu nanočástic. [1,16]

V poslední době se můžeme setkat s tzv. nanonosiči nové generace. Tyto nové generace nanonosičů musí být netoxické, šetrné k životnímu prostředí a vyrobeny z přírodních zdrojů a dostupných surovin, aby byly nákladově efektivní. [4]

Polymerní nanonosiče disponují velkou flexibilitou pro přizpůsobení se jejich chemickému složení, velikosti, biodegradabilitě, morfologii a povrchové funkčnosti, díky čemuž slouží jako skvělé nosiče léčiv v oblasti snímání, zobrazování a léčebných postupů. Mezi hydrofilní polymery patří polyethylenglykol, chitosan nebo dextran. Příkladem biodegradovatelných polymerů jsou polyestery, polyaminoestery, polyanhydridy, polyamidy apod. Většina biologicky rozložitelných polymerů je charakterizována tím, že mají heteroatom, který usnadňuje hydrolýzu a štěpení vazby. Tyto nanonosiče mohou být degradovány hydrolýzou in vitro nebo in vivo za specifických podmínek, tudíž poskytují kontrolu uvolňování léčiva a usnadňují vylučování z těla. Polylaktid-ko-glykolid (PLGA) je polyester schválený americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), jehož mikročástice a nanočástice byly úspěšně použity u nanoformulací řady léků. Pro optimální použití in vivo mohou však být kvůli své lipofilnosti nanočástice PLGA potaženy hydrofilním biokompatibilním polymerem, např. PEG. Dalším biologicky odbouratelným materiálem je chitosan. Jedná se o derivát přírodního polysacharidu chitinu, jež je primárně extrahovaný z

krabí skořápky. Je hydrofilní, kationtový a může se elektrostaticky vázat na aniontový genetický materiál, jako je DNA a siRNA, čehož se využívá v genové terapii. V nedávné době byly připraveny ve vodě rozpustné nanočástice s PLGA jádrem a chitosanovým obalem. Vnitřní PLGA jádro může obsahovat hydrofobní léčivo, zatímco chitosanový obal může začlenit hydrofilní komponenty (např. DNA, RNA, biorekognitivní činidla). [4,17,18,19,20,21,22,23,24,25]

Přírodní biokompatibilita a biologická rozložitelnost biopolymerů, jako jsou proteiny a cukry, je činí velmi slibnými v oblasti biodistribuce léčiv. V tomto ohledu získaly proteinové nanočástice zvyšující se pozornost, jelikož jejich amfifilita podporuje jejich interakci s vodou nerozpustnými léčivy a fyziologickými tekutinami. Nanočástice mohou být připravené z přírodních bílkovin pomocí jednoduchých technik, jako je spontánní samosestavení (self-assembly), emulgace, solná koacervace, chemické zesíťování apod. Navíc jejich rozmanité chemické složení (přítomné funkční skupiny jako amino, karboxy a thiol) napomáhá chemickým vazbám s léčivy, zobrazovacími činidly, bioafinitními ligandami a dalšími. Velké množství přírodních proteinů bylo testováno pro dodávání léčiv. Zahrnují albumin, želatínu, kasein, ferritin, elastin, gliadin apod. [4,26,27,28]

Albumin je známý tím, že se přirozeně váže na určité léčivé látky a endogenní molekuly a funguje jako fyziologický transportér. Zajímavý je také gliadin, který má mukoadhezivní vlastnosti, tendenci vytvářet vodíkové vazby a poskytovat další interakce s mukózními povrchy. Nanočástice gliadinu lze použít pro orální a místní podávání léčiv. [29,30]

Blokové kopolymery obsahující alespoň hydrofilní a lipofilní část jsou také důležité z hlediska aplikace léčiv. Ve vodních médiích se spontánně sestavují do speciálních struktur s hydrofobním vnitřním jádrem. Tyto „polymerní nanomicely“ zůstávají nedotčené ve velmi zředěných roztocích, neboť mají mnohem nižší kritickou micelární koncentraci, než povrchově aktivní micely. Zvláště zajímavé jsou ty, kde hydrofilní blok obsahuje pH nebo termosenzitivní skupiny, např. akrylamid. Další třída blokových kopolymerů, které obsahují fosfolipidy jako lipofilní jednotku, našla univerzální využití v dodávání léčiv – jako fosfolipidové nanomicely nebo potahovaná činidla na jiných nanočásticích. Jiný typ zahrnuje polymerní jádro doplněné o polymerní kartáče, které se mohou chovat jako biosenzory, nebo obsahují zobrazovací či diagnostické látky. Speciální třídou organických nanočástic jsou dendrimery. Jsou to supramolekulární struktury, jež se skládají z dobře definovaných, vysoce

rozvětvených, organických jednotek. Jelikož mají velice malé a monodisperzní průměry (pod 20 nm), jsou detailně prozkoumávány pro různé biomedicínské využití. [31,32,33,34,35]

1.2 Nanochemické přístupy při přípravě nanonosičů

Nanočástice jsou syntetizovány dvěma způsoby: shora dolů (top-down) a zdola nahoru (bottom-up). Při prvním způsobu se rozměry tuhých materiálů postupně snižují do nano-oblasti pomocí fyzikálních a chemických prostředků. Druhý přístup zahrnuje přípravu materiálů nano-velikosti reakcí atomů a molekul ve vhodném syntetickém prostředí. Přítomnost dalších mechanismů kontroly růstu zabraňuje formaci větších sraženin. Kontroly růstu produktových sraženin lze dosáhnout fyzikálními nebo chemickými prostředky. [1,2]

1.2.1. Hot koloidní chemie

Různé anorganické nanočástice lze i přes své rozmanité složení syntetizovat pomocí tak zvané hot koloidní chemie. Mezi anorganické nanočástice patří polovodičové kvantové tečky, magnetické nanočástice, nanočástice plasmového kovu nebo slitinového kovu, samodotovaný plasmový nebo slitinový polovodič, plasmové transparentní vodičové nanočástice a lanthanid- dotované vícebarevné nanočástice. Tento typ syntézy umožňuje manipulaci s jejich optickými nebo elektronickými vlastnostmi přesně definovaným způsobem. Tento nanochemický přístup obvykle používá míchání příslušných nabitých iontů v předem stanoveném poměru při definované teplotě krystalizace v ligandem řízeném roztoku (koordinační-rozpouštědlo), následovaným srážením nanoproduktu. Obecně zahrnuje tři složky: soli kovů nebo organokovové sloučeniny jako prekurzory, vybrané ligandy (také surfaktanty nebo ochranné skupiny) s hydrofobním řetězcem a hydrofilní hlavicí zakončenou funkční skupinou, například trioktylfosfin (TOP), trioktylfosfinoxid (TOPO), kyselinou olejovou nebo oleylamin a vysokovroucí rozpouštědlo. [1,36,37]

Prekurzory poskytují anorganické prvky (např. Cd a Se pro CdSe QDs), ze kterých jsou částice formovány. Vzniká vysokovroucí rozpouštědlo, které poskytuje dostatečně vysokou teplotu pro úplnou solubilizaci a rozklad reakčních složek, jakož i pro krystalizaci výsledných nanočástic. Ligandy adsorbují (prostřednictvím koordinace) na povrchu rostoucích částic, aby omezily a regulovaly jejich velikost v nanodimenzii. Typicky zahrnuje

řešení ligand, který se zahřeje na teplotu 150 až 350°C za vzniku požadovaných anorganických nanočástic. [4,38]

Existují dva způsoby, jak vkládat prekurzory do hrotu baňky s kulatým dnem. První způsob je způsob "vstříkávání za tepla", tj. injekce příslušných prekurzorů do horkého roztoku obsahujícího vysoce vroucí rozpouštědlo a povrchově aktivní látky. Tento proces vede k vyvolání nukleace a k prudkému oddělení nukleace od procesu růstu, který je zásadní pro výrobu velikostně jednotných anorganických nanočástic. Velikost nanokrystalů může být řízena teplotou, povahou rozpouštědla, detergenty a dobou stárnutí. [4,39]

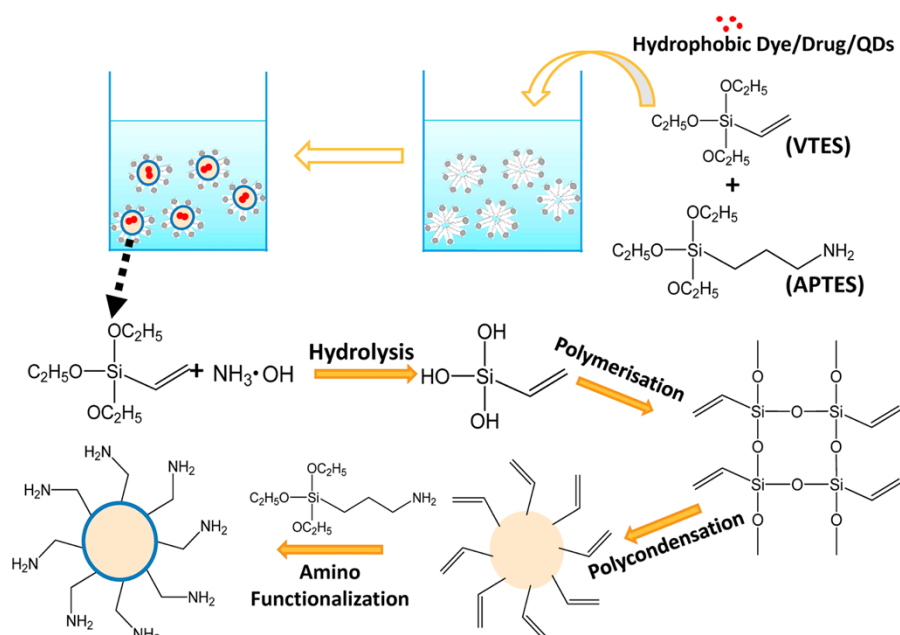
Druhý způsob vkládání prekurzorů do hřbetu baňky s kulatým dnem je "zahřívání", čímž se teplota reakčního roztoku obsahující předpjaté prekurzory zvýší z pokojové teploty na určitou vysokou teplotu k výrobě nanočástic. Tento způsob obecně zkoumá dvě cesty, jak vyrábět uniformní anorganické nanočástice. Jedním z nich je náhlé uvolňování kovových iontů z kovových komplexů v bodě tepelného rozkladu, čímž vznikne proces jaderného výbuchu, doprovázený fází růstu zaměřenou na velikost (size-focused growth stage). Toho využívá stejný princip, jaký byl popsán pro metodu "vstříkávání za tepla". Druhý způsob spočívá v Ostwaldově zrání, jež vede k tvorbě různých velikostí částic, vyrobených mícháním podobných prekurzorů při pokojové teplotě.

1.2.2. Chemie mikroemulzí

Mikroemulze může být definována jako termodynamicky stabilní, opticky izotropní disperze dvou nemísitelných kapalin (např. vody a oleje) s alespoň jedním typem povrchově aktivní látky. Povrchově aktivní látky jsou amfifilní molekuly mající polární (hydrofilní) hlavní skupinu a dlouhý nepolární (hydrofobní nebo lipofilní) řetězec, což může výrazně snížit povrchové napětí na rozhraní olej-voda. Pokud je velké množství vody rozptýleno ve velkém objemu oleje, povrchově aktivní látky se kolem nich skládají tak, že tvoří reverzní (voda v oleji, v/o) mikroemulze, přičemž polární skupiny jsou nasměrovány směrem dovnitř, aby se vytvořily vodní reverzní micelární nanoreaktory, ve kterých mohou polární molekuly reagovat. V obou případech o/v a v/o mikroemulze, surfaktanty slouží nejen ke stabilizaci nanoreaktorů pro chemické syntézy, ale také fungují jako sterické stabilizátory k inhibici agregace reaktivních složek během reakční doby. Nepřetržitá výměna micelárního obsahu prostřednictvím dynamických kolizí umožňuje pokračování reakce. Vzhledem k tomu, že reakce je uzavřena v nanokavitě micel, růst nanočástic za hranicemi dutiny je zablokován. [41,42,43]

Velikost micely je obecně diktována molárním poměrem mezi obsahem menšinové fáze a obsahem použitého surfaktantu. V důsledku toho lze tento poměr snadno měnit k regulaci velikosti a tvaru kapiček, která odpovídajícím způsobem ovlivní velikost a tvar výsledné nanočástice. [43]

Příkladem této chemie je syntéza organicky modifikovaných křemičitanových (ORMOSIL) nanočástic využitím alkalické polymerace- kondenzace příslušných prekurzorů organosilanu v omezeném rozměru micel. [44]



Obr.1 Schéma syntézy ORMOSIL použitím AOT/butanol/vodního mikroemulzního systému

1.2.3. Organická chemická syntéza dendrimerů

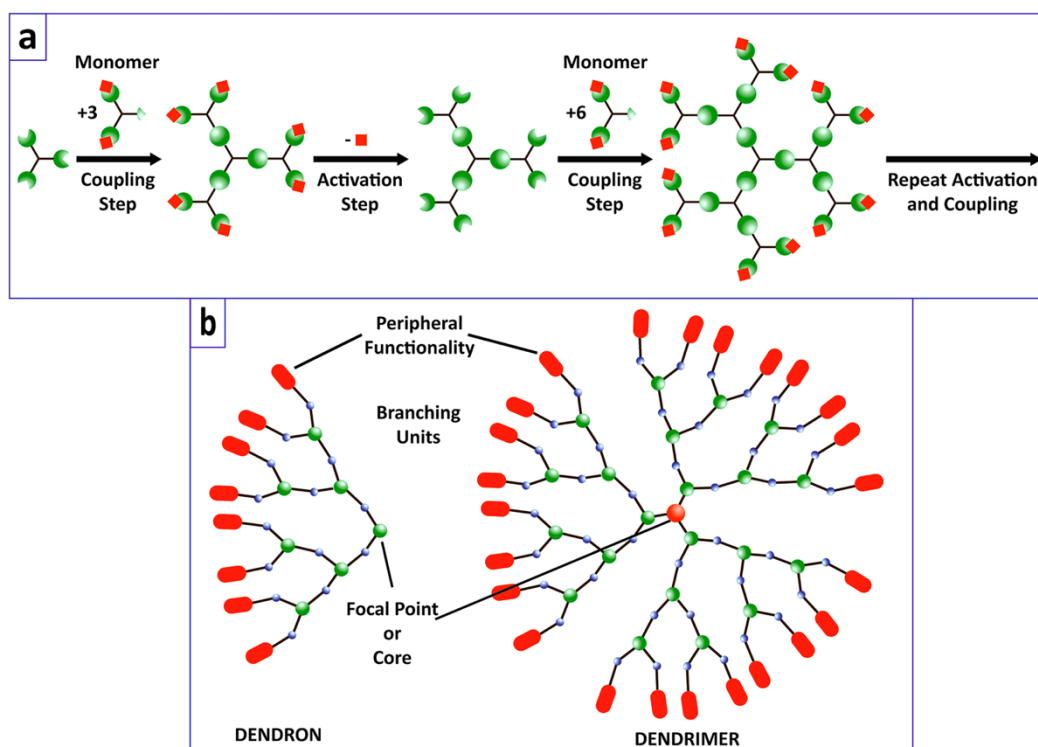
Dendrimery jsou důležitou skupinou vysoce rozvětvených polymerních nosičů v nanomedicině. Existují dva různé chemické přístupy syntézy dendrimerů - divergentní a konvergentní přístup. [4]

Divergentní přístup vyvinuli Tomalia a kolektiv a Newkome a kolektiv. Zahrnuje růst směrem ven z jádra pomocí opakování série spojení a aktivace, z nichž každá přidává jednu vrstvu (nebo generaci) do struktury. Jádro je monomerní jednotka s vícenásobnou vazbou (větvení),

která reaguje s komplementární reaktivní skupinou jiných monomerů. Ostatní reaktivní skupiny na monomerech jsou chráněny, dokud není potřeba, aby se dosáhlo řízeného růstu. Chráněné skupiny mohou být chemicky aktivovány převedením na reaktivní chemickou skupinu, pro spojení s druhou sadou molekul k získání dendrimeru další generace. Jedná se o

aktivační krok. Tak může být připraven dendrimer s dobře definovanou generací. S vhodným výběrem spojky a aktivačních kroků má tento rozdílný přístup tu výhodu, že může vést k rozsáhlé přípravě dendrimerů tak, že velikost dendrimeru se podstatně zdvojnásobuje s každým přidáním generace. Hlavním problémem je však pravděpodobnost nekompletní funkcionalizace nebo další vedlejší reakce, které rostou exponenciálně s každou další generací. Strukturální chyby jsou pravděpodobné. [4,45,46]

Konvergentní přístup byl zaveden Fréchetem a spolupracovníky a začíná vnitřním růstem spojením koncové skupiny s každou větví monomeru. Klínovité dendritické fragmenty nazvané "dendrony" jsou získány a následně spojeny s produkcí globulárních dendritických molekul. Výhodou, kterou nabízí konvergentní přístup je, že nabízí větší strukturální kontrolu, jelikož každý krok růstu vyžaduje poměrně malý počet spojení reakcí. Další výhodou je pak schopnost přesně umístit funkční skupiny v celé struktuře. Nicméně je však nevýhodou, že má méně snadno změnitelnou velikost ve srovnání s divergentním přístupem. [4,35,47]



Obr.2 Schématický náčrt divergentního přístupu (a) a konvergentního přístupu (b) pro chemickou syntézu dendrimeru.

1.2.4. Metoda reprecipitace

Mnoho běžně používaných léčivých přípravků je hydrofobní povahy. Dodávky těchto léků vyžadují speciální složení k jejich rozptýlení ve vodném roztoku s použitím povrchově aktivních látek nebo jiných přenašečů na bázi nanočástic. Nicméně přítomnost povrchově

aktivních látek a dalších stabilizátorů může mít nespecifické toxické účinky. Začíná tedy růst zájem o vývoj nového lékového složení a způsobu dodávání, aniž by byla přidána nějaká vnější činidla - povrchově aktivní látky nebo jiné nosiče. Jedním z vysoce vhodných způsobů disperze lipofilní sloučeniny ve vodě je "metoda reprecipitace". Reprecipitace je přístup, který zahrnuje vpravení léčiva, jež je rozpuštěná v semipolárním rozpouštědle, jako je DMSO (částečně mísitelná s vodou) do vodné fáze. Po kontaktu s vodou se molekuly léku samy shromažďují a vysráží ze smíšeného rozpouštědla ke snížení volné energie systému, produkující čisté nanokrystaly, které zůstávají stabilně rozptýlené ve vodě. [4,48,49]

Tato metoda nezahrnuje zabudování jakýkoliv dalších stabilizačních činidel, jako jsou povrchově aktivní látky apod. V tomto ohledu byla připravena nanokrystalická formulace hydrofobního fotosenzibilizátoru (PS) léčiva 2-devinyl-2-(1-hexyloxyethyl)pyropheorbid (HPPH) pro fotodynamickou terapii a porovnána její účinnost s běžnou formulací založenou bázi na surfaktantu. Výsledné nanokrystaly jsou monodisperzní s průměrem 100 nm. Ačkoli byly fluorescence a fotodynamická aktivita nanokrystalů léčiv v podstatě rozloženy ve vodném prostředí kvůli agregaci molekul léčiv HPPH, obě mohou být získány v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Obnova aktivity léku a fluorescence je přičítána interakci nanokrystalů s krevním sérem nebo jinými intracelulárními složkami (např. sérový albumin), což vede ke konverzi léčiva nanokrystalů do molekulárně dispergované formy. Reprecipitace je jednoduchou a efektivní metodou, která je přístupná v průmyslovém měřítku, vyžadující jen mírné míchání pod minimálním smykovým napětím, aniž by byly obsaženy povrchově aktivní látky. Tento přístup by mohl být použit i pro přípravu nanočástic jiných lipofilních polymerů nebo molekul léčiv. Nevýhodou však je, že metoda reprecipitace není použitelná pro mnoho hydrofobních a všechny hydrofilní farmaceutické látky. [4,50]

1.2.5. Vlastní montáž

Proces vytváření vlastních sestav nanostruktur, jako jsou např. liposomy, porfysomy a polymerní micely ve vodném prostředí roztoků, je jednou z prvních používaných metod nanosyntézy. Tento proces je do značné míry podobný procesu reprecipitace. Oba využívají „samomontážní“ charakter, který přirozeně vyrovnává lipofilní polymery a léky do jedinečné nanostruktury, aby se snížila volná energie systému. Tvorba částic byla přičítána mezifázové interakci mezi kapalnými fázemi, které jsou řízeny principem Gibbs-Marangoniho efektu. Nicméně složky jsou zde obvykle menší, na bázi lipidů nebo polymerů (molekulová hmotnost menší než 5000 jednotek), a jsou obecně složeny z lipofilní části a hydrofilní části. Samostatné seskupování těchto molekul může vyústit v nanočástice lipidové dvojvrstvy

obklopující vodný úsek, který může obsahovat molekuly hydrofilních léčiv nebo nanočástice, které sestávají z hydrofobního jádra, se zachycenými hydrofobními léčivými látkami obklopenými hydrofilním obalem pro sterickou stabilizaci. Obě výsledné nanostruktury byly využity

pro konstrukci biokompatibilních, netoxických a biologicky rozložitelných látek v systémech dodání léčiv. Dvouvrstvý nanomateriál je všestranný při zapouzdření hydrofilních léčiv ve svém vnitřním jádru a ukotvení hydrofobního léčiva v jeho dvojvrstvě. Jeho povrch může být dále funkční, aby vyhovoval určité aplikaci. [4,51,52,53,54]

Typické příklady samospořádaných nanočástic zahrnují směsi fosfolipidů včleňujících se do dvouvrstvých vezikul (liposomů), blokové kopolymery s vlastnostmi podobnými povrchově aktivním látkám (obsahujících hydrofilní a lipofilní bloky) tvořící polymerní micely, fosfolipidní hydrofilní polymery tvořící fosfolipidové micely, atd. Jiné „samomontážní“ nanostruktury jako jsou niosomy, akvasomy, polymerosomy, virosomy, apod. byly také použity v biomedicině. [4]

1.2.6. Biosyntéza

Intracelulární biosyntéza za použití vnitřních enzymatických „strojů“ buňky je dalším slibným směrem pro syntézu nanočástic. Zástupci z Universidad Andres Bello, Santiago, Chile prokázali, že psychotolerantní, oxidativní stres - rezistentní extremofily, *Pseudomonas* spp. bakterie z Antarktidy jsou schopny biosyntetizovat CdS QDs při nízkých teplotách zavedením prekurzorů Cd a S uvnitř buňky. Bakteriální syntéza nanočástic potenciálně nabízí další výhody včetně nízké ceny, vodné dispergovatelnosti, lepší biokompatibility a produkce nanočástic s novými vlastnostmi. [55,56]

1.3 Chemie pro „interface engineering“

Mezipovrchová chemie nanočástic hraje klíčovou roli v stabilní disperzi ve fyziologických tekutinách, biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti, in vitro a in vivo dynamice, cílové schopnosti a vylučování. Aby bylo možné úspěšné zavádění nanočástic nebo nanonosičů v tělním systému, musí být splněny některé z obecných požadavků. Nanočástice vyžadují biokompatibilní hydrofilní povrch, aby se vytvořila stabilní disperze ve vodě a/nebo ve fyziologickém roztoku pro biologické aplikace v žijících systémech. Nanočástice potřebují reaktivní funkční skupiny na jejich povrchu pro následnou biokonjugaci k různým biomolekulám (jako jsou např. peptidy, proteiny, protilátky a

aptamery) pro cílení zprostředkovaných receptorů na specifické místo v těle. K proniknutí na cílové místo nanočástice potřebují vhodný povrch k poskytnutí "tajné" akce překračující různé biologické bariéry, které omezují migraci cizích částic v těle. Zainteresané bariéry závisí na druhu použitého způsobu doručení, například na orálním podání, nosním podání, transdermálním podání a intravenózní injekci. [1,2,4]

1.3.1. Povrchové inženýrství pro biokompatibilitu

Atributy hydrofilnosti a/ nebo reaktivních skupin, poskytované povrchem nanočástic, jsou povinné pro jejich biokompatibilní aplikace. Pro takto žádoucí chemii povrchů musí nanočástice představovat volné reaktivní funkce na jejich povrchu, které mohou být poskytnuty samotným připraveným jádrem nanočástic nebo přidaným povrchem molekuly modifikátoru. [4]

1.3.1.1. Chemický makeup

Pro stabilní vodnou disperzi a snadnou biokonjugaci vyžadují nanočástice hydrofilní povrchové a reaktivní povrchové funkce. Nanočástice některých polymerů (např. chitosan, polyethylenimin, kyselina poly (akrylová)) a anorganických materiálů (např. oxid křemičitý a organicky modifikovaný oxid křemičitý) jsou hydrofilní a obsahují reaktivní povrchové funkce. Další třída polymerních nanočástic známá jako polymerní micely se vytváří, když se hydrofobní- hydrofilní blokové kopolymery (např. PLGA-co-poly-L-lysin) samy asociují ve vodném systému. Bloky hydrofobních fosfolipidů a hydrofilních polymerů, jako je distereoylfosfatidyl-methoxy-polyethylenglykol (DSPE-mPEG), také tvoří polymerické micely. Zde hydrofobní řetězce interagují za vytvoření vnitřního jádra s hydrofilními řetězci směrem ven ve vodném prostředí. Tyto hydrofilní řetězce mohou také obsahovat reaktivní skupiny (např. amino, karboxyl, thiol, maleimid, biotin) na jejich koncích pro zajištění povrchu funkčnosti a schopnosti biokonjugace. [4,57,58]

1.3.1.2. Enkapsulace micel

Některé syntetizované nanočástice jsou převážně hydrofobní a vyžadují tak povrchovou modifikaci pro kompatibilitu s fyziologickým prostředím. Několik polymerů na bázi hydrofobních řetězců, jako je polylaktid-ko-glykolid (PLGA) a polymethylmethakrylát

(PMMA), umístěných jako mikro/ nanočástice ve vodném médiu. Avšak pro stabilní vodnou disperzi musí být tyto zapouzdřeny v micelární síti, kde se jejich hydrofobní řetězce propojují s vnitřními hydrofobními bloky micel. Určité polymery nebo smíšené kopolymerní sítě, jako například ty obsahující polyvinylalkohol (PVA), poloxamery a poloxaminy, poskytují takové micelární struktury ve vodném prostředí. Například PVA byl široce používán k potahování povrchu PLGA nanočástice. [59,60,61,62]

1.3.1.3. Hydrofilní povrchově aktivní molekuly (SRM).

Hlavní přístup syntézy částic zahrnuje srážecí reakce z rozpustných prekurzorů v přítomnosti jednoho nebo více povrchově reaktivních molekul (SRM). SRM mohou být malé nebo velké molekuly s alespoň jednou reaktivní koncovou skupinou. Tato reaktivní skupina se chemicky "ukotví" na povrch rostoucí sraženiny, čímž se omezí konečná velikost částic v nanodimenzi. Výběr této ukotvené skupiny do značné míry závisí na složení připraveného nanomateriálu. Například zatímco thioly, disulfidy, fosfiny a aminy jsou známy kotvou na povrch kvantových teček (QD), nanočástice vzácných kovů, fosfonových kyselin a karboxylových kyselin se vážou na povrch nanočástic oxidu kovu. Kromě kotvícího konce je žádoucí pro další biokonjugaci, že SRM obsahují jiné reaktivní složky konce, které jsou od sebe odděleny. Výběr SRM, ať už vodného nebo organického rozpustného, spoléhá na syntetické prostředí nanočástic. Nanočástice několika anorganických materiálů, jako jsou ušlechtilé kovy (například zlato, stříbro), některé kovové oxidy, fosforečnan vápenatý, apod. lze syntetizovat za okolních podmínek ve vodném prostředí. Nicméně syntéza několika dalších nanočástic, jako jsou kvantové tečky (např. CdSe / CdS), oxidy kovových nanočástic (např. SPIONs), a nanofosfory dopované vzácnými zeminami vyžadují vysokou teplotu a korozivní podmínky. Podmínky těchto "horkých koloidních" syntéz omezují výběr SRM, které také stabilizují nanočástice v nevodných médiích. Po syntéze jsou tyto organické nanočástice potažené SRM ochlazeny na okolní teplotu a následně "převedeny" na vodné prostředí s použitím jistých strategií – zapouzdření micel, výměny ligandu, silanizace a sestavení vrstvy po vrstvě. [1,4,63,64,65,66]

1.4 Terapie založená na nanočásticích a kontrolované uvolnění

Pravděpodobně nejvíce univerzální aplikace nanočástic v medicíně určená k léčbě onemocnění. Je to proto, že nanočástice mají několik výhod, které jim pomáhají překonat

hlavní nevýhody, kterým čelí konvenční terapie – špatná biologická dostupnost, nedostatečná cílová specifická a významné vedlejší účinky. Zprvu nanočástice používané v terapii zahrnovaly inertní nanomateriály, které sloužily jako nosiče molekuly léku pro lepší podání a terapeutický výsledek. Mezi tyto léky patří konvenční chemoterapeutika, imunosupresiva, antibiotika, anestetika, steroidy, léky proti bolesti, vakcíny apod. S rozvojem výzkumu nanočástic v biomedicínské oblasti byly vyvinuty novější nanočástice, které by samy mohly působit jako "léčiva" díky jejich jedinečné povrchové energii a fyzikálním vlastnostem. Toto vedlo k vývoji nových terapií, které dosud byly v medicíně bezprecedentní. Při současném zdokonalování v zobrazovacích modalitách zahrnujících nanočástice se objevily koncepty jako multimodalita, kombinovaná terapie, theranostika a terapie založené na obrazu. Nanoterapie také ukázala být velmi slibnou v doplňování tradičních terapeutických cestách, jako jsou chirurgie, chemoterapie a radiační terapie. [4]

1.4.1. Nanofarmakoterapie

Nanofarmakoterapie se zabývá bezpečným, vhodným a ekonomickým využitím léčiv u pacientů. Má potenciál optimalizovat účinnost léků a zároveň minimalizovat vedlejší účinky, čímž se dramaticky zlepšují výsledky v oblasti zdraví. Důležité faktory ovlivňující nanofarmakoterapii jsou farmakokinetika (FK), která popisuje účinek biologického prostředí na léčiva a farmakodynamika (FD), která zahrnuje podrobnosti o účinku léčiva na cílené tkáně a buňky. Nanofarmakoterapie vedla k významnému zlepšení FK/ FD profilu léčiva. [4]

Nanočástice poskytují formulaci pro stabilní vodné disperze několika hydrofobních léčiv před podáním v těle. Nanoformulace hydrofobního léčiva zlepšuje jeho biodisperzi, čímž se zvýší účinnost léčiva. Uvnitř těla se všechny typy léků potýkají s enzymatickou degradací a také zachycováním retikuloendoteliálním systémem (RES). Podle vhodné velikosti, tvaru a vlastností povrchu nanočástic může být enzymatické degradaci a metabolismu RES lékové nanoformulace zabráněno. Tudiž FK profil léku lze významně zlepšit vylepšením biokompatibility, doby cirkulace a biologické dostupnosti. Např. chemoterapeutický léčivý přípravek Paclitaxel použitý v nanoenkapsulované formě vykazuje zvýšenou absorpci do systémového oběhu, což vede ke zvýšení biologické dostupnosti. [4,67]

Formulace nanočástic může příznivě ovlivnit FD profil léku zvýšením lokální koncentrace za použití cílového specifického podání do postižené části. V závislosti na rozsahu lokalizace léku na cílovou oblast je cílení rozděleno na (a) cílení první řádu, tj. na cílení na konkrétní tkáň, (b) druhého řádu, tj. zaměření na konkrétní typ buňky a (c) třetího

řádu, tj. cílení na určité organely uvnitř buňky. Cílení lze dosáhnout pasivním mechanismem, kdy je zvýšený efekt propustnosti a retence (EPR), který je spojen s nádorovými tkáněmi a vede

ke zlepšení distribuce cirkulujících nanočástic do nádorových tkání. Efekt EPR se týká vlastností, kterými jsou určeny jisté velikosti molekul, jež mají tendenci se hromadit v nádorové tkáni mnohem víc, než v normálních tkáních. Tento režim cílení je omezen na rakovinná a zánětlivá místa a může dosáhnout maximální přesnosti cílení druhého řádu. Další režim cílení, tj. aktivní cílení, se opírá o specifitu vhodně povrchově modifikovaných nanočástic pro receptory vyjádřené na cílových buňkách / tkáních. Tento režim cílení není aplikovatelný pro všechny kategorie nemocí, ale může dosáhnout přesnosti cílení třetího řádu např. uvnitř jádra buňky pomocí nanočástic označených jako jaderné lokalizační peptidy. [4,68,69,70]

Jedinečná výhoda, kterou nabízí nanočástice, je jejich schopnost uvolňovat léčiva kontrolovaným způsobem. "Controlled release" je termín, který naznačuje v názvu vliv, který mohou nanočástice projevit při uvolnění vzorku přenášeného léčivem. Zahrnují trvalé uvolňování, stimulačně citlivé uvolňování a externě aktivované uvolnění. Tyto vzory uvolnění jsou řízeny interakcí nanočástic s jejich okolím. Trvalé uvolňování znamená časově závislé vydání zachycených léčiv z jejich nanonosičů do okolí. Uvolnění se obvykle odehrává delší dobu, avšak v některých případech dochází k počátečnímu "vzplanutí". Docházet může k trvalému uvolňování z obou biologicky rozložitelných a biologicky nerozložitelných nanonosičů. Když jsou nosiče biologicky odbouratelné, molekuly léku jsou uvolňovány, jakmile se nosná matrix rozpadne časově závislým způsobem. Nanočástice biologicky rozložitelných polymerů, jako jsou polyestery a některé anorganické materiály, např. vápník a fosfáty, jsou příklady takových nosičů. Na druhé straně, pokud jsou nosiče nerozložitelné, molekuly léku mohou být uvolněny pomalou difúzí přes prázdné prostory nebo kanály nosnou matrix. Jedním z hlavních nedostatků systému s prodlouženým uvolňováním je, že uvolnění není specifické pro cílovou lokalitu. Pro zajištění optimálního uvolnění léčiva na cíl byly vyvinuty různé systémy "nanočástic reagující na stimul" dodávání léků." [4,17,71,72,73]

1.4.2. Nanoterapie

Koncept lékového dodání zahrnuje začlenění léčiva do nanočástic nosičů prostřednictvím enkapsulace, absorpce, adsorpce nebo konjugace, pro bezpečné a stabilní podání v těle. V literatuře jsou označovány jako „nano-particulate drug delivery systems (nano-DDS)“. Kromě zvýšené dodávky a řízeného uvolňování na cílových místech, DDS také

pomáhá překonat multilékový rezistentní (MDR) účinek vykazovaný rakovinnými a jinými nemocnými buňkami. Konečně, nano-DDS umožňuje začlenění směsi léčiv směřujících ke kombinované léčbě složitých onemocnění, jako je rakovina, kde jediný lék je z velké části neúčinný. Ačkoli se počáteční zprávy o doručování léčiv výlučně točily okolo hydrofobních malých molekul léků, časem se zjistilo, že tato technika může být rozšířena na hydrofilní a makromolekulární léčiva, jako jsou peptidy, proteiny a DNA. Použité nanočástice byly většinou na bázi lipidů a polymerů, ačkoli v poslední době jsou využívány spíše ty na bázi uhlíku a porézní anorganické nanostruktury. Prvotní zprávy o podávání léků obsahovaly liposomální formulace, které se samy sestavily tak, aby zapouzdrily lipofilní protinádorová léčiva, jako jsou taxany, doxorubicin a camptothecin. [4,74]

Několik polymerních nanoformulací, jako jsou PEGylované PLGA nanočástice, polymerní hydrogely, blokové kopolymerní micely, nanočástice na bázi chitosanu a další, byly testovány pro zlepšené dostupnosti léčiv v organismu. Genexol-PM je polymerní micelární formulace, která byla schválena pro klinické použití při léčbě rozsáhlých nádorů. Stejně jako Doxil, Genexol-PM je také PEGylovaný nanomateriál, který se zaměřuje na nádory s použitím pasivního mechanismu cílení. Množství polymerních nanoformulací je v současné době v klinickém vývoji a zahrnují jak pasivní cílené, tak i aktivní cílené nanoformulace. Další pozoruhodné neliposomální léčiva zahrnující nanočástice je Abraxan, který byl schválen pro klinickou léčbu nádorů v roce 2005. Obsahuje paclitaxel v albuminových nanočásticích, které cíleně ovlivňují nádory přes albuminové receptory nadměrně exprimované na nádorových buňkách. [75,76]

Anorganické částice obsahují poměrně velké porézní nanostruktury (velikost nad 100 nm), které mají vnitřní póry a kanály, jež mohou být použity pro hostitelské molekuly léku. Mezoporézní nanočástice na bázi oxidu křemičitého (MSN) a velké porézní křemíkové nanočástice jsou významnými příklady takových nanonosičů. Jiné jsou menší nanočástice (průměr menší než 20 nm), které mohou do svého povrchu vmezeřit léky absorpcí, adsorpcí nebo konjugací. Zahrnují polovodičové nanočástice (kvantové tečky), nanočástice zlata, nanočástice oxidů železa, apod. Hlavní výhodou těchto struktur spočívá v tom, že mohou působit synergicky s jinými terapeutickými nebo diagnostickými přípravky pro kombinovanou léčbu nebo theranostické aplikace. Navzdory nedávným četným publikacím v této oblasti, žádné anorganické nanočásticové formulace dodávání léků dosud nepokročily do stádia klinického hodnocení. [4,77,78]

1.4.3. Antimikrobiální terapie

Kovové nanočástice, jako je zlato, stříbro a platina, jsou díky jejich vysoké povrchové energii dobře známy svou toxicitou směrem k řadě patogenních mikrobů, jako jsou bakterie, houby, viry apod. Nejoblíbenější mezi kovy je stříbro, kde Ag^+ ionty silně inhibují mikrobiální růst potlačením mikrobiálních genů, respiračních enzymů a přenosu komponentů elektronů. Například topická antimikrobiální terapie s použitím krému se stříbrem je důležitou strategií při léčbě popálenin díky schopnosti řídit kolonizaci a proliferaci nosokomiálních patogenů odolných vůči více léčivům (např. *Pseudomonas aeruginosa*, meticilin-rezistentní stafylokoky, vankomycin-rezistentní enterokoky). V důsledku toho antimikrobiální léčba založená na stříbru slibuje výrazné snížení infekce ran, které jsou hlavním zdrojem úmrtnosti (více než 50%) u pacientů s popáleninami. Použití kovových nanočástic (Ag) pro antimikrobiální terapii může přinést řadu příznivých účinků. Patří mezi ně například multiúrovňová antibakteriální schopnost snížit pravděpodobnost vývoje rezistence, účinnost vůči multidrogově odolným organismům a nízká systémová toxicita. Navíc jejich antibakteriální efektivita byla zjištěna pro grampozitivní i gramnegativní bakterie. [1,79,80]

1.5 Fyzikálně chemická kontrola toxicity nanočástic

Toxikologické mechanismy se spouštějí různými fyzikálními a chemickými parametry nanočástic. Tyto parametry zahrnují jejich velikost, tvar, chemické složení a povrchové vlastnosti (náboj a reaktivita), které diktuji chování a osud nanočástic v biologickém systému. [4]

1.5.1. Povrch nanočástic

Jelikož nanočástice mají vysoký poměr povrchu k objemu, mají také značnou plochu při jejich velikosti. Chemie povrchů nanočástic je nejuniverzálnější platformou, která řídí jejich chování v biologickém prostředí. Toto chování zahrnuje agregaci, imunogenicitu, biochemickou reaktivitu, farmakodynamiku, biodistribuci, vstup buněk a intracelulární lokalizaci, biologickou odbouratelnost, vylučování apod., které mají přímý účinek na jejich toxikologický profil. Vysoká povrchová energie nanočástic je ve srovnání s jejich objemovými protějšky jedna z primárních příčin toxicity nanočástic. Taková povrchová reaktivita může být "uhašena" modifikací jejich povrchu pomocí různých molekul obsahujících alespoň jeden reaktivní konec, který může kotvit na povrchu nanočástic kovalentní nebo nekovalentní interakcí. Takové molekuly jsou tříděny na malé povrchové

ligandy, polymery a lipidy. Výběr z kotvící skupiny se může lišit v závislosti na chemickém složení nanočástic, které definují vazebná místa přítomná na povrchu nanočástic. Například, zatímco u thiolů, disulfidů, fosfinů a aminů je známo, že kotví k povrchu QD a nanočástic vzácných kovů, fosfonové kyseliny a karboxylové kyseliny se vážou na povrchy nanočástice oxidu kovu. Povaha a síla takové modifikace povrchu je velmi důležitá z toxikologického hlediska, jako vhodný povlak brání nanočásticím se agregovat, jakož i vyluhování volných iontů z biologicky odbouratelných nanočástic. Molekuly s více reaktivními konci jsou preferovány pro silnější interakci s nanočásticemi prostřednictvím více než jednoho kotevního místa. Další užitečná strategie úpravy povrchu využívá výhody hydrofobicity povrchu nanočástic, jako jsou kvantové tečky a uhlíkové nanotrubičky. Blokované kopolymery s hydrofilními- hydrofobními bloky jsou molekuly podobné povrchově aktivním činidlům, které se samy sestavují ve vodě jako polymerní micely. Tyto micely mohou zapouzdřovat hydrofobní nanočástice v jejich nepolárním jádře, s hydrofilními konci rozprostírajícími se ve vodném prostředí. [57,63,64,65,81]

Nedávno bylo zjištěno, že biokonjugáty hydrofilních polymerů s fosfolipidy vytvářejí stabilní "fosfolipidové micely" ve vodném roztoku s vysokou afinitou zapouzdření hydrofobních nanočástic. Příkladem jsou PEG-fosfatidylethanolamin (PEG-PE) a PEG-fosfatidylcholin (PEG-PC). Molekuly povrchového modifikátoru jsou voleny tak, že kromě jejich ukotvení nebo zapouzdřovací funkce, tvoří také částice stabilně dispergované ve vodních systémech. Dvě takové prominentní strategie, které byly použity k tomu, aby byly stabilní vodnou disperzí QD, jsou thiolované-PEG a merkaptooctová kyselina. Další volné reaktivní skupiny mohou být kationtové (například aminy), aniontové (např. karboxylové kyseliny, sulfonové kyseliny) apod., v závislosti na zamýšlené aplikaci. Jsou velmi užitečné pro další biokonjugace s požadovaným bio- rozpoznáním a/ nebo jinou aktivní látkou pro cílenou dodávku léků. Tyto volné reaktivní skupiny však mohou vést k toxicitě. Například nanočástice s vysokým kationtovým povrchovým nábojem silně interagují s aniontovými funkčními skupinami buněčných membrán a způsobují rozsáhlé poškození membrán, často zahrnující lipidovou peroxidaci. Ultra malé nanočástice s kationtovým nábojem mohou proniknout přes jaderný obal a elektrostaticky interagovat s negativně nabitou DNA, což vede k zásahu do genové exprese. Proto, aby se zabránilo toxicitě povrchově upravených nanočástic, měly by být pečlivě zpracovány protokoly biokonjugace. Potom nedojde k uvolnění libovolné reaktivní skupiny na povrch nanočástic. [63,81,82,83]

1.5.2. Rozměry nanočástic

Velikost a tvar určuje několik vlastností nanočástic v biologickém prostředí, které mají přímý nebo nepřímý dopad na nanotoxicitu. Tyto atributy zahrnují jejich potenciál vyhnout se detekci imunitním systémem a volné cirkulaci v těle, infiltrovat různé tkáně, buňky a subcelulární struktury; cestovat přes biologické bariéry, vyloučit se z těla apod. [4,63]

Systémově dodávané nanočástice menších rozměrů *in vivo* mohou biodistribuuovat způsobem vedoucím k jejich nežádoucí akumulaci a prodloužené perzistenci v citlivých orgánech, jako jsou mozek a plíce. Dlouhodobé přetrvávání nanomateriálů v těle je důvodem k obavám, neboť mohou bránit nezbytným fyziologickým dějům. Jednou ze strategií, jak se vyhnout tomuto problému, je chemicky konjugovat povrch velmi malých nanočástic s většími, biologicky odbouratelnými polymery tak, aby se zvýšila celková hydrodynamická velikost. Jakmile dochází k zacílení do postižených míst, polymerní vrstva degraduje, aby uvolnila menší nanočástice. [4]

1.5.3. Složení nanočástic

Chemické složení jádra nanočástic z velké části určuje jejich potenciální biologickou rozložitelnost a povahu degradovaných fragmentů. Například polymerní nanočástice s heteroatomem (-C-X-) jsou snadno hydrolyzovatelné a tudíž biologicky odbouratelné ve srovnání s (C-C-), které mají pouze uhlík. Kvantové tečky skupiny II-VI (např. CdSe, CdTe) jsou vázány společně iontovými vazbami a proto jsou náchylnější k degradaci, než kvantové tečky skupiny III-V (např. InP, GaAs), obsahující kovalentní vazby. Přesto by byla biologická rozložitelnost prospěšná pro jejich eliminaci prostřednictvím renálních, nebo jiných výstupních cest, vzhledem k menší velikosti fragmentů. Fragmenty mohou vyvíjet neznámou toxicitu v jejich neporušené formě. [4,17]

Polylaktid-ko-glykolid (PLGA) je jedním z prvních polymerů schválených FDA pro určité klinické aplikace vzhledem k jeho biologické rozložitelnosti do metabolizovatelných fragmentů (kyselina mléčná a kyselina glykolová). Tyto fragmenty jsou však známé tím, že způsobují lokální kyselost a zánět, což vede k mírné až těžké toxicitě. Závažnější forma toxicity může vyplynout z degradace kvantových teček II-VI, kde jsou toxické a karcinogenní ionty těžkých kovů (Cd^{2+} a Pb^{2+}) uvolňovány do biologického systému. [4,59,84,85]

Vyluhování toxických iontů lze zabránit potažením nanočástic s anorganickými nebo polymerními vrstvami. Potažování povrchu nanočástic CdSe monovrstvou ZnS

nebo dvojvrstvou CdS/ ZnS vede ke snížení uvolňování iontů Cd²⁺. Prevence eroze matrix také závisí na typu potahového materiálu. Citrátem potažené nanočástice oxidu železa produkují rychlejší indukci ROS, ve srovnání s jinými potahovacími látkami, jako jsou lipidy nebo dextran. Kinetika závisí na druhu povrchového povlaku na nanočásticích. Vhodná povrchová úprava může zabránit biodegradaci nanočástic, které si nejen zachovávají přirozené vlastnosti nanočástic, ale mohou zabránit také toxicitě vyluhování toxických iontů. [86,87,88,89]

2. Experimentální část

2.1. Použité přístroje

Analytické váhy KERN AES, max. 220g, d=0,1mg

Váhy KERN 440-35, max. 400g, d=0,01g

Váhy KERN 1200-2, max. 1210g, d=0,01g

Magnetická míchačka IKA-WERKE RT, 100-1000 ot./min.

Malvern Zetasaier ZS 90

Vakuová sušárna BINDER

2.2. Použité chemikálie

P1- polymer odvozený od kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) původní struktury, KTF FaF UK HK

P2- polymer odvozený od kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) původní struktury, KTF FaF UK HK

DMSO- Dimethylsulfoxid, Penta Chrudim

Aceton, Penta Chrudim

Aqua purificata, KFT FaF UK HK

BT- Báze terbinafinu připravena alkalizací vodného roztoku hydrochloridu a filtrací sraženiny, KFT FaF UK HK

Cetrimid (N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid), Merck SRN

POLOX- Poloxamer 407, Sigma-Aldrich

TGB- Tegobetain 30%,

DS- Disodium kokamido ampho acetate 50%, Acetrade Ústí nad Orlicí

EMAL 270-Sodium laureth sulfate 70%, Lachner Neratovice

Dodekahydrát chloridu hořečnatého, Dr.Kulich

Citrát-fosfátový pufr, KFT FaF UK HK

Vodný roztok amoniaku, Lachner Neratovice

2.3. Postup přípravy a měření vzorků

2.3.1. Příprava báze terbinafinu

Na analytických vahách se navážilo do kádinky 20g terbinafinu. Ke 20g terbinafinu v kádince se dolila destilovaná voda do 4000g. Roztok se zahříval pro snadnější rozpuštění terbinafinu a po rozpuštění se přidával roztok amoniaku do pH 7-8 (pH bylo kontrolováno pomocí indikačních papírků). Poté se terbinafin nechal vysrážet přes noc. Další den se půl procentní báze terbinafinu přefiltrovala a nechala se vysušit ve vakuové sušárně.

2.3.2. Příprava vnější fáze

Na analytických vahách se navážilo do 100ml kádinky potřebné množství emulgátoru a rozpustilo se v pufru, vodě, roztoku pufru s vodou v různých poměrech nebo roztoku chloridu hořečnatého. Jako emulgátor byly použity Cetrimid, DS, TGB, POLOX 407 nebo EMAL 270 v koncentracích 0,025-2%. Složení vnější fáze je konkrétně popsáno v tabulce složení vzorků.

2.3.3. Příprava vnitřní fáze

Na analytických vahách se navážilo do kádinky dané množství polymeru P1 nebo P2 a za stálého míchání a použití ultrazvuku se rozpustilo v daném množství organického rozpouštědla DMSO nebo Acetonu. Připravily se 1 nebo 3% vzorky polymeru v rozpouštědle. Do vybraných vzorků se navážila báze terbinafinu v koncentraci 10 nebo 30%. Konkrétní složení vnitřní fáze je popsáno v tabulce složení vzorků.

2.3.4. Příprava nanočástic

Příprava nanočástic se prováděla tak, že se vnitřní fáze za stálého míchání nalila do vnější fáze. Přilévání probíhalo po kapkách nebo naráz. Míchání se provádělo pomocí míchadla a magnetické míchačky. Míchadlo se předem umístilo do kádinky s vnější fází. Pracovalo se s různým množstvím vzorku od 2 do 100g. Emulze se takto míchala minimálně 45 minut. Po uplynutí tohoto času se měřila velikost částic a zeta potenciálu pomocí přístroje Zetasaizer ZS. Vybrané vzorky se měřili další den znovu.

Tab.1 : Složení emulzních soustav

Množství vzorku	Emulzní soustava	Vnější fáze	Vnitřní fáze
2g	10%	1,8g	0,2g
6g	10%	5,4g	0,6g
10g	5%	9,5g	0,5g
15g	10%	13,5g	1,5g
25g	5%	23,75g	1,25g
25g	10%	22,5g	2,5g
25g	15%	21,25g	3,75g
25g	20%	20,0g	5,0g
25g	25%	18,75g	6,25g
25g	30%	17,5g	7,5g
100g	10%	90g	10g

Tab.2 :Postup přípravy

Označení přípravy	Postup
1	45 min na magnetické míchačce
2	60 min na magnetické míchačce
3	1 den na magnetické míchačce
A	přilítí vnější fáze naráz
B	přikapávání vnější fáze po kapkách

2.3.5. Měření velikosti a zeta potenciálu částic

Přístroj se zapnul vždy alespoň 30 minut před měřením, aby se kalibroval. Teplota pro měření byla vždy kalibrována na 25°C. Pro měření velikosti částic se vzorek umístil do speciálních jednorázových kyvet, které se plnily do předurčené výšky. Poté se vložily do Zetasizeru a provedlo se měření.

Pro měření zeta potenciálu se používala složená kapilární cela DTS1070. Do této speciální kyvety se vzorek aplikoval injekční stříkačkou. Kyveta se plnila pomalu aby nedošlo ke vzniku bublin, po naplnění se kyveta uzavřela zátkami na obou koncích. Poté se vzorek vložil do zetasizeru a provedlo se měření. Po každém měření se kyveta propláchl vodou a měřeným vzorkem. K vyhodnocení výsledků se používal počítač propojený s přístrojem.

Zeta potenciál se měřil vždy třikrát. U vybraných vzorků se měření opakovalo další den znovu a sledovalo se, zda jsou nanočástice stabilní, nebo zda dochází k nějakým změnám. Mohlo by dojít ke změně velikosti bobtnáním, rozpadem či shlukováním částic.

3. Výsledky

Tab. 3a: Složení 25g vzorků 1-8, připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	P1 [%]	Emulze s DMSO [%]	TB [%]
1	1	10	0
2	1	10	10
3	3	10	0
4	3	10	30
5	1	30	0
6	1	30	10
7	3	30	0
8	3	30	30

Tab. 3b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
1	52,40	0,089	57,47	0	0	100	0	0
2	34,95	0,218	40,45	5163	0	98,6	1,4	0
3	77,65	0,083	84,93	0	0	100	0	0
4	167,3	0,741	132,4	1956	37,71	52,6	41,3	6,1
5	76,11	0,093	85,04	0	0	100	0	0
6	47,27	0,196	49,19	0	0	100	0	0
7	111,4	0,092	123,9	0	0	100	0	0
8	202,2	0,566	160,9	2976	0	67,5	32,5	0

Tab. 4a: Složení 25g vzorků 9-16 (Emulgátor Cetrimid 0,8%), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	P1 [%]	Emulze s DMSO [%]	TB [%]
9	1	10	0
10	1	10	10
11	3	10	0
12	3	10	30
13	1	30	0
14	1	30	10
15	3	30	0
16	3	30	30

Tab. 4b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
9	134,0	0,118	153,6	0	100	0
10	132,7	0,169	162,6	0	100	0
11	165,6	0,084	183,2	0	100	0
12	249,9	0,314	277,9	5219	97,3	2,7
13	190,0	0,088	208,7	0	100	0
14	157,2	0,116	177,3	0	100	0
15	232,6	0,080	253,6	0	100	0
16	295,7	0,197	308,9	5031	97,4	2,6

Tab. 5a: Složení 25g vzorků 17-24, připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	P1 [%]	Emulze s DMSO [%]	TB [%]
17	1	10	0
18	1	10	10
19	3	10	0
20	3	10	30
21	1	30	0
22	1	30	10
23	3	30	0
24	3	30	30

Tab. 5b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
17	52,42	0,109	59,21	0	100	0
18	34,53	0,192	40,10	4983	98,8	1,2
19	78,01	0,068	83,85	0	100	0
20	163,6	0,676	160,4	4273	73,3	26,7
21	77,53	0,101	86,99	0	100	0
22	106,9	0,103	117,8	0	100	0
23	115,1	0,063	125,1	0	100	0
24	Neměřitelné	-	-	-	-	-

Tab. 6a: Složení 25g vzorků 25-32 (Emulgátor Cetrimid 0,8%), připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	P1 [%]	Emulze s DMSO [%]	TB [%]
25	1	10	0
26	1	10	10
27	3	10	0
28	3	10	30
29	1	30	0
30	1	30	10
31	3	30	0
32	3	30	30

Tab. 6b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
25	134,0	0,095	150,6	0	100	0
26	109,4	0,201	138,9	0	100	0
27	163,7	0,100	181,5	0	100	0
28	219,7	0,316	238,4	4694	93,6	6,4
29	191,6	0,136	222,2	0	100	0
30	161,1	0,146	190,9	0	100	0
31	233,1	0,095	260,9	0	100	0
32	303,6	0,236	312,4	4887	95,5	4,5

Tab. 7a: Složení 25g vzorků 33-42 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	Emulgátor
33	CET 0,025 %
34	CET 0,2 %
35	TGB 0,025 %
36	TGB 0,2 %
37	DS 0,025 %
38	DS 0,2 %
39	POLOX 0,025 %
40	POLOX 0,2 %
41	EMAL 0,025%
42	EMAL 0,2 %

Tab. 7b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (0,025% nebo 0,2%) a druhu emulgátoru(CET, TB, DS, POLO nebo EMAL) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
33	205,6	0,162	221,2	4839	98,0	2,0
34	181,5	0,125	204,2	0	100	0
35	76,80	0,101	85,57	0	100	0
36	121,2	0,186	153,4	0	100	0
37	85,05	0,076	93,17	0	100	0
38	30,70	0,247	37,02	4808	97,8	2,2
39	89,98	0,111	101,3	0	100	0
40	91,40	0,089	101,8	0	100	0
41	80,60	0,090	89,0	0	100	0
42	93,72	0,107	106,1	0	100	0

Tab. 8a: Složení 25g vzorků 43-52 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	Emulgátor
43	CET 0,025 %
44	CET 0,2 %
45	TGB 0,025 %
46	TGB 0,2 %
47	DS 0,025 %
48	DS 0,2 %
49	POLOX 0,025 %
50	POLOX 0,2 %
51	EMAL 0,025%
52	EMAL 0,2 %

Tab. 8b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (0,025% nebo 0,2%) a druhu emulgátoru(CET, TB, DS, POLO nebo EMAL) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
43	210,2	0,150	229,7	5076	99,0	1,0
44	184,8	0,100	208,1	0	100	0
45	78,97	0,092	87,63	0	100	0
46	123,3	0,170	150,7	0	100	0
47	87,09	0,108	98,89	0	100	0
48	28,19	0,233	35,72	0	100	0
49	92,97	0,104	104,6	0	100	0
50	93,99	0,078	102,6	0	100	0
51	81,49	0,103	90,77	0	100	0
52	94,05	0,110	106,3	0	100	0

Tab. 9a: Složení vzorků 53-66 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO)

Vzorek č.	Hmotnost vzorku [g]	Příprava vzorku
53	100	1B
54	100	1B
55	100	1A
56	100	1A
57	25	1B
58	25	1B
59	6	1B
60	6	1B
61	6	1A
62	6	1A
63	2	1B
64	2	1B
65	2	1A
66	2	1A

Tab. 9b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2, 6, 25 nebo 100ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
53	73,44	0,113	83,83
54	70,02	0,118	80,47
55	50,83	0,093	56,43
56	51,67	0,088	57,00
57	69,02	0,108	77,50
58	70,19	0,084	77,38
59	70,07	0,101	78,84
60	72,31	0,093	80,20
61	65,84	0,074	71,22
62	60,07	0,118	68,72
63	64,84	0,060	69,40
64	61,84	0,089	68,42
65	59,99	0,074	65,53
66	61,44	0,082	67,84

Tab. 10a: Složení vzorků 125-132 (Polymer 1% P2, 10% emulze s DMSO)

Vzorek č.	Hmotnost vzorku [g]	Příprava vzorku
125	6	2B
126	6	2B
127	6	2A
128	6	2A
129	2	2B
130	2	2B
131	2	2A
132	2	2A

Tab. 10b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2 nebo 6 ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
125	90,91	0,181	112,5	0	100	0
126	89,21	0,175	109,7	0	100	0
127	57,16	0,124	65,71	0	100	0
128	55,46	0,105	62,96	0	100	0
129	58,83	0,130	66,68	0	100	0
130	63,20	0,147	70,45	4740	98,9	1,1
131	57,34	0,103	64,53	0	100	0
132	61,59	0,149	68,38	4757	98,8	1,2

Tab. 11a: Složení vzorků 145-152 (Polymer 1% P2, 10% emulze s DMSO)

Vzorek č.	Hmotnost vzorku [g]	Příprava vzorku
145	6	3B
146	6	3B
147	6	3A
148	6	3A
149	2	3B
150	2	3B
151	2	3A
152	2	3A

Tab. 11b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2 nebo 6 ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
145	93,49	0,176	116,9
146	94,24	0,190	120,8
147	58,92	0,111	66,00
148	57,61	0,114	65,69
149	64,03	0,139	72,92
150	65,17	0,144	73,48
151	60,49	0,112	68,58
152	65,42	0,118	71,32

Tab. 12a: Složení vzorků 67-80 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO)

Vzorek č.	Hmotnost vzorku [g]	Příprava vzorku
67	100	3B
68	100	3B
69	100	3A
70	100	3A
71	25	3B
72	25	3B
73	6	3B
74	6	3B
75	6	3A
76	6	3A
77	2	3B
78	2	3B
79	2	3A
80	2	3A

Tab. 12b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2, 6, 25 nebo 100ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
67	74,26	0,098	83,16
68	73,60	0,099	81,88
69	51,78	0,075	56,03
70	52,57	0,096	58,22
71	70,26	0,071	76,48
72	70,89	0,080	77,01
73	71,94	0,081	79,67
74	72,48	0,087	80,12
75	63,28	0,089	69,01
76	61,45	0,095	67,70
77	65,95	0,068	71,87
78	63,21	0,080	69,99
79	61,29	0,077	67,44
80	62,57	0,090	68,53

Tab. 13a: Složení 15g vzorků 81-86 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	Emulgátor	pH
81	TGB 0,025 %	2,8
82	TGB 0,025 %	4,1
83	TGB 0,025 %	5,3
84	TGB 0,2 %	2,8
85	TGB 0,2 %	3,8
86	TGB 0,2 %	4,7

Tab. 13b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
81	221,3	0,150	251,8
82	63,57	0,065	67,78
83	60,94	0,081	66,22
84	224,7	0,076	264,5
85	141,7	0,142	156,9
86	95,66	0,143	111,7

Tab. 14a: Složení 15g vzorků 87-92 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	Emulgátor	pH
87	DS 0,025 %	2,9
88	DS 0,025 %	5,0
89	DS 0,025 %	7,1
90	DS 0,2 %	2,9
91	DS 0,2 %	5,0
92	DS 0,2 %	8,0

Tab. 14b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
87	781,4	0,225	803,8	0	100	0
88	57,07	0,094	62,99	0	100	0
89	54,68	0,096	60,82	0	100	0
90	195,7	0,427	47,76	201,9	55,5	44,5
91	51,88	0,116	58,98	0	100	0
92	37,41	0,245	44,25	4950	97,7	2,3

Tab. 15a: Složení 15g vzorků 93-98 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	Emulgátor	pH
93	TGB 0,025 %	2,8
94	TGB 0,025 %	4,1
95	TGB 0,025 %	5,3
96	TGB 0,2 %	2,8
97	TGB 0,2 %	3,8
98	TGB 0,2 %	4,7

Tab. 15b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
93	230,3	0,138	246,7
94	161,1	0,035	169,0
95	66,13	0,043	70,24
96	291,0	0,048	307,0
97	153,9	0,074	167,5
98	97,78	0,108	112,0

Tab. 16a: Složení 15g vzorků 99-104 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	Emulgátor	pH
99	DS 0,025 %	2,9
100	DS 0,025 %	5,0
101	DS 0,025 %	7,1
102	DS 0,2 %	2,9
103	DS 0,2 %	5,0
104	DS 0,2 %	8,0

Tab. 16b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
99	3449	1,000	848,4
100	58,92	0,117	62,73
101	57,09	0,111	64,83
102	71,40	0,406	82,56
103	52,58	0,121	60,52
104	28,48	0,266	29,48

Tab. 17a: Složení 15g vzorků 165-170 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 2A

Vzorek č.	Emulgátor	pH
165	TGB 0,025 %	2,8
166	TGB 0,025 %	4,1
167	TGB 0,025 %	5,3
168	TGB 0,2 %	2,8
169	TGB 0,2 %	3,8
170	TGB 0,2 %	4,7

Tab. 17b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025 nebo 0,2%) a pH vorku na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
165	872,3	1,00	268,3	6,808	0	94,9	5,1	0
166	5512	0,229	3180	5375	0	85,7	14,3	0
167	72,32	0,160	20,17	100,2	0	83,8	16,2	0
168	3202	0,544	3144	0	0	100	0	0
169	2341	0,008	2552	0	0	100	0	0
170	28,49	0,378	40,73	7,915	5191	88,2	10,4	1,4

Tab. 17c: Zeta potenciál

Vzorek č.	1.měření	2.měření	3.měření
165	1,89	2,41	2,69
166	25,2	26,2	25,7
167	10,8	13,8	12,9
168	-0,89	-1,10	-1,40
169	-8,89	-9,72	-10,1
170	-12,0	-11,7	-10,8

Tab. 18a: Složení 15g vzorků 171-176 (Polymer 1% P2, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	Emulgátor	pH
171	TGB 0,025 %	2,8
172	TGB 0,025 %	4,1
173	TGB 0,025 %	5,3
174	TGB 0,2 %	2,8
175	TGB 0,2 %	3,8
176	TGB 0,2 %	4,7

Tab. 18b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025 nebo 0,2%) a pH vorku na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
171	649,5	0,936	199,5	7,332	78,1	21,9
172	6425	0,714	955,4	0	100	0
173	148,9	0,214	20,38	206,2	85,5	14,5
174	1638	1,000	6,881	213,4	70,1	29,9
175	1160	0,543	1291	6,393	85,2	14,8
176	29,51	0,369	46,28	8,875	87,9	12,1

Tab. 19a: Složení 25g vzorků 105-110 (Polymer 1% P1), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	Emulze s DMSO [%]
105	5
106	10
107	15
108	20
109	25
110	30

Tab. 19b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
105	48,55	0,083	53,56
103	50,70	0,078	55,66
107	55,02	0,104	61,98
108	59,29	0,108	66,91
109	65,54	0,116	73,84
110	72,07	0,113	81,75

Tab. 20a: Složení 25g vzorků 111-116 (Polymer 3% P1), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	Emulze s DMSO [%]
111	5
112	10
113	15
114	20
115	25
116	30

Tab. 20b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
111	74,57	0,062	80,18
112	78,35	0,063	84,94
113	86,85	0,061	93,36
114	93,11	0,076	102,1
115	103,2	0,087	113,3
116	118,8	0,095	132,7

Tab. 21a: Složení 25g vzorků 133-138 (Polymer 1% P2), připravovaných metodou 2A

Vzorek č.	Emulze s DMSO [%]
133	5
134	10
135	15
136	20
137	25
138	30

Tab. 21b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
133	43,79	0,098	48,73
134	45,76	0,126	54,44
135	46,77	0,133	53,75
136	51,11	0,109	57,98
137	56,81	0,133	65,09
138	64,08	0,131	74,65

Tab. 21c: Zeta potenciál

Vzorek č.	1.měření [mV]	2.měření [mV]	3.měření [mV]
133	-35,0	-36,8	-39,3
135	-29,0	-28,5	-28,7
138	-16,3	-19,1	-19,8

Tab. 22a: Složení 25g vzorků 139-144 (Polymer 3% P2), připravovaných metodou 2A

Vzorek č.	Emulze s DMSO [%]
139	5
140	10
141	15
142	20
143	25
144	30

Tab. 22b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
139	63,89	0,076	69,90
140	66,34	0,097	4,06
141	73,05	0,086	80,21
142	76,67	0,113	87,42
143	86,15	0,111	96,91
144	101,7	0,122	117,0

Tab. 22c: Zeta potenciál

Vzorek č.	1.měření [mV]	2.měření [mV]	3.měření [mV]
139	-37,0	-39,2	-42,7
141	-26,4	-29,8	-26,5
144	-18,5	-17,9	-19,2

Tab. 23a: Složení 25g vzorků 153-158 (Polymer 1% P2), připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	Emulze s DMSO [%]
153	5
154	10
155	15
156	20
157	25
158	30

Tab. 23b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
153	46,00	0,105	51,82	0	100	0
154	49,66	0,173	53,87	4513	97,4	2,6
155	49,80	0,105	56,09	0	100	0
156	55,33	0,152	62,60	0	100	0
157	68,88	0,209	83,55	4310	98,1	1,9
158	65,16	0,130	72,52	0	100	0

Tab. 24a: Složení 25g vzorků 159-164 (Polymer 3% P2), připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	Emulze s DMSO [%]
159	5
160	10
161	15
162	20
163	25
164	30

Tab. 24b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
159	66,08	0,056	70,73
160	69,62	0,090	77,72
161	76,28	0,100	85,65
162	82,50	0,098	92,61
163	96,70	0,153	109,8
164	114,5	0,146	135,7

Tab. 25a: Složení 10g vzorků 117-120 (Polymer 3% P1, 5% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	Poměr MgCl ₂ :H ₂ O
117	3:1
118	1:1
119	1:3
120	1:8

Tab. 25b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv poměru složení vnější fáze (3:1, 1:1, 1:3 nebo 1:8) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
117	53,08	1,000	1018	0,7419	0	66,1	33,9	0
118	748,8	0,724	693,8	3927	0,7090	42,2	33,0	24,8
119	1201	0,943	269,5	0,6495	31,15	51,4	29,0	19,6
120	4688	1,000	977,2	0	0	100	0	0

Tab. 26a: Složení 10g vzorků 121-124 (Polymer 3% P1, 5% emulze s Acetonem), připravovaných metodou 1A

Vzorek č.	Poměr MgCl ₂ :H ₂ O
121	3:1
122	1:1
123	1:3
124	1:8

Tab. 26b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv poměru složení vnější fáze (3:1, 1:1, 1:3 nebo 1:8) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]
121	neměřitelné
122	neměřitelné
123	neměřitelné
124	neměřitelné

Tab. 27a: Složení 15g vzorků 177-182 (10% emulze s DMSO) , připravovaných metodou 2A

Vzorek č.	Polymer	pH
177	1% P2	2,8
178	1% P2	4,0
179	1% P2	5,0
180	1% P1	2,8
181	1% P1	4,0
182	1% P1	5,0

Tab. 27b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a pH pufru (2,8; 4,0 nebo 5,0) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
177	443,7	0,112	505,2	0	0	100	0	0
178	69,98	0,186	75,35	4981	0	98,1	1,9	0
179	38,47	0,358	34,48	198,9	5131	78,7	19,2	2,1
180	492,2	0,095	555,0	0	0	100	0	0
181	91,29	0,106	101,7	0	0	100	0	0
182	48,28	0,161	30,06	215,8	0	98,0	2,0	0

Tab. 28a: Složení 15g vzorků 193-196 (10% emulze s DMSO) , připravovaných metodou 3A

Vzorek č.	Polymer	pH
193	1% P2	4,0
194	1% P2	5,0
195	1% P1	4,0
196	1% P1	5,0

Tab. 28b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a pH pufru (4,0 nebo 5,0) na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
193	96,47	0,169	104,7	4821	0	98,1	1,9	0
194	35,54	0,284	36,99	358,7	4840	92,4	4,1	3,5
195	136,8	0,100	153,2	0	0	100	0	0
196	35,78	0,218	36,50	5064	0	97,1	2,9	0

Tab. 29a: Složení 15g vzorků 183-186, připravovaných metodou 2A, pH vzorku 5,0, koncentrace emulze 10%, použité rozpouštědlo DMSO

Vzorek č.	Polymer	Pufr : voda
183	1% P2	1:1
184	1% P2	1:2
185	1% P1	1:1
186	1% P1	1:2

Tab. 29b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a poměru složení vnější fáze na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
183	28,54	0,190	31,55	4088	96,8	3,2
184	29,71	0,213	33,18	4856	97,6	2,4
185	33,71	0,190	33,71	5263	98,7	1,3
186	35,44	0,249	35,01	0	100	0

Tab. 30a: Složení 15g vzorků 183-186 (10% emulze s DMSO, pH vzorku 5,0), připravovaných metodou 1B

Vzorek č.	Polymer	Pufr : voda
197	1% P2	1:1
198	1% P2	1:2
199	1% P1	1:1
200	1% P1	1:2

Tab. 30b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a poměru složení vnější fáze na velikost částic

Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]
197	27,82	0,198	30,50	5096	98,4	1,6
198	30,39	0,256	29,35	5388	98,1	1,9
199	38,53	0,156	38,53	0	100	0
200	36,12	0,220	37,86	4248	95,0	5,0

Tab. 31a: Složení 15g vzorků 187-192 (10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 2A

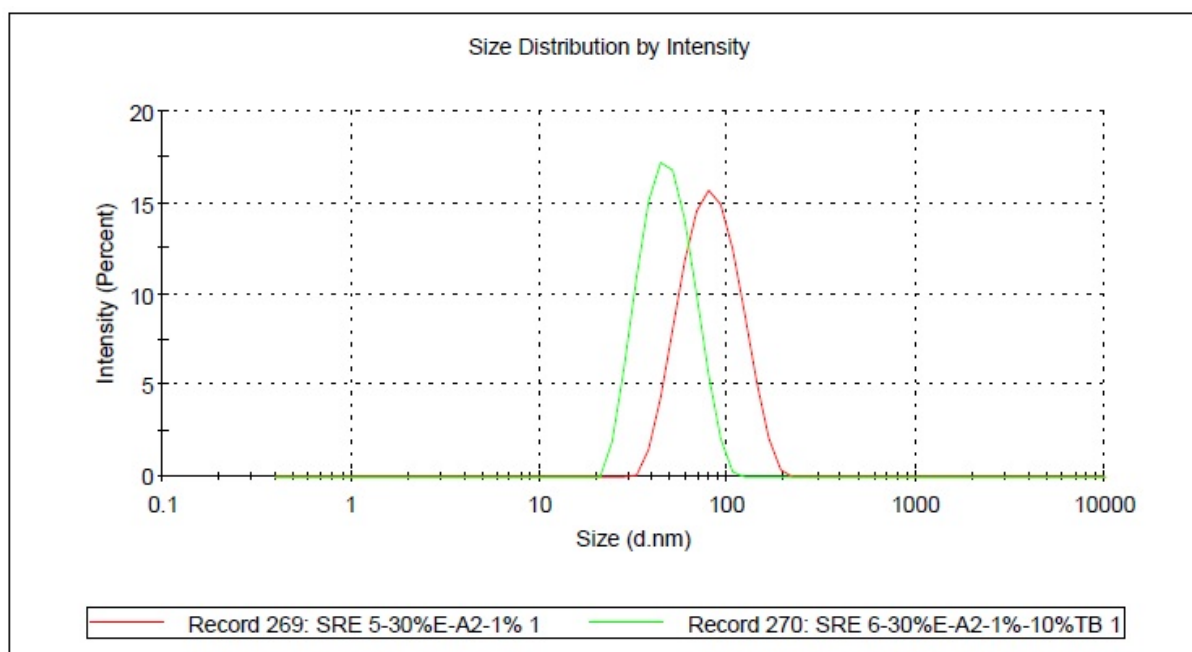
Vzorek č.	Polymer	pH
187	3% P1	5,0
188	5% P1	5,0
189	3% P1	4,0
190	5% P1	4,0
191	3% P2	5,0
192	3% P2	4,0

Tab. 31b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (3 nebo 5%) a druhu polymeru (P1 nebo P2) a pH vzorku na velikost částic

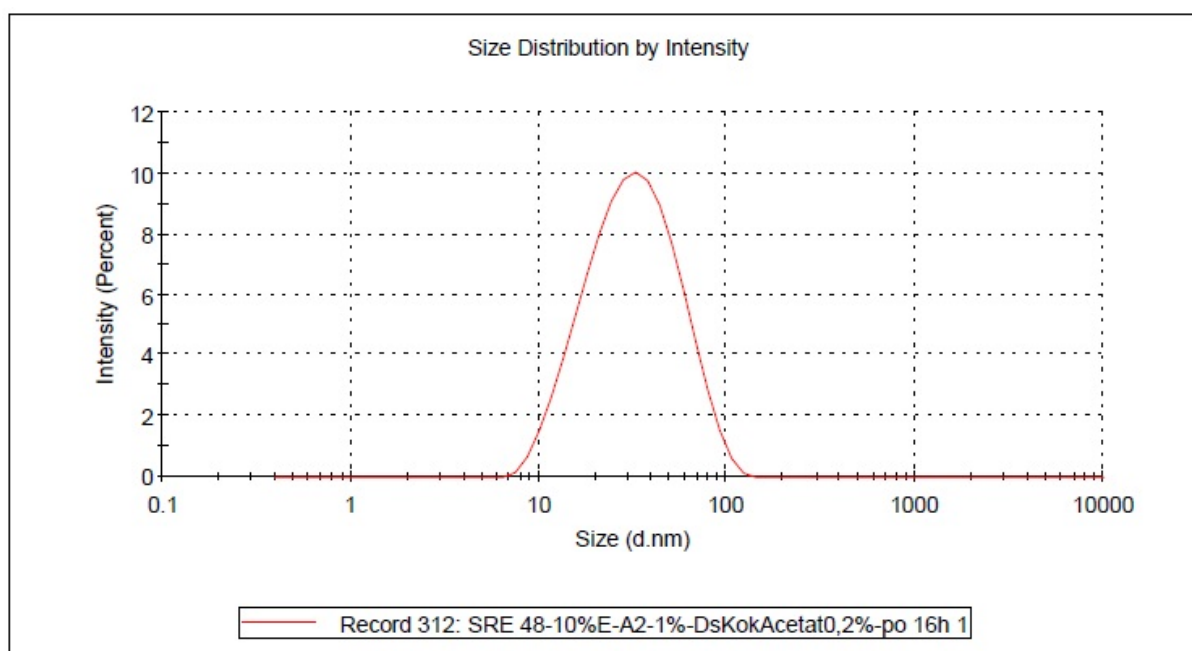
Vzorek č.	Z-Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]
187	64,82	0,120	70,38
188	98,84	0,101	109,4
189	113,2	0,050	120,8
190	131,8	0,062	142,4
191	72,91	0,204	93,65
192	74,76	0,100	83,44

4. Obrázky

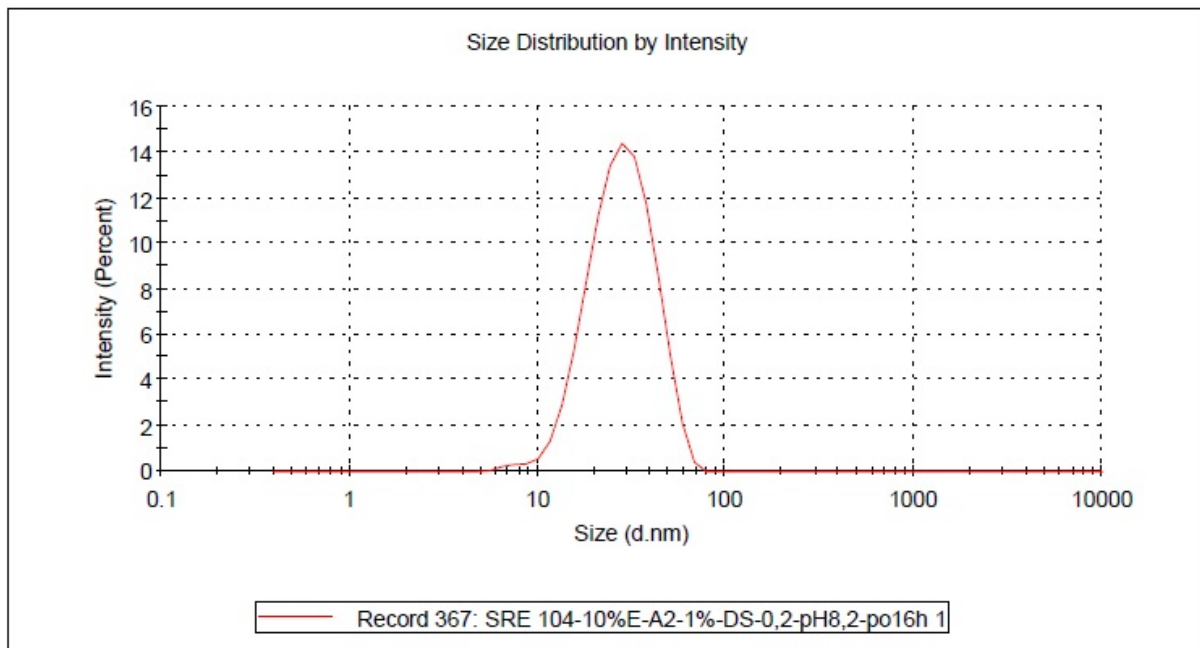
Obr.3 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1, 30% emulze, rozpouštědlo DMSO, bez baze terbinafinu a s 10% bazi terbinafinu)



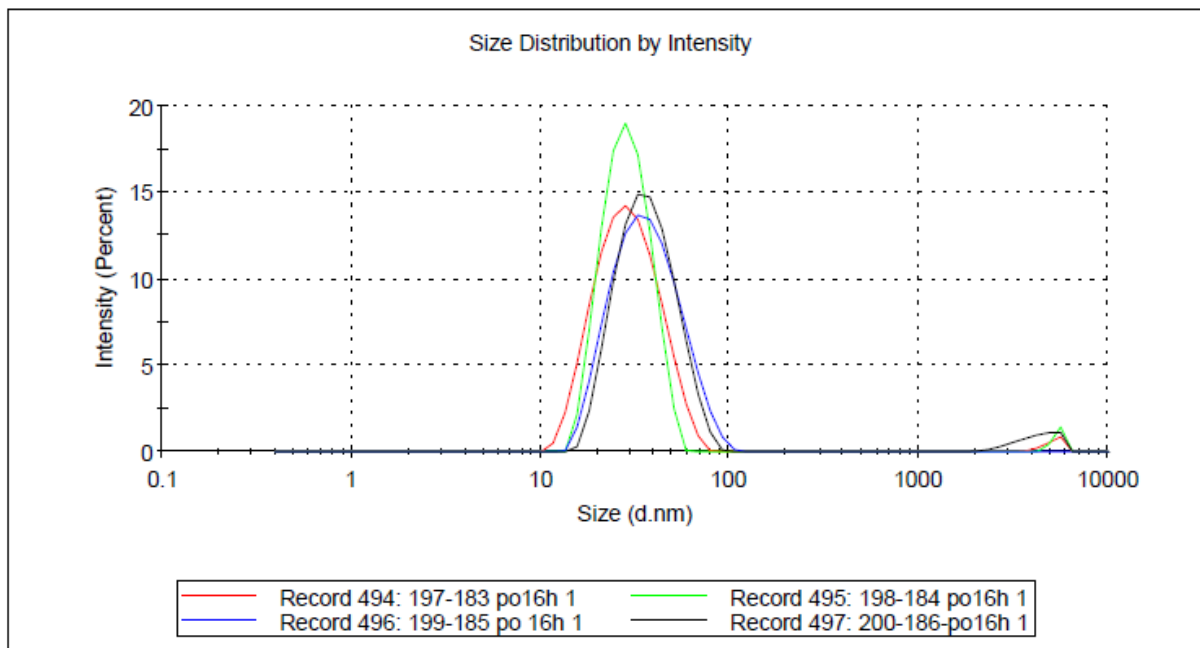
Obr.4 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1, 10% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor 0,2% DS)



Obr.5 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1, 10% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor 0,2% DS, pH 8,0)



Obr.6 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1 nebo P2, 10% emulze, rozpouštědlo DMSO, pH vzorku 5,0, podíl pufru a vody 1:1 nebo 1:2)



5. Diskuse

5.1 K tématu prezentované práce.

Předložená rigorózní práce byla vypracována v těsné návaznosti na řadu diplomových prací o nanočásticích prezentovaných pod vedením školitele v posledních dvaceti letech. Cílem bylo jednak ověřit některé nedostatečně jednoznačné výsledky, jednak tyto výsledky rozšířit z hlediska nových poznatků a potenciálních potřeb využití při formulaci terapeutických systémů s cílenou distribucí. Hlavními sledovanými parametry byla velikost nanočástic a jejich povrchový náboj.

Byla převzata dříve vypracovaná metoda převodu soli terbinafinu na jeho bazi. Vliv emulgátorů na parametry nanočástic byl studován na několika úrovních z hlediska jejich výběru a koncentrací. Jako rozpouštědla byly použity aceton a DMSO obsahující větvený kopolymer v 1% a 3% koncentraci.

Jako nový a z teoretického hlediska zajímavý aspekt byl zohledněn vliv rychlosti přidávání vnitřní fáze emulze do fáze vnější a vliv celkového množství studované soustavy. Stabilita velikostních a povrchových parametrů byla u některých vzorků hodnocena kromě doby 45 minut a 60 minut po přípravě opakovaně za 24 hodin.

5.2 Vliv koncentrace polymeru, koncentrace terbinafinu a koncentrace vnitřní fáze emulze na velikost nanočástic (2%; 4%)

Z výsledků měření uvedených v tabulkách 3a a 3b je patrný výrazný vliv koncentrace polymerní složky na velikost nanočástic. Pro stanovení vlivu terbinafinu není dostatečný počet vzorků. Není vyloučen vliv terbinafinu na vysoký podíl aglomerovaných částic s limitní měřitelnou velikostí kolem 3000 nm. Vliv koncentrace vnitřní fáze emulze nebyl prokázán. Nanočástice byly připraveny v soustavě bez tenzidu jednorázovým přísunem vnější fáze do vnitřní fáze.

5.3 Vliv koncentrace polymeru a koncentrace terbinafinu na velikost nanočástic s obsahem 0,8% cetrimidu ((2%; 4%)

Celkově větší nanočástice v soustavě s tenzidem jsou evidentní u všech vzorků v tab. 4 porovnávaných s analogickými z tab. 3 připravenými bez tenzidu. Kromě tohoto faktu je možno jako zajímavé pokládat nízké hodnoty polydisperzity vzorků s 30% koncentrací terbinafinu.

5.4 Vliv koncentrace polymeru a koncentrace terbinafinu na velikost nanočástic připravených rychlým jednorázovým přísunem vnější fáze do fáze vnitřní (2%; 4%)

Jedná se o stejnou soustavu jako v 5. 2 (Tab.3), ponechanou v klidu po dobu 24 hodin. V soustavě nebyl přítomen žádný tenzid. Hodnoty velikostního parametru byly prakticky stejné. Tuto skutečnost je možno pokládat za důkaz mimořádné stability nanočástic a přesnosti měření. Výjimkou je vzorek označený číslem 22 s více než dvojnásobnou hodnotou sledovaného parametru. V tomto případě se jednalo jednoznačně o chybnou hodnotu způsobenou patrně záměnou vzorků.

5.5 Vliv koncentrace polymeru a koncentrace terbinafinu na velikost nanočástic připravených za míchání magnetickou míchačkou (2%; 4%)

Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 6, metoda relativně dlouhodobého pomalého míchání se neosvědčila, nanočástice byly větší než v případě jejich ponechání pod vlivem Brownova pohybu. Nejvýraznější vliv na sníženou velikost nanočástic měl překvapivě cetrimid použitý v 0,8% koncentraci. Vliv koncentrace polymerního nosiče a koncentrace terbinafinu byl prokázán. Podíl aglomerované frakce byl pod 4 %.

5.6 Vliv tenzidů a jejich koncentrace na velikost nanočástic (2%)

Bylo testováno 5 běžně používaných tenzidů, každý v koncentracích 0,20 % a 0,025 %. Jak je uvedeno v Tab. 7, negativní účinek na velikost nanočástic měl jednoznačně cetrimid v obou koncentracích. Jednoznačně pozitivně se projevil amfoterní disodium kokoamfoacetát ve velmi nízké koncentraci. Ostatní tenzidy v pořadí klesající účinnosti od tegobetainu a poloxameru k laurethsíranu sodnému se z hlediska účinnosti prakticky nelišily.

5.7 Vliv tenzidů a jejich koncentrace na velikost nanočástic připravených dlouhodobým pomalým mícháním (2%)

Na základě srovnání hodnot velikosti nanočástic získaných metodou bez vnějšího mechanického zásahu a míchaných po dobu jednoho dne na magnetické míchačce v tab. 7 a v tab. 8 je možno dojít k jednoznačnému a významnému závěru o mimořádné stabilitě disperzních soustav s tenzidy.

5.8 Vliv objemu vzorků a rychlosti přidávání vnitřní fáze do fáze vnější na velikost nanočástic (2%)

Jak je patrné z hodnot uvedených v Tab. 9, vliv celkového objemu soustavy na velikost nanočástic byl málo výrazný, i když systematický. Rozdíl ve velikosti nanočástic byl podle logického předpokladu výraznější v případě největších testovacích objemů. Konkrétně, v případě 100 mililitrové soustavy byl vliv způsobu přípravy na velikost nanočástic největší, v případě nejmenšího, dvou mililitrového objemu soustavy se faktor způsobu přípravy vůbec neprojevil. Nejmenší nanočástice byly takto za těchto podmínek získány metodou rychlého smísení obou fází, největší v případě pomalého přikapávání. Se snižováním objemu obou soustav se rozdíly ve velikosti nanočástic snižovaly.

5.9 Vliv objemu vzorků a rychlosti přidávání vnitřní fáze do fáze vnější na velikost nanočástic s vyšším stupněm větvení (2%)

V případě tohoto experimentu se jednalo o obdobné schéma jako v 5.10, odlišná byla volba výšemolekulárního vzorku a dvou nejmenších objemů soustavy (2 a 6 ml) množství vzorku na velikost nanočástic v případě postupu přípravy pomalým přidáváním vnitřní fáze do fáze vnější. Vzorek připravený rychlou metodou měl stejné velikostní parametry jako méně objemový vzorek připravený stejným postupem a překvapivě také jako méně objemový vzorek připravený pomalým přidáváním vnitřní fáze.

5.10 Vliv objemu vzorků a rychlosti přidávání vnitřní fáze do fáze vnější na velikost nanočástic s nižším stupněm větvení (2%)

Vzorky analogické se vzorky uvedenými v 5. 8. z hlediska postupu přípravy a totožné s 5.9 z hlediska složení byly testovány opakovaně. Byly prokázány stejné souvislosti jako v případě výše uvedených vzorků. Výšemolekulární vzorky větších (6 ml) objemů připravené pomalým přidáváním vnitřní fáze do vnější se vyznačovaly výrazně většími částicemi, jak je patrné z Tab. 11.

5.11 Vliv objemu vzorků a rychlosti přidávání vnitřní fáze do fáze vnější na velikost nanočástic s nižším stupněm větvení (2%)

V tomto případě se jedná o reprodukováný pokus uvedený v Tab. 9 a diskutovaný v oddílu 5.8. Výsledky a souvislosti z nich vyplývající jsou prakticky totožné s výše uvedeným experimentem. Jedná se o vliv faktoru rychlosti přidávání vnitřní fáze do vnější v případě větších objemů vzorků a o postupné snižování významu tohoto faktoru se

snižováním objemu vzorku. Tento jev se postupně snižoval k nulovému rozdílu ve velikosti nanočástic.

5.12 Vliv koncentrace kokamidopropylbetainu a disodium kokamido amfoacetátu a hodnoty jejich pH na velikost nanočástic (2%)

Všechny vzorky uvedené v této části byly připraveny metodou rychlého smísení obou fází a míchání na magnetické míchačce. Kokamidopropylbetain (pod obchodním názvem Tegobetain) a disodium kokamidoamfoacetát jsou běžně dostupnými kosmetickými ingrediencemi. Jedná se o amfoterní tenzidy s relativně malou dráždivostí na pokožku. V Tab. 13 jsou výsledky testování vlivu odvozeniny betainu ve dvou koncentracích a při třech hodnotách aktuální acidity. Jako cenný poznatek je možno hodnotit získání velmi malých nanočástic v soustavě s 0,025 % tenzidem. Po zvýšení koncentrace tenzidu na 0,2% byly nanočástice větší. Velikost nanočástic se u obou hodnot koncentrace snižovala se vzrůstem pH v kyselé oblasti do limitní hodnoty mírně přesahující hodnotu 5,0. Výsledek měření stejných vzorků uchovávaných po dobu jednoho dne je v Tab. 15. Došlo k velmi malým změnám velikostních parametrů. V Tab. 17 jsou výsledky měření velikosti nanočástic připravených rychlým všech složek za míchání na magnetické míchačce. Také v tomto případě byla potvrzena nutnost využití limitní horní hodnoty pH. Míchání disperze nanočástic „in statu nascendi“ bylo prokázáno jako nevhodná operace rušící Brownův pohyb a vyvolávající aglomeraci nanočástic. Pouze nanočástice, které byly připraveny při hodnotách pH 5 bylo možno charakterizovat z hlediska jejich zeta potenciálu, který při vyšší koncentraci tenzidu měl hodnotu 10,8 mV a při nižší koncentraci tenzidu měl opačný náboj a hodnotu - 12,0 mV (Tab. 17c).

Jak je patrné z Tab. 18 (**4; 1%**), výše popsané výsledky měření velikosti částic výšemolekulárních vzorků byly potvrzeny i po jednodenním uchovávaní vzorků. Kvalitní vzorek byl získán při pH 5.

V Tab. 14 je analogická situace, která se týká použití kokoamfoacetátu. I v tomto případě byl prokázán pozitivní vliv zvýšené hodnoty pH na velikost nanočástic. Kokoamfoacetát stabilizoval při vyšší použité koncentraci až ho hodnoty pH 8. Za těchto podmínek byly získány nanočástice s hodnotou průměru 37 nm.

Ještě menší nanočástice byly získány po jednodenním uchovávaní disperzí ve vodě (tab. 16). Vzhledem k tomu, že se jednalo o výše koncentrované 0,2% disperze tenzidu a relativně vysoké hodnoty pH 8,0, není vyloučen vliv pomalé solubilizace nanočástic.

5.13 Vliv koncentrace vnitřní fáze emulze připravené metodou rychlého mísení obou fází na velikost nanočástic

Zvyšováním koncentrace vnitřní fáze je dosaženo zvýšení výtěžku zcela totožného produktu. V Tab. 19 (1%, 2) jsou výsledky granulometrie 6 vzorků. Byla získána pravidelně stoupající řada hodnot velikosti nanočástic a jejich polydisperzity. Hlavní příčinou je patrně stoupající viskozita celé soustavy, není vyloučen vliv snižující se rychlosti přidávání vnitřní fáze.

Výsledky uvedené v Tab. 20 (3%, 2) představují řadu vzorků připravených z 3% polymeru za relativně stejných podmínek. Stejně jako v předešlém případě byla získána pravidelně stoupající řada hodnot, podstatný rozdíl byl zaznamenán ve strmosti této řady velikosti částic a jejich polydisperzity. Hodnoty uvedené v Tab. 20 (3%, 2) jsou systematicky vyšší. Vysvětlení je možno hledat v 3% koncentraci polymeru. Jako zajímavý je možno hodnotit výrazný pokles hodnot charakteristiky se stoupající koncentrací vnitřní fáze emulze.

Vzorky připravené mícháním na magnetické míchačce se od výše popsaných vzorků připravených prostým krátkodobým mísením liší menší citlivostí k nižším v opakovaném schématu experimentu již byla získána řada kontrastnějších případů (37 mV). Je možno předpokládat, že postup přípravy nanočástic je citlivý k rychlosti mísení fází.

5.14 Vliv koncentrace vnitřní fáze emulze připravené metodou rychlého mísení obou fází na velikost nanočástic (1%,3%, 4)

V Tab. 22 je granulometrická charakterizace nanočástic připravených z 3% podílu polymerní složky vyšemolekulárního polymeru. Byl potvrzen pravidelný růst hodnot velikostního parametru se vnitřní fáze patrně ovlivněný viskozitou soustavy. Také v tomto případě byl zaznamenán pokles hodnot zeta potenciálu se vzrůstající koncentrací emulze. V Tab. 23 jsou výsledky analogického měření nanočástic připravených z emulze stejného polymeru, který se lišil nižší, 1% koncentrací při stejné molekulové hmotnosti jako výše uvedený. Všechny vzorky byly míchány magnetickou míchačkou po dobu 1 hodiny. Byly získány výsledky spočívající v nulovém vlivu koncentrace vnitřní fáze na velikost nanočástic v rozmezí hodnot od 10 % do 15 % v hodnotě 40 nm. Se zvyšováním koncentrace vnitřní fáze na 25% a 30 % byly naměřeny opět dvě téměř stejné hodnoty velikosti částic v hodnotách 69 a 65 nm.

V tabulce 24 jsou uvedeny parametry nanočástic připravených opakovaním syntézy z vyšemolekulárního polymeru použitého ve vyšší, 3% koncentraci (Tab. 22). Byly získány středně vysoké pravidelně stoupající hodnoty velikosti částic ve škále od 66 nm do 114 nm.

Stejně jako v analogické řadě vzorků s růstem hodnot velikostního parametru rostla hodnota polydisperzity patrně pod vlivem obtížnějšího dodržení podmínek rychlosti přidávání vnitřní fáze při rostoucí viskozitě soustavy.

5.15 Vliv typu polymeru a aktuální acidity vnější fáze emulze na velikostní parametry nanočástic připravených metodou rychlého mísení obou fází (1%; 2, 4)

Jak je patrné z Tab. 27, byla prokázána u obou testovaných řad lišících se molekulárními parametry velmi strmá řada hodnot velikostního parametru daná hodnotami aktuální acidity. Nejmenší nanočástice byly u obou polymerů při nejvyšším testovaném pH. Výšemolekulární polymer měl překvapivě nižší velikost nanočástic při výrazně větší polydisperzitě nanočástic a 2% frakci extrémně velkých mikročástic (5000 nm obj.). V této fázi není pro takový nález vysvětlení kromě nestandardní rychlosti přidávání vnitřní fáze do fáze vnější.

Hodnoty velikostních parametrů uvedené v Tab. 28 jsou opakováním předešlého schématu v Tab. 27. Opětovně byl potvrzen výrazný vliv malé změny hodnoty pH na velikost nanočástic. Ve všech vzorcích byly prokázány stopové koncentrace mikročástic. Vzorek z nízemolekulárního polymeru měl ostřejší přechod od velikosti p dosažené při pH 4 k patrně limitní hodnotě při pH 5.

5.16 Vliv typu polymeru a koncentrace citrát-fosfátový pufr pufru na velikostní parametry nanočástic připravených metodou rychlého mísení obou fází (1%; 2, 4)

Vliv koncentrace pufru na velikostní parametry nanočástic je uveden v Tab. 29. Bylo prokázáno, že u obou testovaných vzorků nanočástic není jejich velikost významně ovlivněna koncentrací pufru. Jako negativní aspekt je možno hodnotit vyšší hodnoty polydisperzity v případě více zředěných pufrů. Vzorky nanočástic byly připraveny rychlým přidáním vnitřní fáze do fáze vnější.

V Tab. 30 jsou uvedeny nanočástice, které byly připraveny také při pH 5,0 pomalým přikapáváním vnitřní fáze k fázi vnější. Velikost nanočástic připravených tímto postupem se prakticky nelišila od nanočástic připravených postupem popsáním v Tab. 29, největší rozdíl ve velikosti činil 9 nm.

5.16 Vliv typu polymeru a jeho koncentrace na velikost nanočástic

Z hodnot uvedených v Tab. 31 je zřejmé, že velikost nanočástic byla značně ovlivněna jejich koncentrací ve vnitřní fázi. Nanočástice připravené z 5% koncentrace polymeru byly

značně větší než nanočástice připravené z polymeru použitého v 3% koncentraci.

Výšemolekulární polymer měl více reprodukovatelné hodnoty velikostního parametru, lišil se však hodnotami polydisperzity.

5.17 Grafické záznamy měření

Přiložení vybraných grafických záznamů má význam pouze orientační z hlediska dokreslení tvaru křivek týkajících se současného záznamu velikostní distribuce několika vzorků současně, případně vlivu modelové léčivé látky nebo tenzidu na polydisperzitu nanočástic.

6. Závěry

- 1) V předložené rigorózní práci je prezentována řada nových poznatků, které se týkají velikosti a distribuce velikosti nanočástic a které mohou vést k optimalizaci postupů přípravy a využití nanočástic.
- 2) Jako často opomíjený aspekt byl sledován a potvrzen vliv rychlosti přidávání vnitřní fáze emulze do vnější a intenzity a způsobu míchání vnitřní fáze emulze a s tím souvisící vliv celkového množství studované soustavy.
- 3) Stabilita velikostního parametru nanočástic byla sledována po dobu jednoho dne s pozitivním výsledkem.
- 4) Koncentrace vnitřní fáze a molekulová hmotnost polymeru měly vliv na velikost nanočástic prostřednictvím ovlivnění viskozity obou fází .
- 5) Byla prokázána důležitost volby vhodného surfaktantu, optimální koncentrace pufru a jeho aktuální acidity v roli emulgátoru ve vnější fázi emulzní soustavy pro dosažení optimální polydisperzity velikosti nanočástic.

7. Seznam použitých tabulek

Tab.1 : Složení emulzních soustav

Tab.2 :Postup přípravy

Tab. 3a: Složení 25g vzorků 1-8, připravovaných metodou 1A

Tab. 3b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 4a: Složení 25g vzorků 9-16 (Emulgátor Cetrimid 0,8%), připravovaných metodou 1A

Tab. 4b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 5a: Složení 25g vzorků 17-24, připravovaných metodou 3A

Tab. 5b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 6a: Složení 25g vzorků 25-32 (Emulgátor Cetrimid 0,8%), připravovaných metodou 3A

Tab. 6b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace polymeru (1% a 3% P1), koncentrace TB(0, 10 nebo 30%) a koncentrace emulze(10 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 7a: Složení 25g vzorků 33-42 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Tab. 7b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (0,025% nebo 0,2%) a druhu emulgátoru(CET, TB, DS, POLO nebo EMAL) na velikost částic

Tab. 8a: Složení 25g vzorků 43-52 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Tab. 8b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (0,025% nebo 0,2%) a druhu emulgátoru(CET, TB, DS, POLO nebo EMAL) na velikost částic

Tab. 9a: Složení vzorků 53-66 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO)

Tab. 9b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2, 6, 25 nebo 100ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Tab. 10a: Složení vzorků 125-132 (Polymer 1% P2, 10% emulze s DMSO)

Tab. 10b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2 nebo 6 ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Tab. 11a: Složení vzorků 145-152 (Polymer 1% P2, 10% emulze s DMSO)

Tab. 11b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2 nebo 6 ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Tab. 12a: Složení vzorků 67-80 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO)

Tab. 12b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv objemu vorku (2, 6, 25 nebo 100ml) a druhu míchání vnější a vnitřní fáze (postupně nebo najednou) na velikost částic

Tab. 13a: Složení 15g vzorků 81-86 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Tab. 13b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Tab. 14a: Složení 15g vzorků 87-92 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Tab. 14b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Tab. 15a: Složení 15g vzorků 93-98 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Tab. 15b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Tab. 16a: Složení 15g vzorků 99-104 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Tab. 16b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH roztoku na velikost částic

Tab. 17a: Složení 15g vzorků 165-170 (Polymer 1% P1, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 2A

Tab. 17b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH vorku na velikost částic

Tab. 17c: Zeta potenciál

Tab. 18a: Složení 15g vzorků 171-176 (Polymer 1% P2, 10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 3A

Tab. 18b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulgátoru (0,025% nebo 0,2%) a pH vorku na velikost částic

Tab. 19a: Složení 25g vzorků 105-110 (Polymer 1% P1), připravovaných metodou 1A

Tab. 19b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 20b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 20a: Složení 25g vzorků 111-116 (Polymer 3% P1), připravovaných metodou 1A

Tab. 21a: Složení 25g vzorků 133-138 (Polymer 1% P2), připravovaných metodou 2A

Tab. 21b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 21c: Zeta potenciál

Tab. 22a: Složení 25g vzorků 139-144 (Polymer 3% P2), připravovaných metodou 2A

Tab. 22b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 22c: Zeta potenciál

Tab. 23a: Složení 25g vzorků 153-158 (Polymer 1% P2), připravovaných metodou 3A

Tab. 23b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 24a: Složení 25g vzorků 159-164 (Polymer 3% P2), připravovaných metodou 3A

Tab. 24b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace emulze (5, 10, 15, 20, 25 nebo 30%) na velikost částic

Tab. 25a: Složení 10g vzorků 117-120 (Polymer 3% P1, 5% emulze s DMSO), připravovaných metodou 1A

Tab. 25b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv poměru složení vnější fáze (3:1, 1:1, 1:3 nebo 1:8) na velikost částic

Tab. 26a: Složení 10g vzorků 121-124 (Polymer 3% P1, 5% emulze s Acetonem), připravovaných metodou 1A

Tab. 26b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv poměru složení vnější fáze (3:1, 1:1, 1:3 nebo 1:8) na velikost částic

Tab. 27a: Složení 15g vzorků 177-182 (10% emulze s DMSO) , připravovaných metodou 2A

Tab. 27b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a pH pufru (2,8; 4,0 nebo 5,0) na velikost částic

Tab. 28a: Složení 15g vzorků 193-196 (10% emulze s DMSO) , připravovaných metodou 3A

Tab. 28b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a pH pufru (4,0 nebo 5,0) na velikost částic

Tab. 29a: Složení 15g vzorků 183-186, připravovaných metodou 2A, pH vzorku 5,0, koncentrace emulze 10%, použité rozpouštědlo DMSO

Tab. 29b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a poměru složení vnější fáze na velikost částic

Tab. 30a: Složení 15g vzorků 183-186 (10% emulze s DMSO, pH vzorku 5,0), připravovaných metodou 1B

Tab. 30b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv druhu polymeru (P1 nebo P2) a poměru složení vnější fáze na velikost částic

Tab. 31a: Složení 15g vzorků 187-192 (10% emulze s DMSO), připravovaných metodou 2A

Tab. 31b: Granulometrická charakterizace nanočástic. Vliv koncentrace (3 nebo 5%) a druhu polymeru (P1 nebo P2) a pH vzorku na velikost částic

8. Seznam použitých obrázků

Obr.1 Schéma syntézy ORMOSIL použitím AOT/butanol/vodního mikroemulzního systému

Obr.2 Schématický nákres divevergentního přístupu (a) a convergentního přístupu (b) pro chemickou syntézu dendrimeru.

Obr.3 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1, 30% emulze, rozpouštědlo DMSO, bez baze terbinafinu a s 10% bazi terbinafinu)

Obr.4 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1, 10% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor 0,2% DS)

Obr.5 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1, 10% emulze, rozpouštědlo DMSO, emulgátor 0,2% DS, pH 8,0)

Obr.6 Frekvenční křivka – autentický záznam přístroje. Vzorek 5-6 (složení 1% P1 nebo P2, 10% emulze, rozpouštědlo DMSO, pH vzorku 5,0, podíl pufru a vody 1:1 nebo 1:2)

9. Seznam použité literatury

[1] Prasad P N: Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2012; 608.

[2] Prasad P N: Introduction to Biophotonics; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2003; 593.

[3] Prasad P N: Nanophotonics; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2004; 432. [4] Chen G, Roy I, Yang C, Prasad P N: Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. Chem Rev. 2016; 116: 2826-2885.

[5] Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C: Nanomedicine: current status and future prospects. FASEB J. 2005; 19: 311–330.

[6] Cormode D P, Jarzyna P A, Mulder W J M, Fayad Z A: Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging. Adv. Drug Delivery Rev. 2010; 62: 329–338.

[7] Muller R H, Mader K, Gohla S: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000; 50: 161–177.

[8] Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P: Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted

biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 1147–1235.

[9] Peer D, Karp J M, Hong S, FarokHzad O C, Margalit R, Langer R: Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2007; 2: 751–760.

[10] Kwon G S, Okano T: Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1996; 21: 107–116.

[11] McCarthy J R, Weissleder R: Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2008; 60: 1241–1251.

[12] Mulder W J M, Strijkers G J, Van Tilborg G A F, Cormode D P, Fayad Z A, Nicolay K: Nanoparticulate Assemblies of Amphiphiles and Diagnostically Active Materials for Multimodality Imaging. *Acc. Chem. Res.* 2009; 42: 904–914.

[13] Rai S, Paliwal R, Gupta P N, Khatri K, Goyal A K, Vaidya B, Vyas S P: Solid lipid

nanoparticles (SLNs) as a rising tool in drug delivery science: One step up in nanotechnology. *Curr. Nanosci.* 2008; 4: 30–44.

[14] Basu B, Garala K, Bhalodia R, Joshi B, Mehta K: Solid lipid nanoparticles: A promising tool for drug delivery system. *J. Pharm. Res.* 2010; 3: 84–92.

[15] Welsher K, Liu Z, Sherlock S P, Robinson J T, Chen Z, Daranciang D, Dai H J: A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2009; 4: 773–780.

[16] Ye L, Yong K T, Liu L W, Roy I, Hu R, Zhu J, Cai H X, Law W C, Liu J W, Wang K, et al: A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nat. Nanotechnol.* 2012; 7: 453–458.

[17] Uhrich K E, Cannizzaro S M, Langer R S, Shakesheff K M: Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.* 1999; 99: 3181–3198.

[18] Bae Y, Nishiyama N, Kataoka K: In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-Sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments. *Bioconjugate Chem.* 2007; 18: 1131–1139.

[19] Wei H, Cheng S X, Zhang X Z, Zhuo R X: Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. *Prog. Polym. Sci.* 2009; 34: 893–910.

- [20] Cho W S, Cho M J, Jeong J, Choi M, Cho H Y, Han B S, Kim S H, Kim H O, Lim Y T, Chung B H, et al: Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 236: 16–24.
- [21] Chronopoulou L, Massimi M, Giardi M F, Cametti C, Devirgiliis L C, Dentini M, Palocci C: Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures. *Colloids Surf., B* 2013; 103: 310–317.
- [22] Tassa C, Shaw S Y, Weissleder R: Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy. *Acc. Chem. Res.* 2011; 44: 842–852.
- [23] Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R, Rudzinski W E: Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Controlled Release* 2001; 70: 1–20.
- [24] Hans M L, Lowman A M: Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2002; 6: 319–327.
- [25] Cheng J, Teply B A, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu F X, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno A F, Langer R, Farokhzad O C: Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 2007; 28: 869–876.
- [26] Hawkins M J, Soon-Shiong P, Desai N: Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2008; 60: 876–885.
- [27] Jahanshahi M, Babaei Z: Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. *Afr. J. Biotechnol.* 2008; 7: 4926–4934.
- [28] Coester C J, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J: Gelatin nanoparticles by two step desolvation - a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J. Microencapsulation.* 2000; 17: 187–193.
- [29] Elzoghby A O, Samy W M, Elgindy N A: Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Controlled Release* 2012; 157: 168–182.
- [30] Arangoa M A, Campanero M A, Renedo M J, Ponchel G, Irache J M: Gliadin nanoparticles as carriers for the oral administration of lipophilic drugs. Relationships between bioadhesion and pharmacokinetics. *Pharm. Res.* 2001; 18: 1521–1527.

- [31] Shi M, Lu J, Shoichet M S: Organic nanoscale drug carriers coupled with ligands for targeted drug delivery in cancer. *J. Mater. Chem.* 2009; 19: 5485–5498.
- [32] Hamidi M, Azadi A, Rafiei P: Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2008; 60: 1638–1649.
- [33] Sawant R R, Torchilin V P: Multifunctionality of lipid-core micelles for drug delivery and tumour targeting. *Mol. Membr. Biol.* 2010; 27: 232–246.
- [34] Tokarev I, Minko S: Multiresponsive, Hierarchically Structured Membranes: New, Challenging, Biomimetic Materials for Biosensors, Controlled Release, Biochemical Gates, and Nanoreactors. *Adv. Mater.* 2009; 21: 241–247.
- [35] Grayson S M, Frechet J M J: Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. *Chem. Rev.* 2001; 101: 3819–3867.
- [36] Chen G, Seo J, Yang C, Prasad P N: Nanochemistry and nanomaterials for photovoltaics. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 8304– 8338.
- [37] Yin Y, Alivisatos A P: Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface. *Nature* 2005; 437: 664–670.
- [38] Peng Z A, Peng X G: Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 183–184.
- [39] Murray C B, Norris D J, Bawendi M G: Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* 1993; 115: 8706–8715.
- [40] Mai H X, Zhang Y W, Si R, Yan Z G, Sun L D, You L P, Yan C H: High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: Controlled synthesis and optical properties. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 6426–6436.
- [41] Roy I, Ohulchanskyy T Y, Bharali D J, Pudavar H E, Mistretta R A, Kaur N, Prasad P N: Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral, nano- medicine approach for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102: 279–284.
- [42] Ganguli A K, Ganguly A, Vaidya S: Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials. *Chem. Soc. Rev.* 2010; 39: 474–485.
- [43] Das S, Jain T K, Maitra A: Inorganic-organic hybrid nanoparticles from n-octyl triethoxy silane. *J. Colloid Interface Sci.* 2002; 252: 82–88.
- [44] Roy I, Ohulchanskyy T Y, Pudavar H E, Bergey E J, Oseroff A R, Morgan J, Dougherty T J, Prasad P N: Ceramic- based nanoparticles entrapping water-

insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125 : 7860–7865.

[45] Tomalia D A, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P: A New Class of Polymers - Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 1985; 17: 117–132.

[46] Newkome G R, Yao Z Q, Baker G R, Gupta V K: Micelles 0.1. Cascade Molecules - a New Approach to Micelles - a [27]-Arborol. *J. Org. Chem.* 1985; 50: 2003–2004.

[47] Hawker C J, Fréchet J M J: Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture - a New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1990; 112: 7638–7647.

[48] Schubert S, Delaney J T Jr, Schubert U S: Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter.* 2011; 7: 1581–1588.

[49] Kasai H, Nalwa H S, Oikawa H, Okada S, Matsuda H, Minami N, Kakuta A, Ono K, Mukoh A, Nakanishi H: A Novel Preparation Method of Organic Microcrystals. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2 1992; 31: L1132–L1134.

[50] Baba K, Pudavar H E, Roy I, Ohulchanskyy T Y, Chen Y H, Pandey R K, Prasad P N: New method for delivering a hydrophobic drug for photodynamic therapy using pure nanocrystal form of the drug. *Mol. Pharmaceutics* 2007; 4: 289–297.

[51] Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E: Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998; 24: 1113–1128.

[52] ElBayoumi T A, Torchilin V P. Current Trends in Liposome Research. *Methods Mol. Biol.* 2010; 605:1–27.

[53] Olson F, Hunt C A, Szoka F C, Vail W J, Papahadjopoulos D: Preparation of Liposomes of Defined Size Distribution by Extrusion through Polycarbonate Membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1979; 557: 9–23.

[54] Torchilin V P: Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.* 2007; 24: 1–16.

[55] Gallardo C, Monras J P, Plaza D O, Collao B, Saona L A, Duran-Toro V, Venegas F A, Soto C, Ulloa G, Vasquez C C, Bravo D, Perez-Donoso J M: Low-temperature biosynthesis of fluorescent semiconductor nanoparticles (CdS) by oxidative stress resistant Antarctic bacteria. *J. Biotechnol.* 2014; 187: 108–115.

- [56] Narayanan K B, Sakthivel N: Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2010; 156: 1–13.
- [57] Miyata K, Christie R J, Kataoka K: Polymeric micelles for nanoscale drug delivery. *React. Funct. Polym.* 2011; 71: 227–234.
- [58] Kumar R, Ohulchanskyy T Y, Roy I, Gupta S K, Borek C, Thompson M E, Prasad P N: Near-Infrared Phosphorescent Polymeric Nanomicelles: Efficient Optical Probes for Tumor Imaging and Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2009; 1: 1474–1481.
- [59] Danhier F, Ansorena E, Silva J M, Coco R, Le Breton A, Preat V: PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Controlled Release* 2012; 161: 505–522. [L]
[SEP]
- [60] Camli S T, Buyukserin F, Balci O, Budak G G: Size controlled synthesis of sub-100 nm monodisperse poly- (methylnmethacrylate) nanoparticles using surfactant-free emulsion polymerization. *J. Colloid Interface Sci.* 2010; 344: 528–532.
- [61] Tabatabaei Mirakabad F S, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi M R, Milani M, Zarghami N, Zeighamian V, Rahimzadeh A, Alimohammadi S, Hanifehpour Y, et al: PLGA- Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014; 15: 517–535. [L]
[SEP]
- [62] Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y: Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* 1999; 187: 143–152.
- [63] Soo Choi H, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer J P, Itty Ipe B, Bawendi M G, Frangioni J V: Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 1165–1170.
- [64] Sperling R A, Parak W J: Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc., A* 2010; 368: 1333–1383.
- [65] Yee C, Kataby G, Ulman A, Prozorov T, White H, King A, Rafailovich M, Sokolov J, Gedanken A: Self-assembled monolayers of alkanesulfonic and -phosphonic acids on amorphous iron oxide nanoparticles. *Langmuir* 1999; 15: 7111–7115.
- [66] Park J, Lee E, Hwang N M, Kang M S, Kim S C, Hwang Y, Park J G, Noh H J, Kim J Y, Park J H, et al: One-nanometer-scale size-controlled synthesis of monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2005; 44: 2872– 2877.

[67] Green M R, Manikhas G M, Orlov S, Afanasyev B, Makhson A M, Bhar P, Hawkins M J: Abraxane((R)), a novel Cremophor((R))-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2006; 17: 1263–1268.

[68] Lee Y E K, Kopelman R: Targeted, Multifunctional Hydrogel Nanoparticles for Imaging and Treatment of Cancer. In *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications*; Svenson, S., Prud'homme, R. K., Eds.; Springer-Verlag: New York, 2012; 225–255.

[69] Duncan R, Sat Y N: Tumour targeting by enhanced permeability and retention (EPR) effect. *Ann. Oncol.* 1998; 9: 39.

[70] Matsumura Y, Maeda H: A New Concept for Macro- molecular Therapeutics in Cancer-Chemotherapy - Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* 1986; 46: 6387–6392.

[71] Okada M: Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 2002; 27: 87–133.

[72] Pridgen E M, Langer R, Farokhzad O C: Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy. *Nano- medicine* 2007; 2: 669–680.

[73] Wells L A, Lasowski F, Fitzpatrick S D, Sheardown H: Responding to Change: Thermo- and Photo-responsive Polymers as Unique Biomaterials. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2010; 38: 487–509.

[74] De Jong W H, Borm P J A: Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* 2008; 3: 133–149.

[75] Kim T Y, Kim D W, Chung J Y, Shin S G, Kim S C, Heo D S, Kim N K, Bang Y J: Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 3708–3716.

[76] Hrkach J, Von Hoff D, Ali M M, Andrianova E, Auer J, Campbell T, De Witt D, Figa M,

Figueiredo M, Horhota A, et al: Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 128ra39.

[77] Zhang Q, Wang X L, Li P Z, Nguyen K T, Wang X J, Luo Z, Zhang H C, Tan N S, Zhao Y L: Biocompatible, Uniform, and Redispersible Mesoporous Silica

Nanoparticles for Cancer- Targeted Drug Delivery In Vivo. *Adv. Funct. Mater.* 2014; 24: 2450–2461.

[78] Li Y Y, Cunin F, Link J R, Gao T, Betts R E, Reiver S H, Chin V, Bhatia S N, Sailor M J: Polymer replicas of photonic porous silicon for sensing and drug delivery applications. *Science* 2003; 299: 2045–2047.

[79] Jain J, Arora S, Rajwade J M, Omray P, Khandelwal S, Paknikar K M: Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Mol. Pharmaceutics* 2009; 6: 1388–1401.

[80] Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing M M Q: Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int. J. Nanomed.* 2014; 9: 2399–2407.

[81] Dubertret B, Skourides P, Norris D J, Noireaux V, Brivanlou A H, Libchaber A: In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002; 298: 1759–1762.

[82] Froehlich E: The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2012; 7: 5577– 5591.

[83] Chen M, von Mikecz A: Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp. Cell Res.* 2005; 305: 51–62.

[84] Hardman R: A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ. Health Persp.* 2006; 114: 165–172.

[85] Xiong S, George S, Yu H, Damoiseaux R, France B, Ng K W, Loo J S-C: Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co- glycolic acid) (PLGA) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Arch. Toxicol.* 2013; 87: 1075–1086.

[86] Li H, Li M, Shih W Y, Lelkes P I, Shih W-H: Cytotoxicity Tests of Water Soluble ZnS

and CdS Quantum Dots. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2011; 11: 3543–3551.

[87] Su Y, He Y, Lu H, Sai L, Li Q, Li W, Wang L, Shen P, Huang Q, Fan C: The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase - Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating. *Biomaterials* 2009; 30: 19–25.

[88] Singh N, Jenkins G J S, Asadi R, Doak S H: Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* 2010; 1:5358.

[89] Schipper M L, Iyer G, Koh A L, Cheng Z, Ebenstein Y, Aharoni A, Keren S, Bentolila L A, Li J, Rao J, et al: Particle Size, Surface Coating, and PEGylation Influence the Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice. *Small* 2009; 5: 126–134.