

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

katedra farmaceutické technologie

studijní program: farmacie

**Vliv formulačních faktorů na velikost
polyesterových nanočástic.**

Influence of formulation factors on the polyester
nanoparticles size.

Diplomová práce

Radek Športeň

školitel: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Hradec Králové, duben 2016

Prohlašuji, že tato práce diplomová práce je mým původním autorským dílem, jež jsem psal samostatně pod odborným vedením svého školitele. Všechny použité zdroje, literaturu a prameny jsem řádným způsobem citoval. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Chebu 10. 8. 2016

.....
Radek Športeň

Poděkování

Děkuji panu Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za velikou trpělivost, odborné vedení a velice cenné rady jak v oblasti teoretické, tak při uskutečňování experimentální části této práce.

Zadání diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo upřesnit, doplnit a rozšířit dosavadní znalosti o granulometrických parametrech nanočástic a mikročástic z biodegradabilních polyesterů. Byl vybrán kopolymer PLGA s nižší molekulovou hmotností a terpolymer PLGA větvený na centrální molekule tripentaerythritolu. Byla zvolena v laboratoři snadno realizovatelná emulzní metoda přípravy založená na dispergaci roztoků polymerů v různých rozpouštědlech včetně jejich binárních směsí. Dalším zadaným parametrem postupu přípravy částic byly kromě rozpouštědla různé emulgátory a jejich směsi lišící se hodnotami HLB a nábojem. Hlavním cílem bylo nalézt podmínky, které vedou k dosažení co nejmenší velikosti nanočástic.

Abstrakt

V teoretické části práce je pojednáno o různých typech nanočástic, jako jsou polymerní částice, liposomy, micely a pevné lipidové částice (SLN). Jsou prezentovány informace o nejčastěji používaných metodách laboratorní přípravy polymerních nanočástic, jako je dispergace roztoků polymerů intenzivním mícháním, koacervace roztoků polymerů, polymerace v disperzích a využití metod dispergace roztoků polymerů v nadkritických rozpouštědlech. V další části je stručná informace o metodách hodnocení základních vlastností nanočásticových systémů. Jsou shrnuty základní informace o granulometrii částic, jejich zeta potenciálu, enkapsulační účinnosti léčivých látek, a o tvarovém faktoru. Těžiště práce je v experimentu, jehož hlavním cílem byla minimalizace velikosti částic získaných emulgací roztoků biodegradabilních polyesterů alifatických α -hydroxykyselin. Hlavním procesním opatřením byla volba vhodného rozpouštědla polymerů a hledání nejúčinnějšího emulgátoru při dispergaci roztoků polymerů. Bylo nalezeno několik kombinací proměnných parametrů procesu přípravy, které vedly k nanočásticím s intenzivním průměrem menším než 100 nm.

Abstract

In the theoretical part of this thesis are described various types of nanoparticles, such as polymeric particles, liposomes, micelles and solid lipid nanoparticles. There are presented basic informations concerning methods of particles preparation in the laboratory conditions such as solutions of polymers dispersion methods by intensively stirring, coacervation of the solutions of polymers, polymeration methods in dispersions, and the exploitation of methods of dispersion of polymeric solutions in the supercritical solvents. In the following part of this thesis are some concise informations about the methods of evaluation of basic parameters of the nanoparticulate systems. There are summarised the trivial informations concerning granulometry of particles, their zeta potential, encapsulation effectivity of drugs, and also about the particles shape factor. The focus of this thesis is in the experiment, the main deal were in minimisation of the particle size prepared by the method of emulsification of biodegradable aliphatic α -hydroxyacids polyesters solutions. The main process arrangement was the selection of the appropriate solvent of polymers in the inner emulsion phase and the founding for the mostly efficient emulsifier during the dispersion process of polymer solutions. In process of the preparation, there were founded several combinations of parameters leading towards the nanoparticles with the intensity diameter under the limit of 100 nm.

Obsah

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1 Nanočástice	2
2.1.1 Polymerní nanočástice.....	3
2.1.2 Liposomální a micelární nanočástice	3
2.1.3 Pevné lipidové nanočástice.....	4
2.2 Laboratorní příprava polymerních nanočástic	5
2.2.1 Disperze předem připraveného polymeru	6
2.2.2 Koacervační metoda	7
2.2.3 Polymerizace monomerů.....	7
2.2.4 Příprava nanočástic pomocí superkritické kapalinové technologie	8
2.3 Hodnocení nanočástic	10
2.3.1 Velikost částic	11
2.3.2 Zeta potenciál.....	12
2.3.3 Efektivita zachycení léčiva	13
2.3.4 Tvar nanočástic.....	14
2.4 Možnosti nanočástic v cílené léčbě	15
3. Experimentální část	18
3.1 Seznam použitých chemikálií a jejich zkratky	18
3.2 Použité přístroje	19
3.3 Příprava fází a nanočástic.....	20
3.4 Výsledky, tabulky a grafy	21
4. Diskuze	57
4.1 K volbě podmínek nanočástic	57
4.2 Vliv ionických emulgátorů na dispergaci polymerů rozpuštěných v ethylmethylketonu	58
4.3 Vliv ionických emulgátorů na dispergaci polymerů rozpuštěných v dimethylsulfoxidu	59
4.4 Vliv koncentrace kationických tenzidů na dispergaci polymeru T3 rozpuštěného v dimethylsulfoxidu	59
4.5 Vliv koncentrace emulze na dispergaci polymeru T3 rozpuštěného v dimethylsulfoxidu	60

4.6	Vliv přísady terbinafinu na dispergaci polymeru T3 rozpuštěného v ethylacetátu	61
4.7	Vliv teploty na dispergaci polymerů T3 a PLGA rozpuštěných v dimethylsulfoxidu	61
4.8	Vliv teploty na dispergaci polymeru PLGA rozpuštěného ve směsích dimethylsulfoxidu s acetonitrilem a s acetonem	62
5.	Závěry	63
6.	Použité zdroje a obrázky	64

1. Úvod

Nanotechnologie, ačkoli poměrně mladá disciplína, je v současnosti jedním z nejdynamičtěji se rozvíjejících odvětví průmyslu. Svým působením zasahuje do značně rozsáhlé části lidské výrobní činnosti. Od armádních aplikací přes textilie až po medicínu, tam všude se můžeme setkat s člověkem vytvořenými částicemi a strukturami ne většími, nežli 10^{-7} v oblasti biologických věd pak 10^{-6} metru.

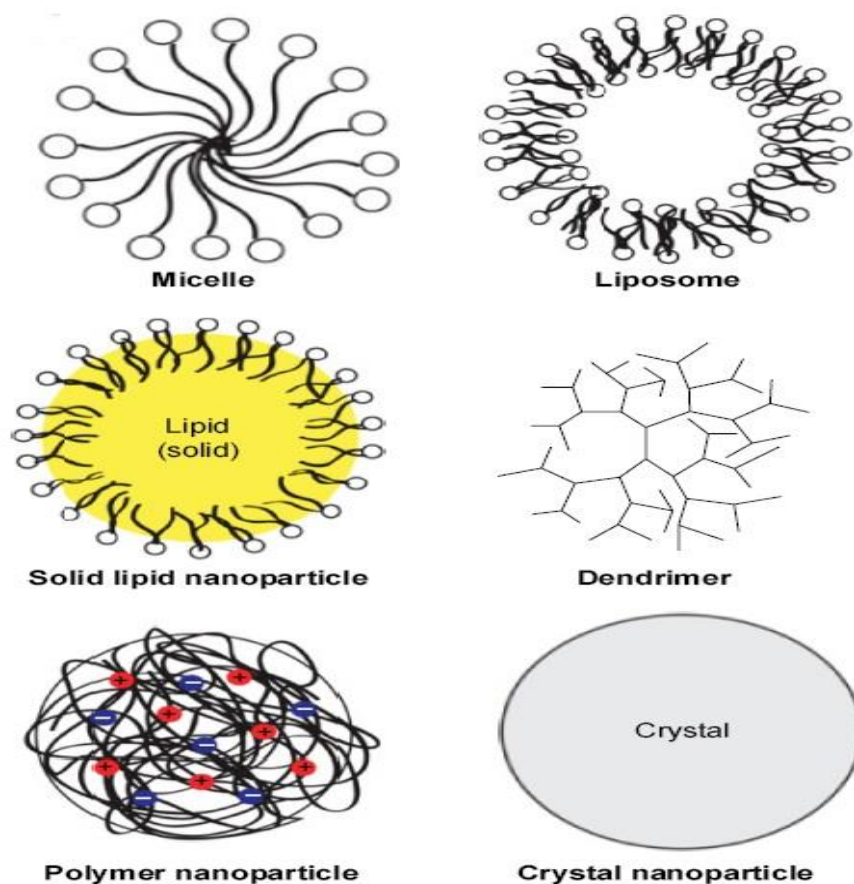
Nelze opomenout její současný i budoucí přínos pro medicínu, farmaceutický průmysl a výzkum. Zcela reálné je užití nanočástic pro transport léčiv, která mají vysoký interakční potenciál či jsou nositeli velké škály nežádoucích účinků. Svou roli také mohou sehrát při diagnostice či genové terapii. Jako velice slibné se jeví použití tzv. cíleně naváděných nanočástic, které pomocí specifické povrchové úpravy jsou schopny vázat se na specifické receptory či struktury cílených buněk[1].

Nicméně rychle se rozvíjející technologie s sebou přináší i celou řadu problémů a rizik. U nanotechnologií tomu není jinak. Při zpracovávání a výrobě je člověk vystaven nadměrné expozici těchto částic, což s sebou nese rizika pro jeho zdraví. Jedním z nejvíce postižených orgánů jsou plíce, kde mohou nanočástice vyvolat akutní exacerbace u onemocnění jako astma či CHOPN[2]. Jeden z mechanismů poškození tkáně je připisován tzv. oxidativnímu stresu, který vyvolává aktivaci transkripčních faktorů pro syntézu prozánětlivých působků [3].

2. Teoretická část

2.1. Nanočástice

Nanočástice lze v oblasti biologických a lékařských věd definovat jako částicové disperze nebo také jako pevné částice v rozmezí velikosti od 10 do 1000 nanometrů[4]. Mezi nejběžnější nanočástice patří micely, liposomy, pevné lipidové nanočástice, dendrimery, polymerní nanočástice či krystalové nanočástice.



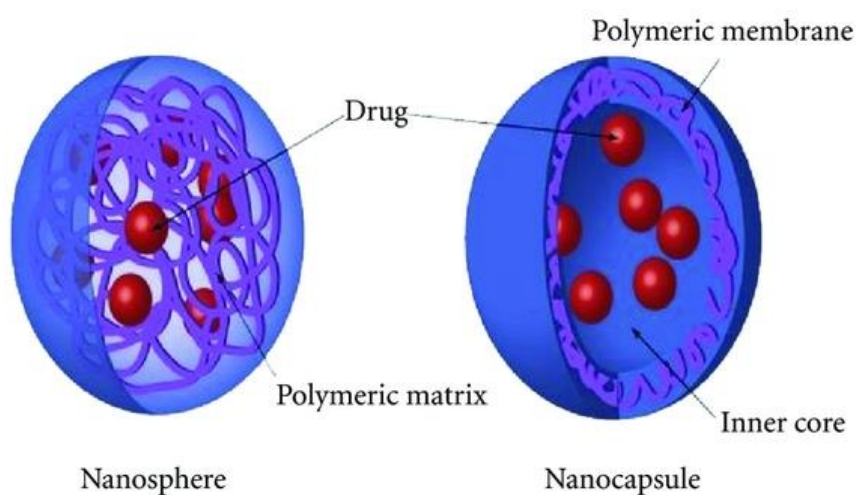
Obr. 1 – Druhy nanočástic[1]

2.1.1 Polymerní nanočástice

Rozlišujeme dva typy polymerních nanočástic s odlišným systémem uložení léčiva vůči polymeru - nanosféry nebo nanokapsule.

Pro nanokapsuly je typické uzavření přenášené látky ve vnitřním jádře samotné částice. Látka je takto oddělena polymerní membránou vnějšího prostředí. Oproti tomu u nanosfér je látka přenášená částicí dispergována v celém objemu polymerní sítě.[5]

Nejčastěji využívanými polymery jsou PLGA, PEG, PLA, PCL, T3 a chitosan.



Obr. 2 – Rozdíl mezi nanosférou a nanokapsulou[2].

2.1.2 Liposomální a micelární nanočástice

Oba tyto typy nanočástic tvoří fosfolipidy, avšak vzájemně se liší počtem fosfolipidových vrstev.

Micelární nanočástice jsou tvořeny pouze jednou vrstvou fosfolipidů, přičemž svou hydrofilní část mají umístěnou na vnějším okraji micely a hydrofobní část se orientuje do vnitřku částice. Logicky je tedy možno využít micelární nanočástici jako nosič pro lipofilní léčivo.

Liposomová nanočástice se sestává z dvojvrstvy fosfolipidů a hydrofilní část zde tvoří vnější i vnitřní hranici liposomu. Znázorněno je na obr. 1. Uvnitř samotné částice se nachází vodné prostředí. Tohoto lze využít pro transport hydrofilních léčiv uvnitř této částice, kdežto lipofilní prostor ve dvojvrstvě je vhodný pro lipofilní léčivo. [6] Liposomy mohou obsahovat i několik fosfolipidových dvojvrstev.

2.1.3 Pevné lipidové nanočástice

Tento druh nanočástic je specifický použitím pevného lipidového jádra, které má fosfolipidový obal. Jak je patrné, tento typ částic je vhodný pouze pro lipofilní léčiva, avšak poskytuje několik výhod oproti předchozím typům nanočástic. Mají vyšší stabilitu než liposomy a zároveň menší toxicitu než některé polymerové nanočástice.[8]

Rozlišujeme tři základní typy pevných lipidových částic, podle rozložení léčiva v lipidové složce.



Obr.3 – Základní typy lipidových částic[3]

Dále rozlišujeme tři typy modifikovaných pevných lipidových částic. Amorfní typ, imperfektní typ a složený typ. [7]

Amorfní typ kombinuje pevné triglyceridy s tekutými triglyceridy středně dlouhých řetězců, což má za následek vyšší stabilitu transportovaného léčiva.

Imperfektní typ obsahuje prostorově rozdílné tuky a toto dovoluje inkorporaci většího množství léčiva.

Složený typ přidává do pevného lipidu kapalnou olejovou příměs, což má za následek zlepšení rozpustnosti některých léčiv.[7]

2.2. Laboratorní příprava polymerních nanočástic

Nanočástice mohou být připraveny z řady surovin a to od látek přírodního původu jako jsou bílkoviny a polysacharidy až po polymery získané pomocí chemické syntézy.

Při výběru vhodné suroviny se řídíme jejich vlastnostmi na základě námi požadovaných kritérií. Tyto jsou zejména:

- Velikost částic, povrchové vlastnosti a rozpustnost ve vodě.
- Toxicita, kompatibilita s živým organismem a biologická odbouratelnost
- Schopnost působit jako antigen, požadovaný způsob uvolňování léčiva

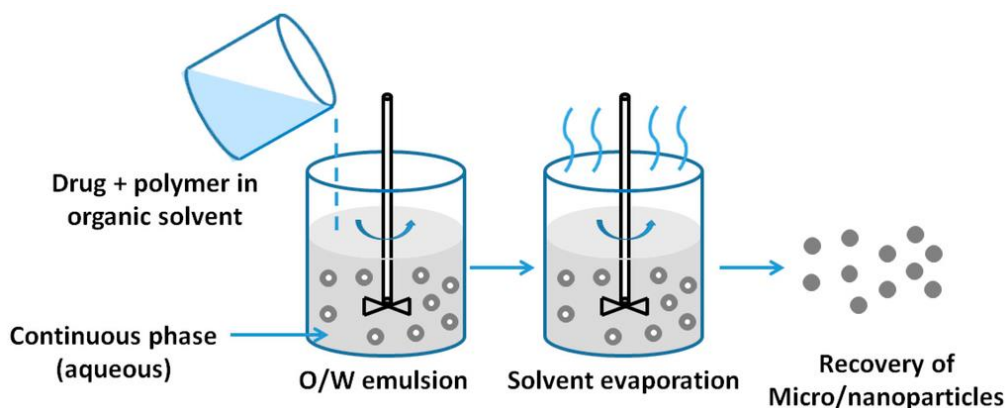
V současné době se nanočástice nejčastěji připravují pomocí tří postupů. Disperzí již předem připraveného polymeru, metodou koacervace, polymerizací z monomerů. Méně častou metodou přípravy nanočástic je použití technologie superkritické kapaliny.[8]

2.2.1 Disperze předem připraveného polymeru

Tato technika obsahuje dva mírně odlišné postupy přípravy. Prvním je metoda odpařování rozpouštědla, při které se polymer nechá rozpustit v těkavém organickém rozpouštědle jako je například ethylacetát nebo dichlormetan či ethylmethylketon. Po dokonalém rozpuštění se tato kapalina přidá k již předem připravenému vodnému roztoku s příměsí emulgátoru (o/v). Emulze se homogenizuje s cílem vytvořit co nejjemnější disperzi. Následným mícháním na magnetické míchačce dochází k odpařování rozpouštědla[9]. Vzniklé částice jsou následně extrahovány pomocí ultracentrifugace. Takto jsou často zpracovávány biologicky odbouratelné polymery jako PLGA, T3, PLG, PLA, PCA.

Pokud je potřeba zapracovat do vzniklé částice lipofilní léčivo, stačí jej přidat k rozpuštěnému polymeru s organickým rozpouštědlem a vytvořit emulzi o/v. U hydrofilního léčiva je však nutno připravit složenou emulzi v/o/v, aby bylo léčivo obsaženo ve vnitřní vodné fázi. Toho lze docílit tak, že se vodný roztok s obsahem léčiva přidá k organickému rozpouštědлу obsahujícímu emulgátor v/o. Do vzniklé emulze (v/o) se poté přimísí vodný roztok obsahující emulgátor o/v a vzniká složená emulze v/o/v. [10]

Metoda poskytuje poměrně kvalitní produkty, avšak její hlavní nevýhodou je značná časová náročnost zejména při odpařování rozpouštědla.[10]



Obr. 4 – Metoda odpaření rozpouštědla[4].

U spontánní emulgace se jedná o modifikovanou verzi předešlé metody. K tvorbě částic se využívá mezipovrchových turbulentních proudů, vznikajících mezi hydrofilní a hydrofobní fází při vzájemném smísení. V hydrofobní fázi je kromě léčiva, polymeru a s vodou částečně mísitelného organického rozpouštědla použito malé množství s vodou nemísitelného rozpouštědla. Hlavní výhodou je nenáročnost celého procesu[11].

2.2.2 Koacervační metoda

Používají se odbouratelné polymery přírodního původu jako alginát sodný získávaný z mořských řas, chitosan z krunýřů korýšů nebo želatina vyráběná z nezpracovaných zbytků po jatečních zvířatech. [12]

Postup je zatím úspěšně aplikován při tvorbě nanočástic na bázi chitosanu. Podstatou této metody je interakce mezi pozitivně nabitými skupinami chitosanu ve vodném roztoku s negativně nabitými skupinami vodného roztoku tripolyfosfátu sodného, jež je přidáván k polymeru.[13] Pokud je zapracováváno léčivo, přidává se do k roztoku chitosanu na počátku přípravy.

2.2.3 Polymerizace z monomerů

Emulzní polymerizace náleží mezi jedny z nerychlejších metod vůbec. Lze je rozdělit na dvě podskupiny, dle použití vnější fáze.

Metodika, při které se používá organická fáze jako vnější fáze, je dnes méně využívána, neboť je při přípravě nutné použít velké množství potenciálně toxických chemikálií jako organických rozpouštědel, povrchově aktivní látek, emulgátorů. Takto byly připravovány polyakryamidové nanosféry [14].

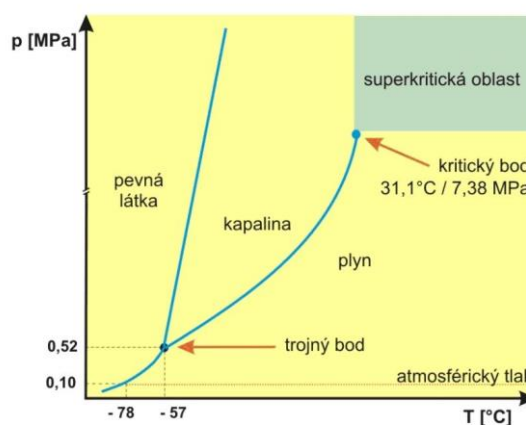
Pokud se použije voda jako vnější fáze, rozlišujeme metodu konvenční a metodu bez použití emulgátoru.

Při konvenční metodě se málo rozpustný polymer disperguje ve vodném prostředí za přítomnosti radikálového iniciátoru a emulgátoru. Molekuly monomeru jsou solubilizovány do micel, v nichž probíhá samotná polymerizace. Vzniklé částice se posléze oddělí centrifugací a vyčistí. Velikou výhodou tohoto provedení je vznik nanočástic přibližně stejné velikosti[10].

U emulzní polymerizace bez přítomnosti emulgátoru se monomer nechá jednoduše rozpustit ve vnější fázi a proces polymerizace započne použitím vhodného iniciačního činidla, iontu nebo radikálu. Může být použito vysokoenergetického záření. Separace a formování částic probíhá ještě před nebo až po ukončení polymerizace. Výhoda této metody je zřejmá, naopak nevýhodou je vysoká polydisperzita vzniklých nanočástic[10].

2.2.4 Příprava nanočástic pomocí superkritické kapalinové technologie

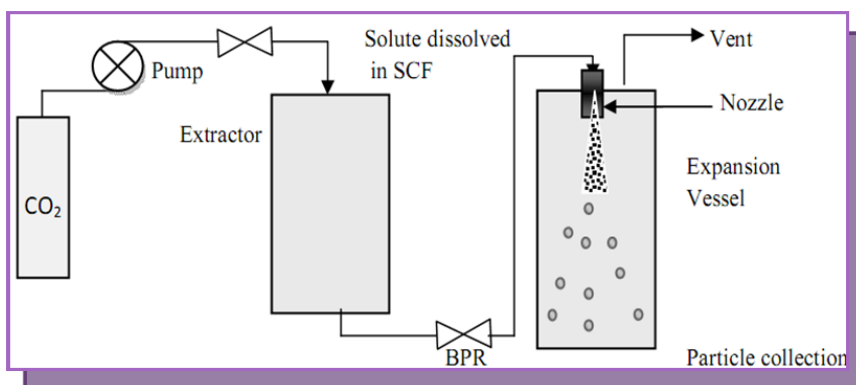
Většina tradičních metod jako výše zmíněné používají organická rozpouštědla, která mohou představovat potencionální ekologické i fyziologické riziko. Z tohoto důvodu byla zkoumána možnost použití technologie superkritických kapalin při tvorbě biologicky odbouratelných nanočástic. Superkritická kapalina může být definována jako látka, jejíž teplota i tlak je nad kritickou hodnotou a vykazuje vlastnosti typické pro plyn i kapalinu. Sloučeninou užívanou při tvorbě nanočástic je nejčastěji superkritický CO₂, která má vhodné vlastnosti jako absenci toxicity, nehořlavost, v neposlední řadě také nízkou cenu[15].



Obr. 4 – Fázový diagram CO₂[5]

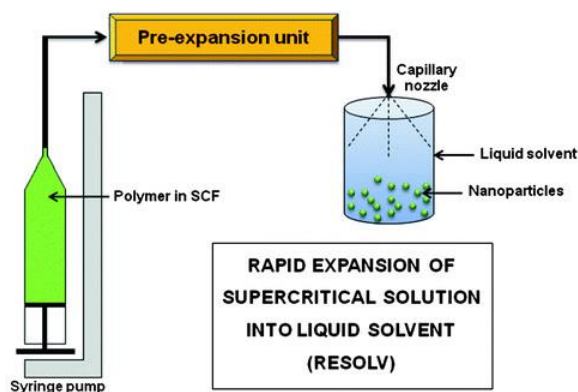
Rozlišujeme tři techniky zpracování tzv. RESS , RESOLV a SAS, jejichž princip je však podobný.

RESS (rapid expansion of supercritical solution) využívá rozpuštění polymeru v superkritické tekutině s následným rozprašováním tryskou do okolního vzduchu. Vysoký stupeň nasycení a velmi rychlé snížení tlaku při rozptylu vede k homogenní nukleaci a tvorbě dobře zformovaných částic. Nevýhodou ovšem je, že vznikají částice v řádu mikro i nanometrů[16].



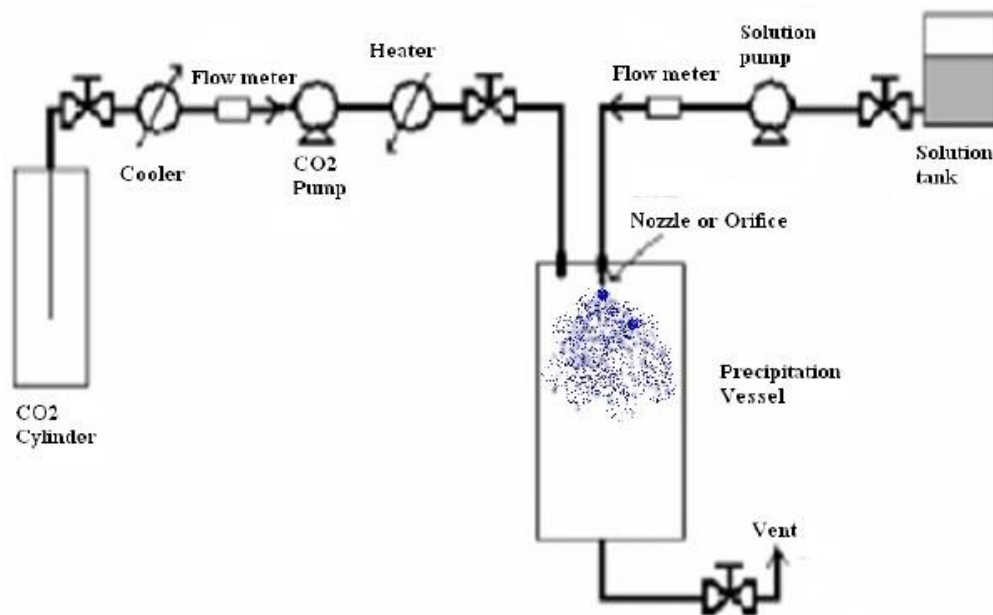
Obr. 6 – RESS metoda[6]

RESOLV (rapid expansion of supercritical solution into liquid solvent) vznikl úpravou předchozí metody, místo rozprašování superkritického roztoku do vzduchu se užívá rozprašování do tekutého média. Tato jednoduchá záměna vede k omezení tvorby větších částic a primárně k tvorbě nanočástic [17].



Obr. 7 – RESOLV metoda[7]

Technika SAS (supercritical antisolvent) zahrnuje použití tekutého rozpouštědla, nejčastěji metanolu, který se mísí se superkritickou tekutinou a zároveň se v něm rozpouští daný polymer, jež je v superkritické kapalině nerozpustný. Smísení směsi polymeru s methanolem a superkritické kapaliny vede okamžitě k precipitaci a tvorbě nanočástic[18].



Obr. 8 – SAS metoda[8]

2.3 Hodnocení nanočástic

Kvalitu nanočástic či nanočásticové suspenze můžeme hodnotit podle několika kritérií. Tou první je velikost částic, efektivita zachycování léčiv, dále se hodnotí tvar částic a zeta potenciál. Tyto informace mohou sloužit k predikci chování částice v lidském organismu, pomáhají určit stabilitu vzniklého systému nebo schopnost vázat na sebe určité látky.

2.3.1 Velikost částic

Jedná se o možná nejdůležitější parametr při výrobě nanočástic neboť určuje toxicitu, distribuci léčivé látky v organismu a schopnost cílit na vybrané struktury v lidském organismu[19].

K měření se užívá optické metody dynamického rozptylu světla[20]. Zjednodušeně lze metodu dynamického rozptylu popsat takto. Laserový paprsek generovaný emitorem prochází kyvetou a je rozptylován povrchem částic uvnitř měřeného kapalného vzorku. Dochází k zeslabování a k zintenzivňování rozptylu na podkladě Brownova pohybu částic. Lze říci, že čím jsou nanočástice menší, tím je jejich pohyb rychlejší a změny intenzity jsou větší. Intenzitu změn rozptylu zachytává detekční zařízení umístěné v 90 a 173 stupních oproti procházejícímu paprsku. Hodnoty jsou pak zpracovány matematicky pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice.[20]

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d} \longrightarrow d = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

D= translační difuzní koeficient

k= Boltzmannova konstanta

T= absolutní teplota

d= hydrodynamický průměr částice

η = viskozita disperzního prostředí

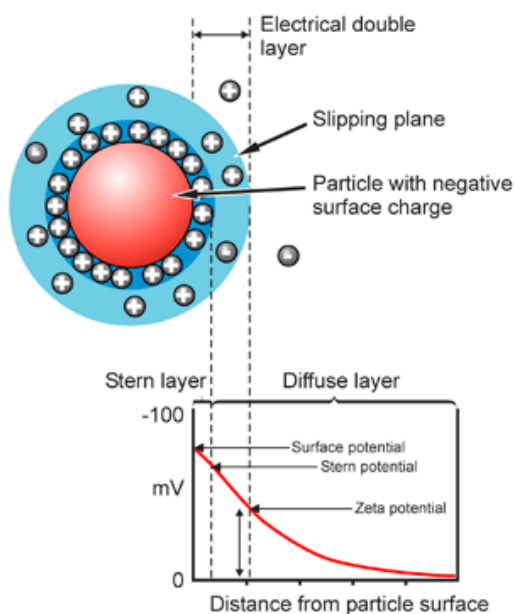
Jako hlavní výhody lze jmenovat snadnost obsluhy měřících zařízení, rychlost měření (jeden vzorek trvá řádově minuty) a absenci nutnosti před každým měřením kalibrovat měřicí přístroj[20]. Měření tak, jak je popsáno výše, probíhá na přístroji Zetasizer nano ZS firmy Malvern, který byl použit k měření vzorků u diplomové práce. U přístrojů jiných firem se mohou detaily mírně lišit.

2.3.2 Zeta potenciál

Tento parametr je důležitý z technologického hlediska, neboť udává míru stability pro připravenou disperzi nanočástic ve vodném prostředí. Může nabývat kladných i záporných hodnot a jeho jednotkou jsou milivoly [mV]. Ve své podstatě se jedná o potenciál, nacházející se na tzv. rovině skluzu[21].

Kolem nanočástice s nábojem (kladným nebo záporným) se nachází vrstva iontů náboje opačného, která povrch částice pevně obklopuje. Nazývá se Sternova vrstva. Kolem ní se pohybuje širší vrstva iontů, které jsou k částici méně přitahovány, ale pokud se částice pohne, následují ji. Existuje však hranice, po jejíž překročení ionty částici nenásledují a tato hranice se nazývá rovinou skluzu a elektrický potenciál zde se nacházející je právě potenciál zeta. [22]

Pokud hodnoty zeta potenciálu dosahují méně než -30 mV nebo více než 30 mV, lze zkoumaný systém považovat za stabilní, neboť nehrozí tvorba nežádoucích shluků.[23]



Obr. 9 – Částicové schéma[9]

Měření zeta potenciálu probíhá pomocí laserové dopplerově velocimetrie, při které se měří rychlost přesunu iontů k elektrodě opačného náboje pomocí rozptylu laserového světla procházejícího speciální celou. Ze získané hodnoty se matematickou úpravou vypočítá zeta potenciál[24].

$$U = \frac{\lambda * Vd}{2 * E * n * \sin(\theta/2)}$$

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon} U$$

U= pohyblivost částic

Vd= frekvenční posun

λ = vlnová délka

E= síla elektrického pole

n= index lomu prostředí

θ = úhel rozptylu světla

ζ = zeta potenciál

η = viskozita prostředí

ε = permitivita

2.3.3 Efektivita zachycování léčiv

Nanočástice jsou odděleny od vnější vodné fáze za použití ultracentrifugace. Kapalina nad sedlinou je dekantována a následně přidána k roztoku fosfátového pufru, který má hodnotu pH = 7,4. Tato procedura se několikrát po sobě opakuje. Pomocí analytických metod se stanoví množství léčiva obsaženého ve vodné fázi. Toto zjištěné množství se pak porovnává s množstvím léčiva, jež bylo použito k samotné přípravě. Výsledná efektivita zachycení se vyjadřuje v procentech. [25]

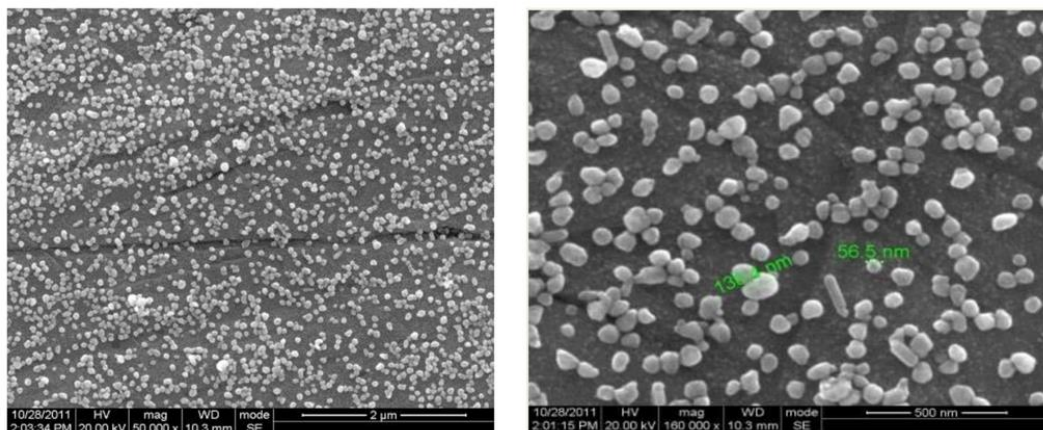
2.3.4 Tvar nanočástic

Nanočástice mohou nabývat nejrůznějších tvarů. Velice časté jsou souměrné tvary jako koule či mnohostěny, nicméně vyskytují se i tvary protáhlé nebo zploštělé[26]. K určování tvaru nanočástic slouží metody elektronové mikroskopie, nejčastěji SEM a TEM.

SEM neboli (skenovací) rastrovací elektronová mikroskopie využívá proudy elektronů zformovaných do úzkého paprsku, jež dopadá na povrch předmětu a je buď absorbován, odražen nebo vyvolá excitaci a uvolnění sekundárních elektronů ze zkoumaných objektů. Odražené elektrony a sekundární elektrony jsou zachycovány detektory. Paprsek se pohybuje po zkoumaném předmětu v určitém vzorci a odtud pramení název této mikroskopie. Výhodami této metody jsou snadná ovladatelnost přístroje a vysoké rozlišení výsledného obrazu při dostatečně velkém zvětšení[27].

TEM transmisní elektronová mikroskopie využívá také proudy elektronů, avšak tyto mají vyšší energii než u SEM a procházejí zkoumaným objektem, následně jsou zachycovány detekčním zařízením. U TEM je nutné, aby zkoumaná látka byla v co nejtenčí vrstvě, což u zkoumání nanočástic nebývá problémem. Rozlišovací schopnost je větší než u SEM[28].

Před vlastním měřením se musí vzorek upravit a pomocí lyofilizace získat pouze pevné částice. Tyto je třeba dále stabilizovat a to potažením vrstvou platiny, zlata či jiného kovu[29].

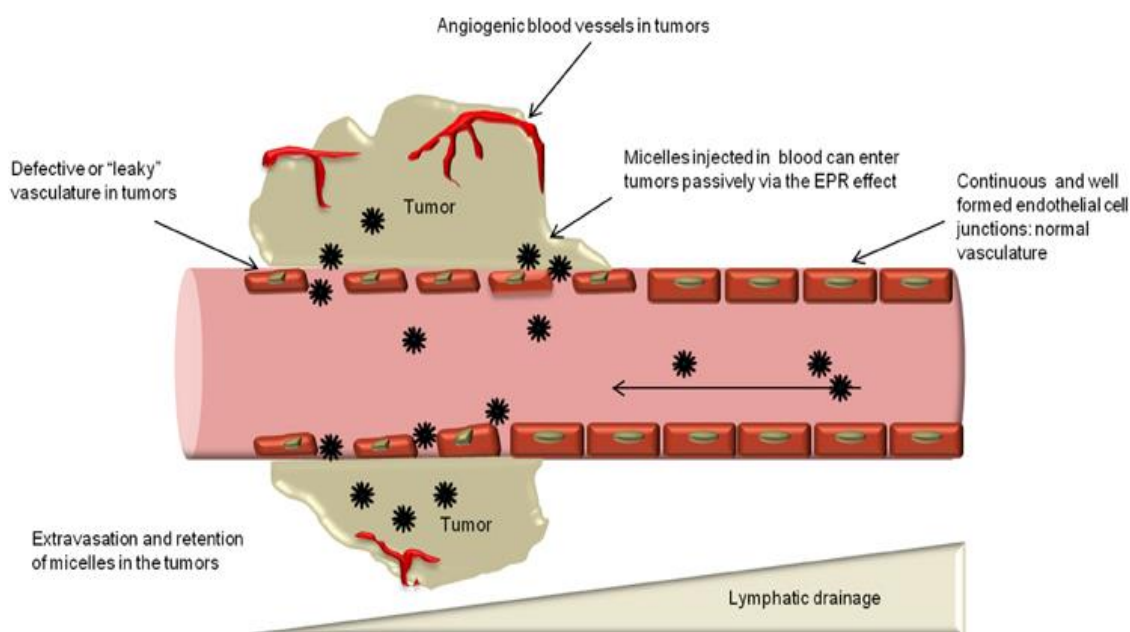


Obr. 9 – Nanočástice stříbra (SEM) [10]

2.4 Možnosti využití nanočástic při cílené léčbě

Jednou z nejdůležitějších vlastností nanočástic je schopnost být přenašečem toxických léčiv bez většího nebezpečí pro organismus. Tohoto lze využít zejména k léčbě onkologických onemocnění. K tomuto účelu slouží zejména biologicky odbouratelné nanočástice připravené například z polymeru PLGA. Při cílení se dají využívat některé výhody plynoucí ze změněné patofyziologie nádorové tkáně. Tomuto postupu se říká takzvané pasivní cílení nebo naopak pomocí změn na nanočásticovém nosiči léčiva pomocí cílově specifických ligandů[30].

Pasivní cílení využívá odlišnosti mezi zdravou tkání a tkání nádoru, která se od normální tkáně liší zejména svou větší vaskularizací a také velmi podstatně propustností zde přítomných cév, která je znatelně větší, nežli je tomu u ostatních cév v lidském organismu. Navíc u některých nádorů je porušena lymfodrenáž a toto vede ke kumulaci léčiva v nádoru a logicky ke zvýšení jeho koncentrace v místě potřeby. Ideálními nanočásticemi pro tento způsob cílení jsou takové, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 60-400 nanometrů[31]. Studie provedené Bhardwaj et al in vivo na krysách ukazují znatelné zmenšení nádoru po orálním použití paclitaxelu v nanočásticovém nosiči než po užívání orálního paclitaxelu v Cremofor® EL[32].



Obr. 10 – Přejchod nanočástic do tkáně nádoru[11]

Aktivní cílení na nádorovou tkáň může probíhat třemi způsoby a to za pomoci interakčního mechanismu ligand-receptor, antigen-protilátka a v neposlední řadě také pomocí tzv. aptamerů[31].

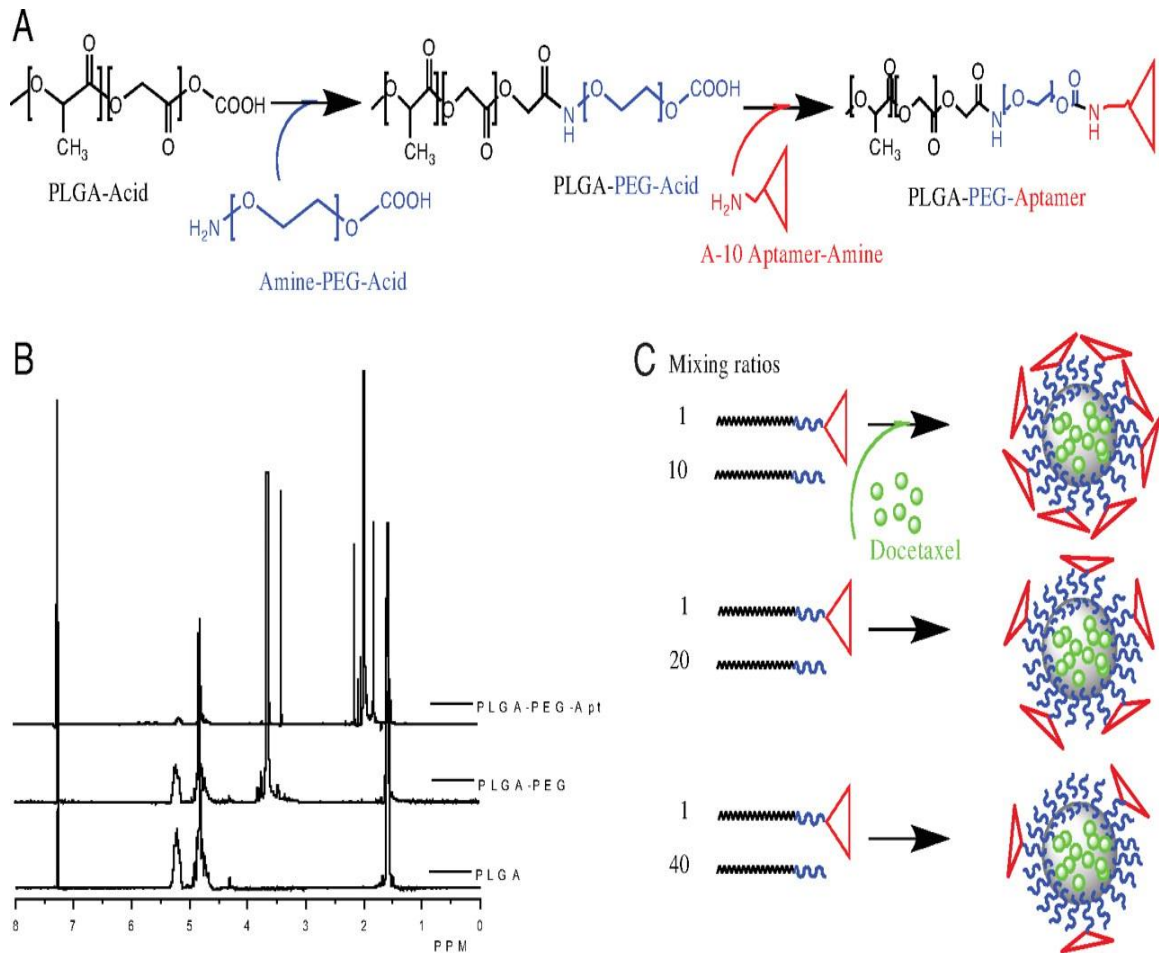
Systém ligand-receptor využívá schopnosti některých látek se ve vyšší míře vázat na povrchové receptory nádorových buněk. K tomuto účelu jsou biologicky odbouratelné nanočástice upraveny a na své povrchové vrstvě nesou navázané právě tyto aktivní látky. V určitých případech může být povrchová vrstva nanočástice ještě modifikována látkami, které výrazně zlepšují vlastnosti výsledného léčivého přípravku. Jako příklad lze uvést nanočástice tvořené diblokovým kopolymerem PLGA-PEG, při které právě PEG tvoří povrchovou vrstvu a je na něj navázána substance s vysokou afinitou k receptorům v nádorových buňkách. Yoo a Park právě takto připravili nanočástice obsahující doxorubicin při použití folátu jakožto naváděcí substance. Výsledky studie ukázaly zvýšený přenos léčivé látky do buněk nádoru a významné zmenšení nádorové tkáně, nežli při použití klasického doxorubicinu [33].

Byly provedeny i další studie jinými týmy vědců s použitím odlišných látek pro navádění, například lecitinu nebo sialové kyseliny. Mezi nejčastěji používaná modelová léčiva pro transport patří doxorubicin a paclitaxel.

U systému antigen-protilátka se spojují dvě dynamicky se odvíjející odvětví ve farmaceuticko-medicínské sféře a to nanotechnologie a výzkum tzv. monoklonálních protilátek. Tyto protilátky se zde využívají proti specifickým antigenům, jež se nacházejí se na povrchu nádorové buňky. Kocbek et al takto připravili nanočástice PLGA s použitím monoklonálních protilátek proti membránovému proteinu MCF-7, který je přítomen v buňkách maligního nádoru prsní tkáně[34]. Výhodou je značná vyhraněnost k určitému typu buněk, což vede ke snížení dopadu léčby na buňky zdravé. Jednou, v USA již schválenou látkou pro toto použití, je transtuzumab, který je protilátkou proti HER2[35].

Cílení pomocí aptameru využívá velmi krátké oligonukleotidové řetězce DNA nebo RNA, jež jsou schopny se, podobně jako protilátky popsané v přechozím odstavci, velice selektivně vázat na určité antigeny v cílových strukturách nádorové buňky[32].

Farokhzad, Langer et al takto vytvořili nanočástice PLGA-PEG nesoucí doxorubicin, jež jsou naváděny pomocí A10 20-fluoropyridin RNA aptameru, který se specificky váže prostatický specifický antigen[36].



Obr. 11 – Příprava nanočástic PLGA-PEG s aptamerem A10 A) chemická reakce B) NMR C) míscí poměry [12]

3. Experimentální část

3.1. Seznam použitých chemikálií a jejich zkratek

Rozpouštědla:	Zkratky
- Aceton, Sigma-Aldrich	ACET
- Acetonitril, Sigma-Aldrich	ACN
- Dimethylsulfoxid, Merck	DMSO
- Ethylacetát, Lachner	EtAc
- Ethylmethylketon, Lachner	EMK
- Čištěná voda, FaF UK	
- Methanol, Penta	MeOH
Emulgátory:	
- Cetrymid, Merck	CET
N- cetyl- N, N, N- trimethylammoniumbromid	
- Gluadin®, BASF	GLA
Hydrolizovaný obilný protein	
- Laurylsíran sodný, Merck	NaLS
- Laurethsíran sodný, Merck	NaLES
- Lecithin, Merck	LEC
- Luviquad® FC 550, BASF	LUQ
Poly[(3-methyl-1-vinylimidazolium chlorid)-co-(1-vinylpyrrolidon)]	
- Polysorbát 20, Dr.Kulich	PS

Polymery:	Zkratky
- Poly(mléčná-co-glykolová kyselina), FaF UK	PLGA
- Terpolymer kyseliny DL- mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu , FaF UK	T3
Léčivé látky:	
- Terbinafin, Saneca	TER

3.2. Použité přístroje

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

Homogenizátor DiAx 900 Heidolph, 8000- 26000 ot. / min., 6 pásem

Zetasizer ZS, Malvern Instruments, UK Zetasizer ZS 90

Váhy Kern 440-35N, max 400 g, d = 0,01 g

Analytické váhy Kern, max 220 g, d = 0,0001 g

Stopky DS 35 ZPA PRAGOTRON

3.3. Příprava fází a nanočástic

Vnitřní fáze – Do 25ml kádinky se naváží předem připravený polymer (T3,PLGA), ten se rozpustí v organickém rozpouštědle (DMSO, EMK, EtAC, ACET). Vzniklé roztoky mají koncentraci polymeru 1% nebo 3%. Množství vnitřní fáze je 10g při přípravě 20% emulze. Pokud se připravuje emulze 10% celkové množství vnitřní fáze je 5g. U vzorků s obsahem léčivé látky byla použita předem vytvořená volná baze terbinafinu, jež se v příslušném množství rozpustila ve vnitřní fázi.

Vnější fáze – Do 100ml se naváží množství emulgátoru potřebné pro přípravu roztoku o příslušné koncentraci (2%; 1%; 0,6%; 0,3%; 0,2%; 0,1%). Emulgátor se rozpustí v čištěné vodě. Množství vnější fáze je 40g u 20% emulze, 45g u 10%, 47,5 u 5%.

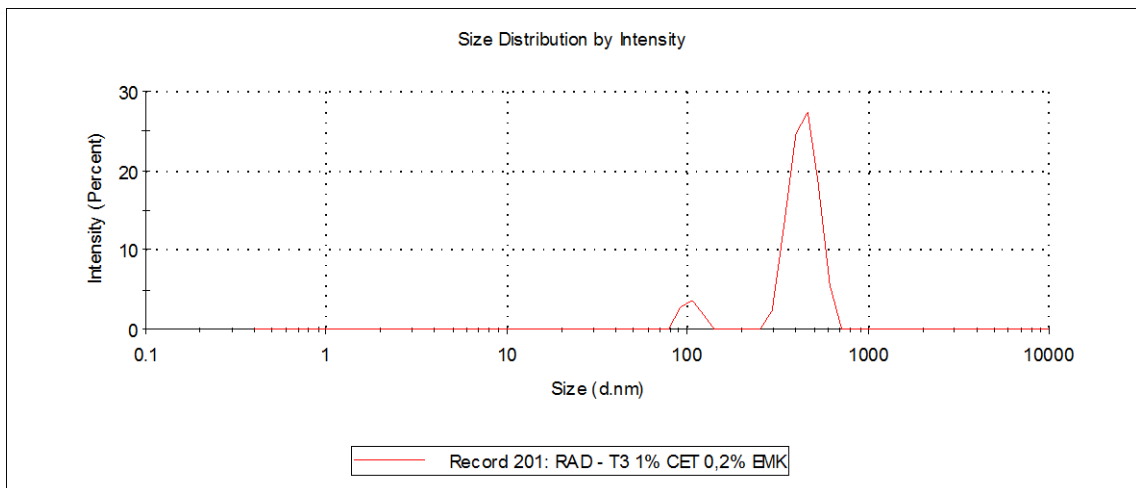
Do kádinky s vnější fází se umístí hlavice turbíny homogenizátoru tak, aby hlavice byla zhruba 0,5 cm pod hladinou, homogenizátor se spustí na nejmenší otáčky, Po přidání vnitřní fáze se na 30 sekund pustí na plné otáčky. Vzniklá směs se nechá dvě hodiny míchat na magnetické míchače a po té se měří velikost částic a zeta potenciál.

3.4. Výsledky, tabulky a grafy

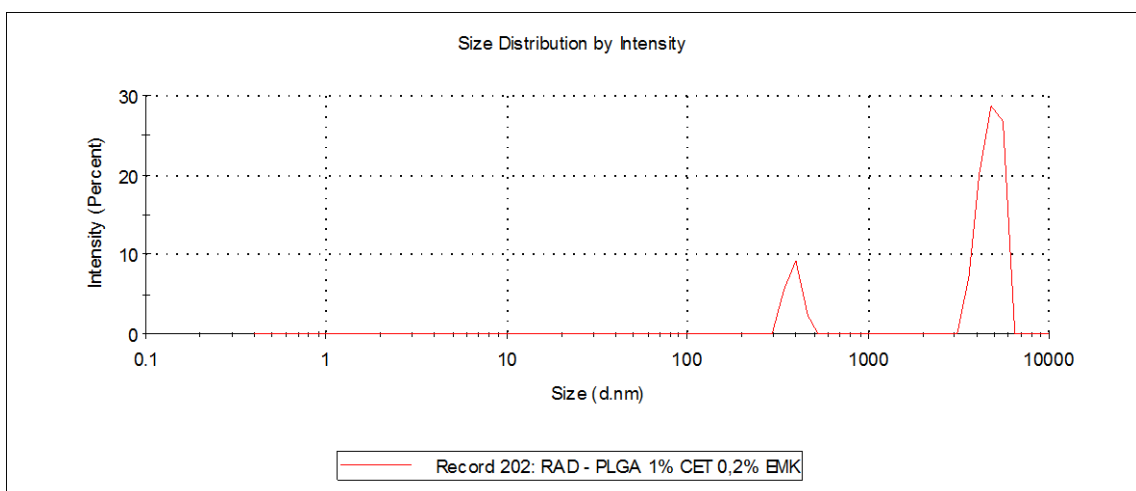
Tabulka č. 1

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
1.	T3 1%	20%	CET 0,2%	EMK	445,6	104,4	700,5
2.	PLGA 1%	20%	CET 0,2%	EMK	4778	378,1	2521
3.	T3 1%	20%	NaLS 0,2%	EMK	320,7	0	2593
4.	PLGA 1%	20%	NaLS 0,2%	EMK	2400	0	2496

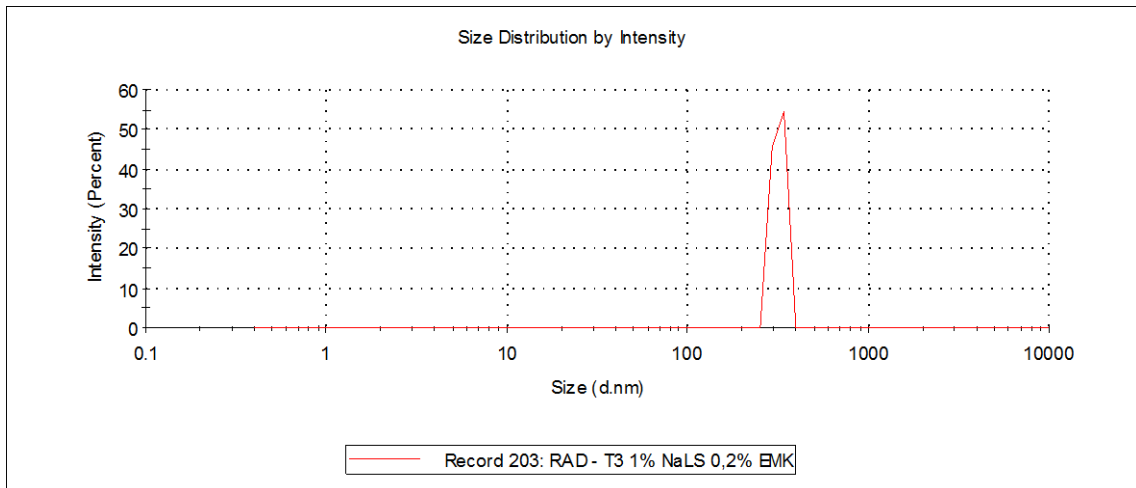
Frekvenční křivka vzorku č. 1



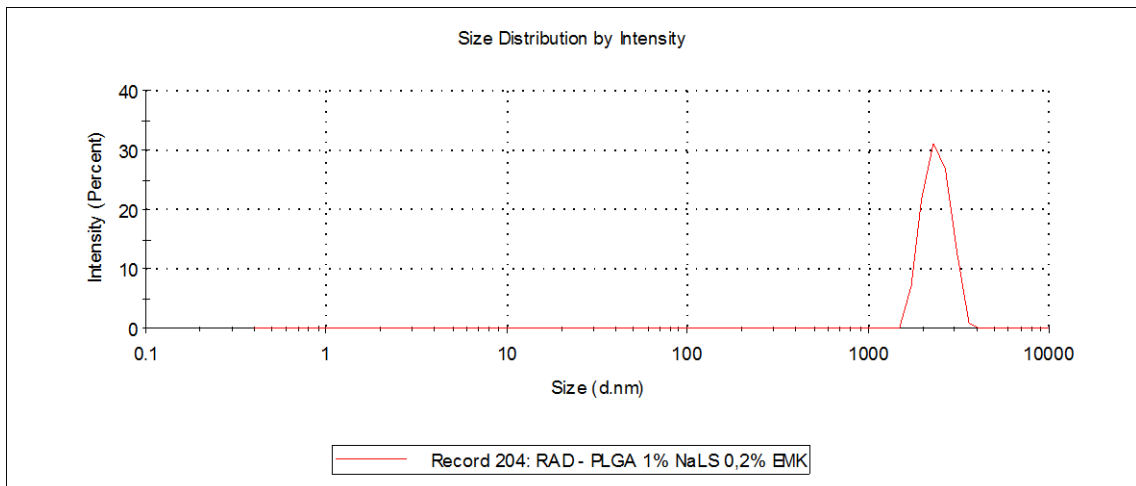
Frekvenční křivka vzorku č. 2



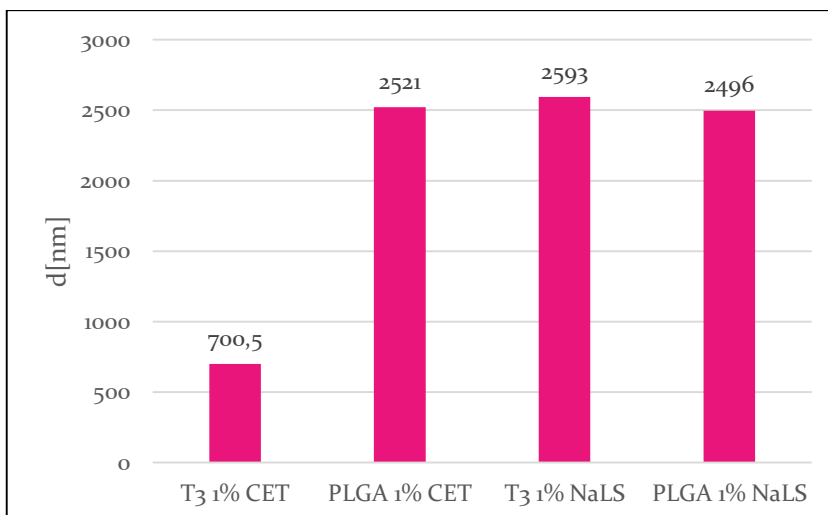
Frekvenční křivka vzorku č. 3



Frekvenční křivka vzorku č.4



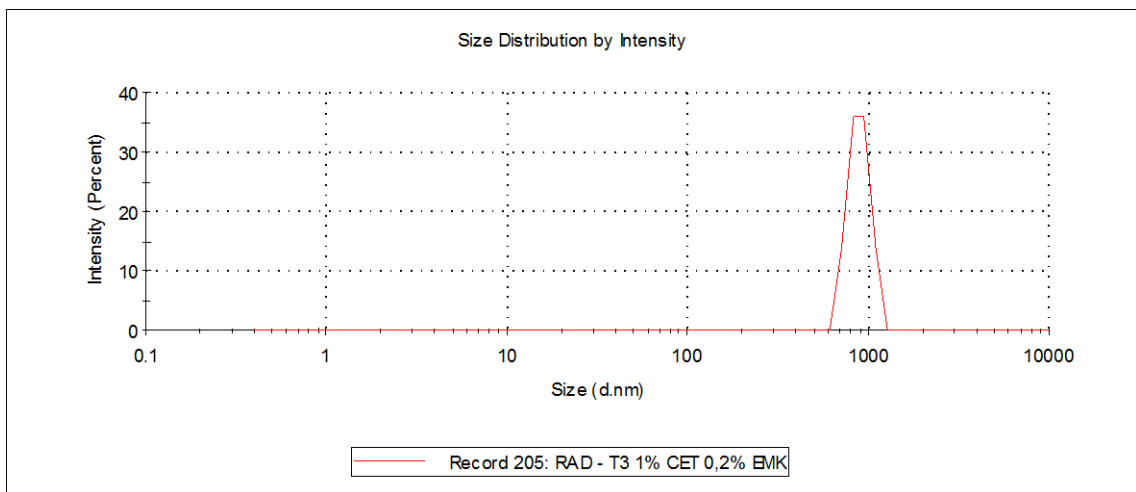
Vliv emulgátoru na velikost částic při použití jeho 0,2% koncentrace



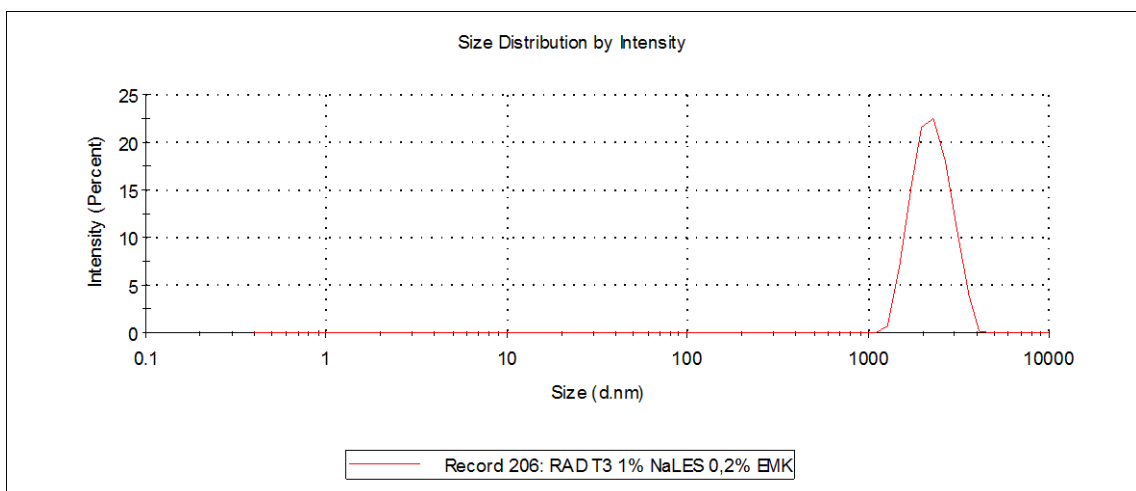
Tabulka č. 2

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
5.	T3 1%	20%	CET 0,2%	EMK	895,8	0	1986
6.	T3 1%	20%	NaLES 0,2%	EMK	2287	0	2348
7.	T3 1%	20%	NaLS 0,2%	EMK	432	0	984,7
8	T3 1%	20%	PS+LEC 1%	EMK	602,2	41,63	619,6

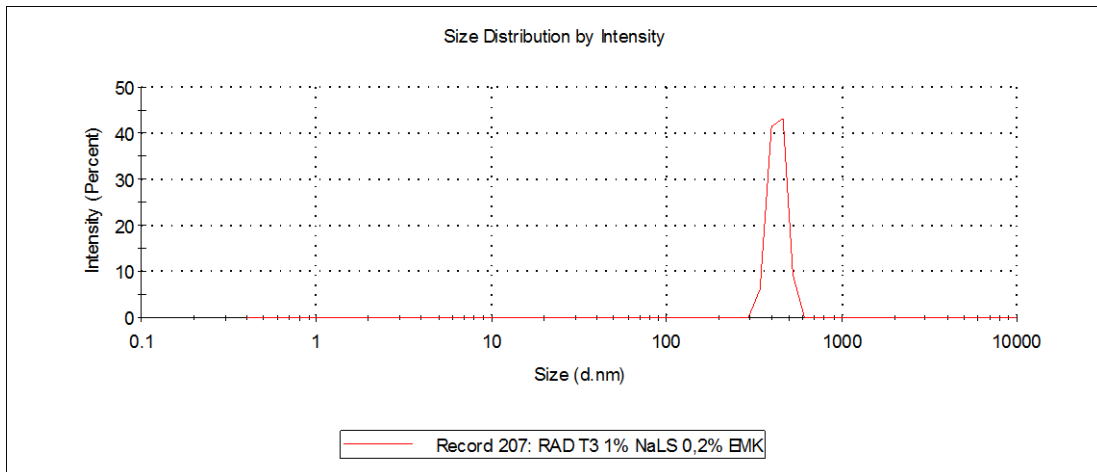
Frekvenční křivka vzorku 5



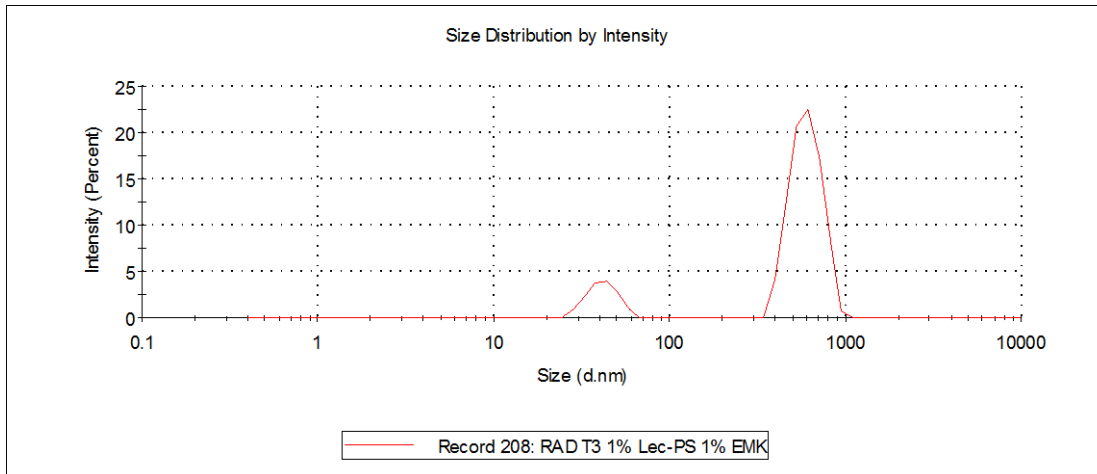
Frekvenční křivka vzorku 6



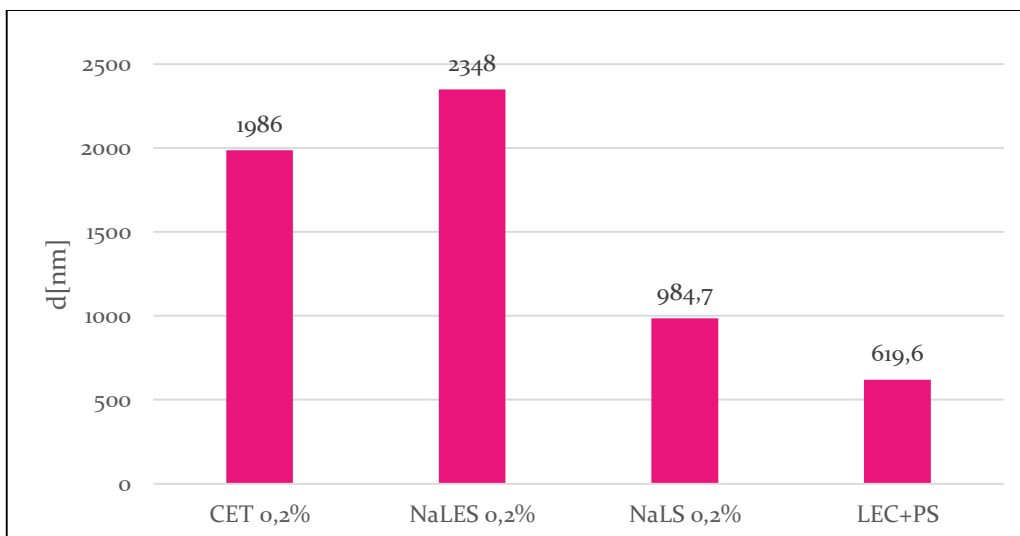
Frekvenční křivka vzorku 7



Frekvenční křivka vzorku 8



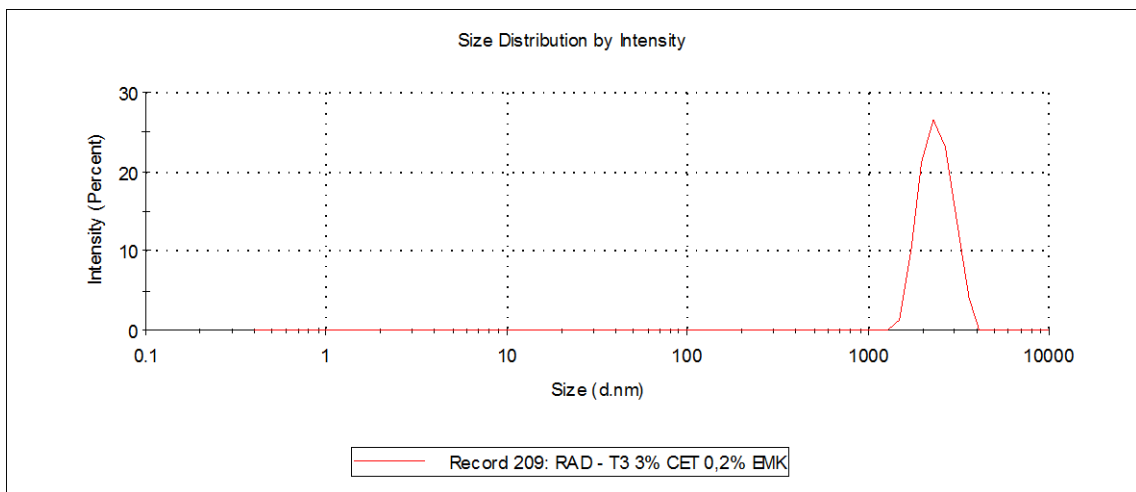
Vliv různých emulgátorů na velikost částic u 1% polymeru T3



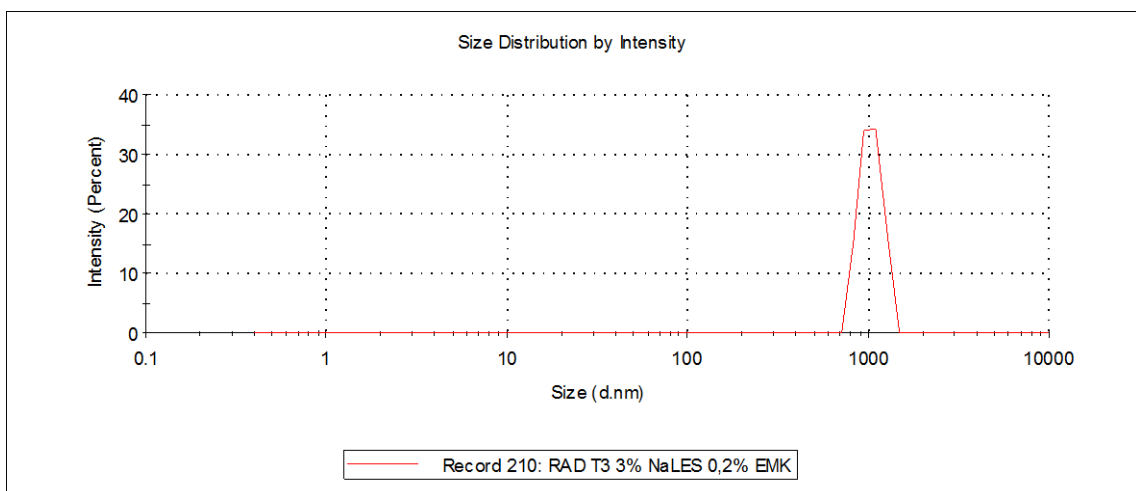
Tabulka č. 3

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
9.	T3 3%	20%	CET 0,2%	EMK	2408	0	2555
10.	T3 3%	20%	NaLES 0,2%	EMK	1040	0	2412
11.	T3 3%	20%	NaLS 0,2%	EMK	319,7	0	1565
12.	T3 3%	20%	PS+LEC 1%	EMK	460,1	17,30	1471

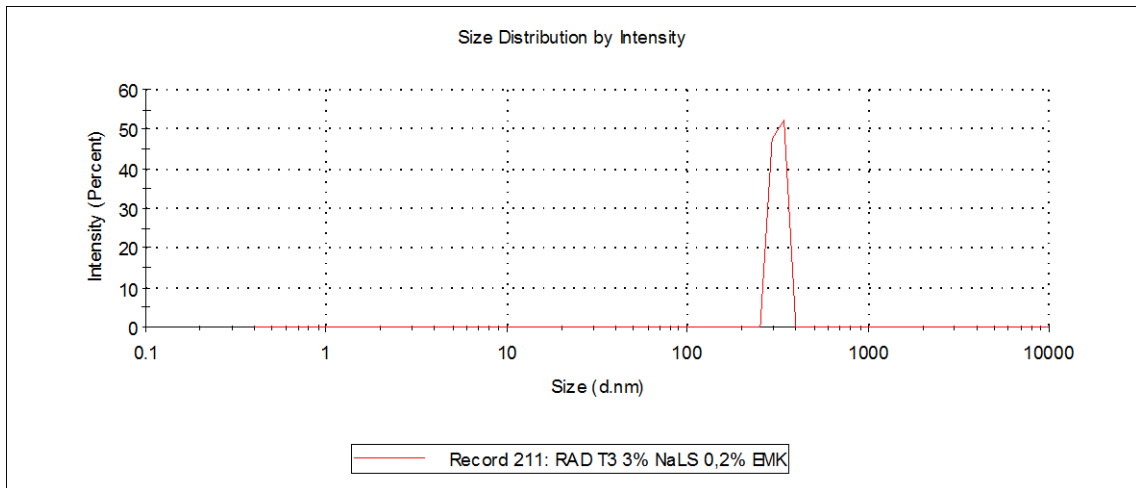
Frekvenční křivka vzorku 9



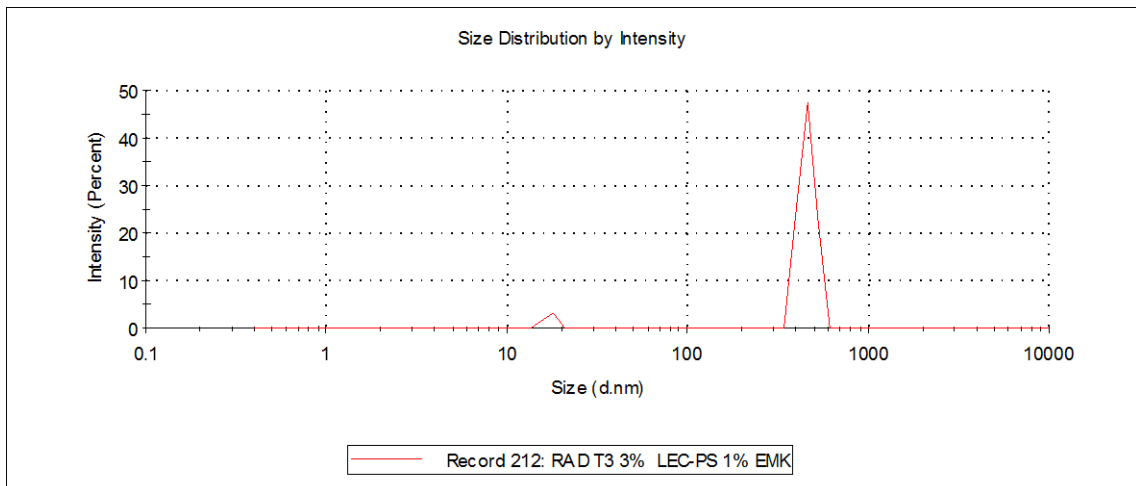
Frekvenční křivka vzorku 10



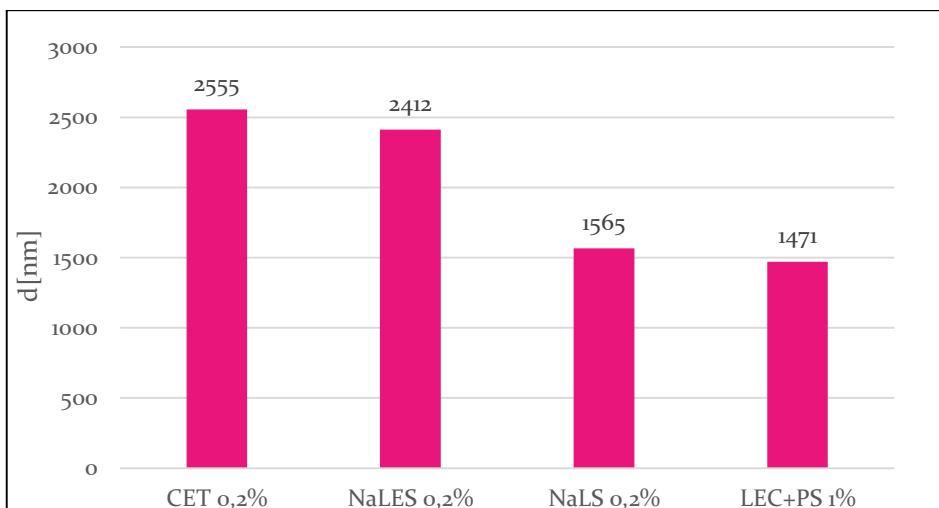
Frekvenční křivka vzorku 11



Frekvenční křivka vzorku 12



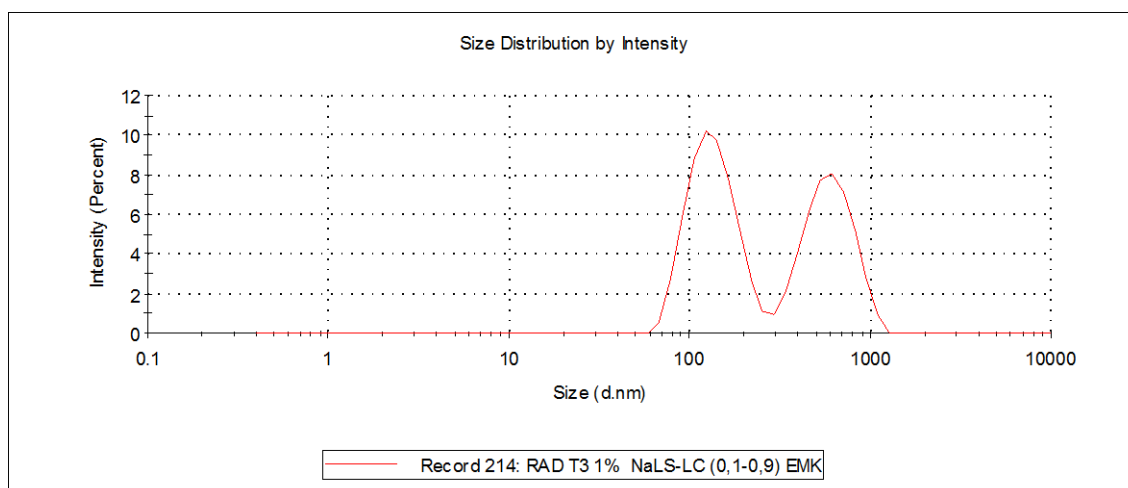
Vliv různých emulgátorů na velikost částic u 3% polymeru T3



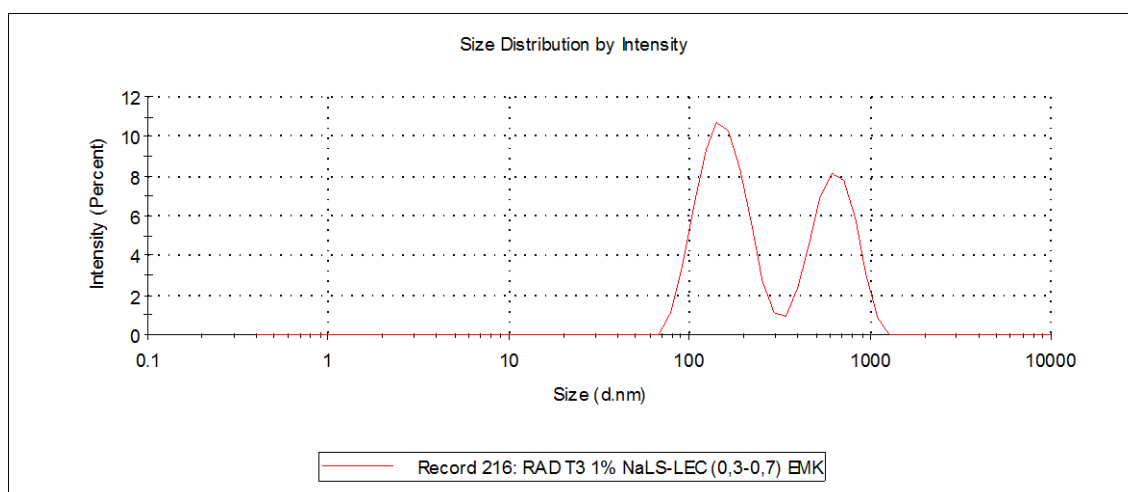
Tabulka č. 4

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
13.	T3 1%	20%	NaLS-LEC 1% (0,1%+0,9%)	EMK	139,6	610,4	238,9
14.	T3 1%	20%	NaLS-LEC 1% (0,3%+0,7%)	EMK	159,4	648,7	290,1
15.	T3 1%	20%	NaLES-LEC 1% (0,1%+0,9%)	EMK	657,6	169	279,4
16.	T3 1%	20%	NaLES-LEC 1% (0,3%+0,7%)	EMK	134,9	385,6	219,5

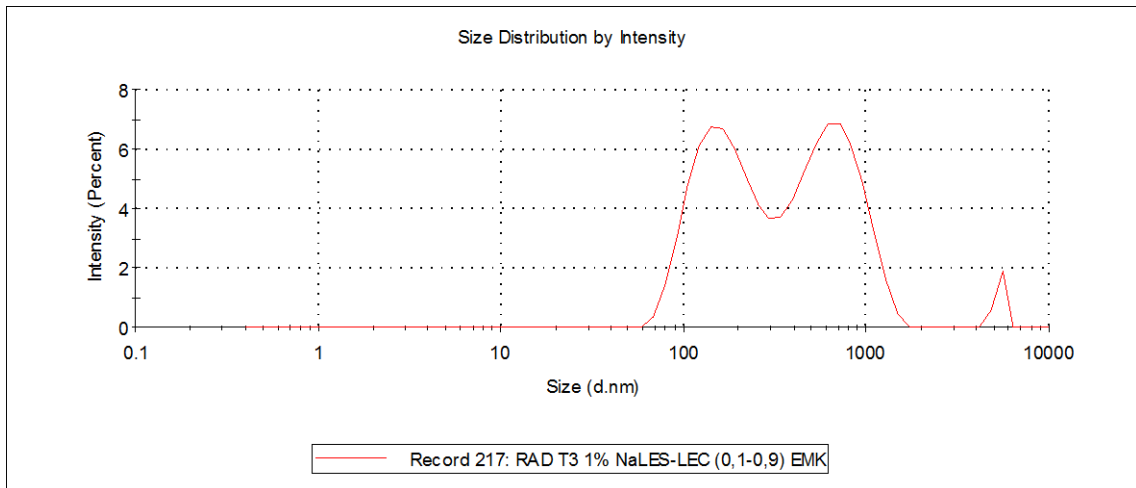
Frekvenční křivka vzorku 13



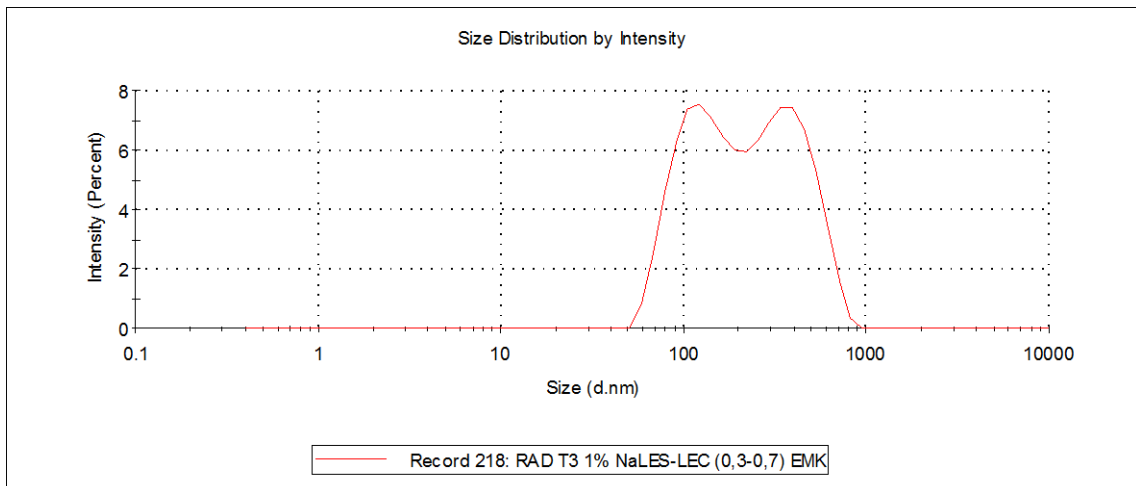
Frekvenční křivka vzorku 14



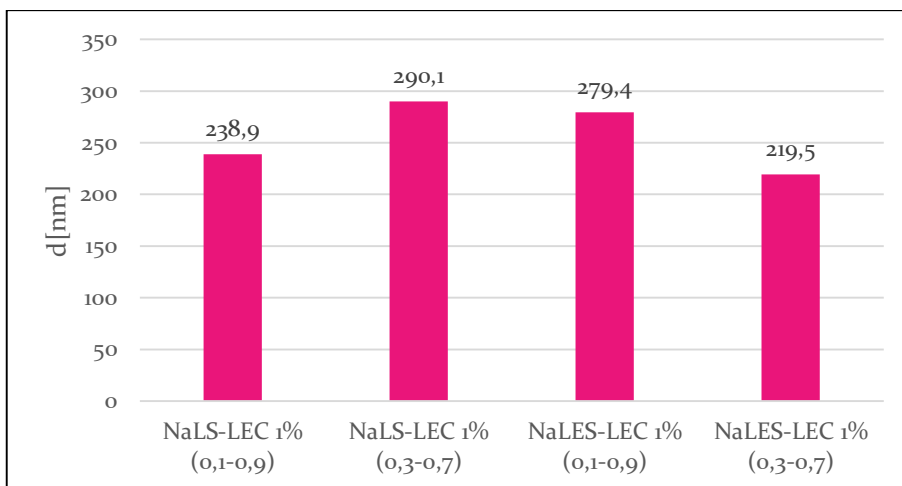
Frekvenční křivka vzorku č.15



Frekvenční křivka vzorku č.16



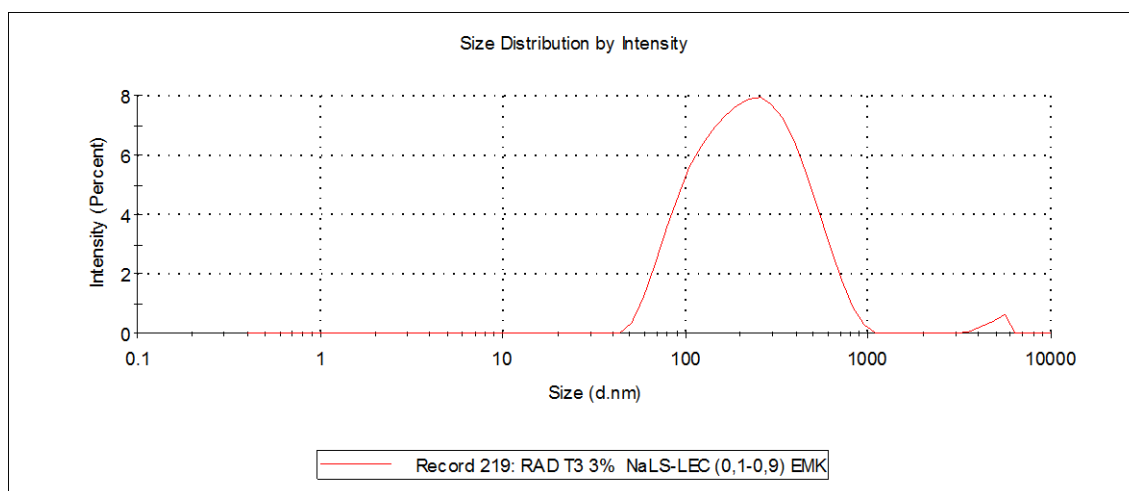
Vliv směsí emulgátorů o různých poměrech na velikost částic u 1% polymeru T3



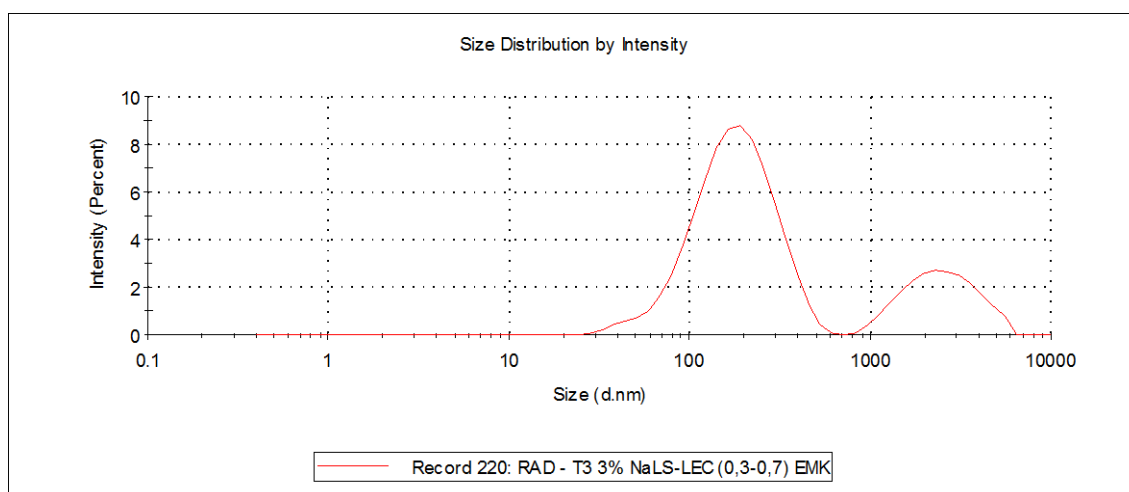
Tabulka č. 5

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
17.	T3 3%	20%	NaLS-LEC 1% (0,1%+0,9%)	EMK	262	4998	187,7
18.	T3 3%	20%	NaLS-LEC 1% (0,3%+0,7%)	EMK	192,4	2642	200,6
19.	T3 3%	20%	NaLES-LEC 1% (0,1%+0,9%)	EMK	209,2	4761	172,4
20.	T3 3%	220%	NaLES-LEC 1% (0,3%+0,7%)	EMK	219,8	4600	186,8

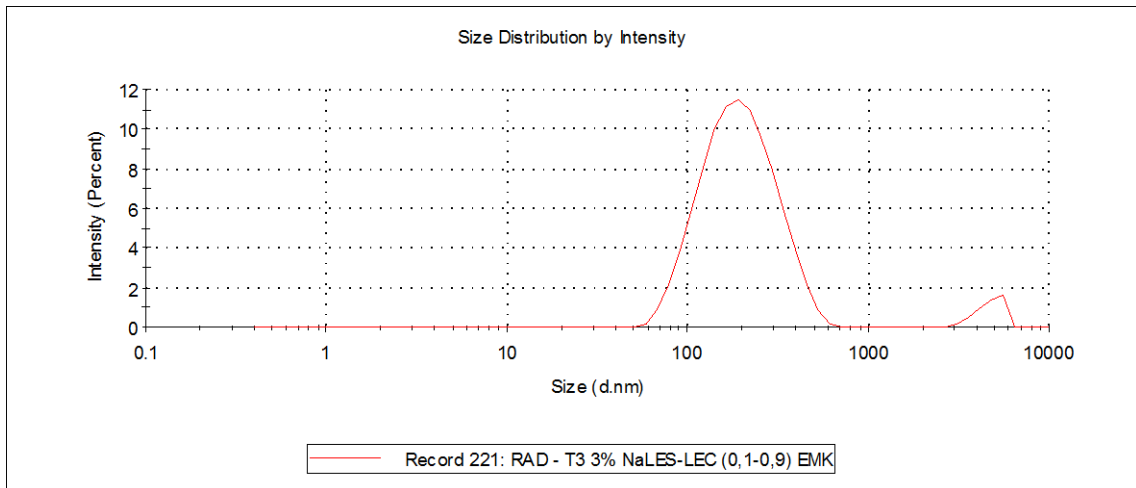
Frekvenční křivka vzorku 17



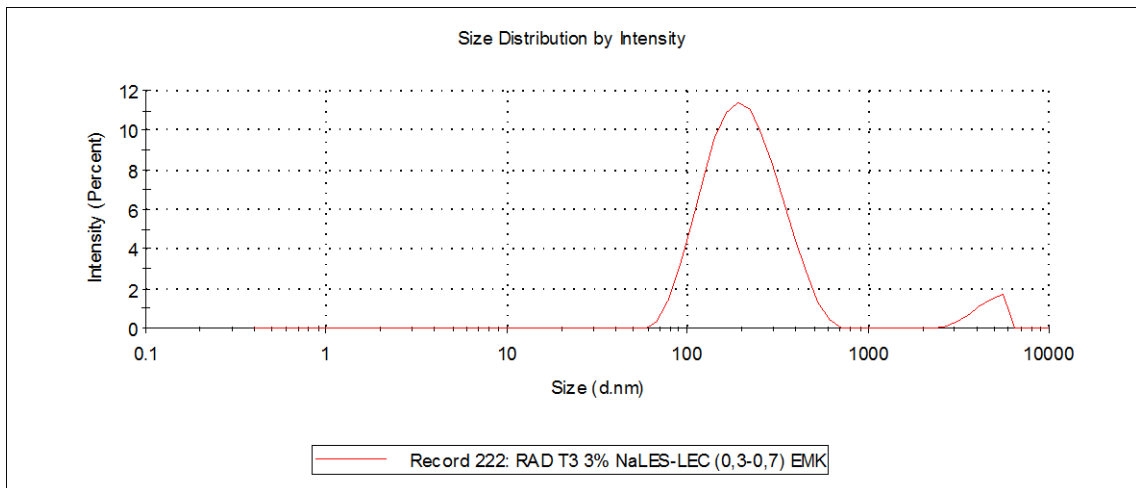
Frekvenční křivka vzorku 18



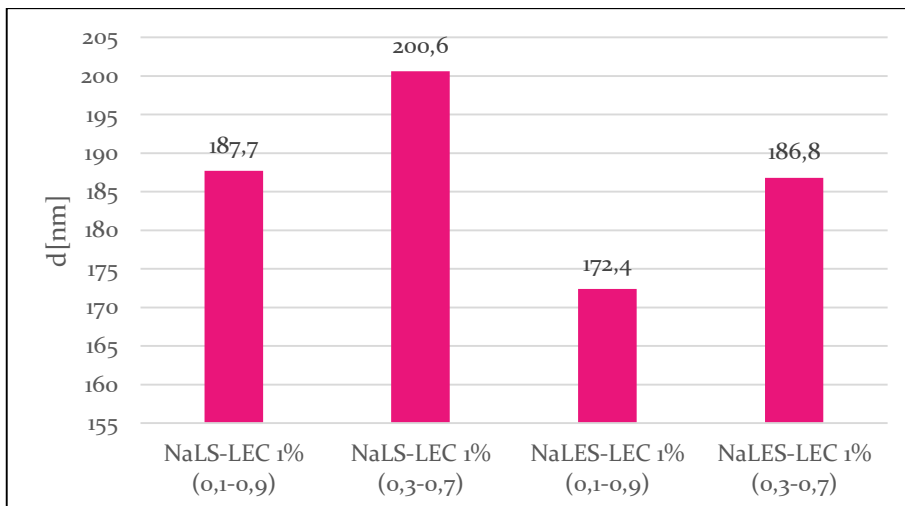
Frekvenční křivka vzorku č.19



Frekvenční křivka vzorku č.20



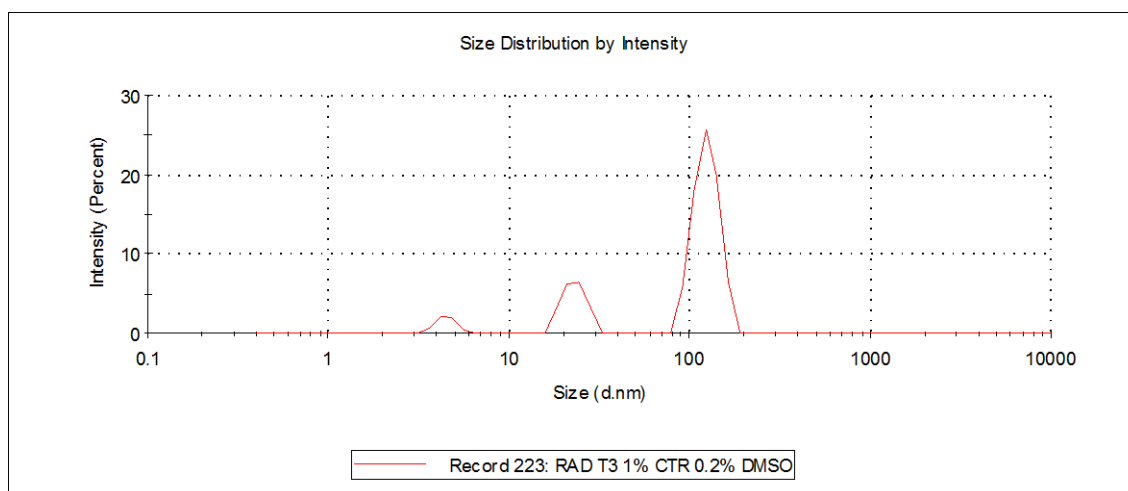
Vliv směsí emulgátorů o různých poměrech na velikost částic u 3% polymeru T3



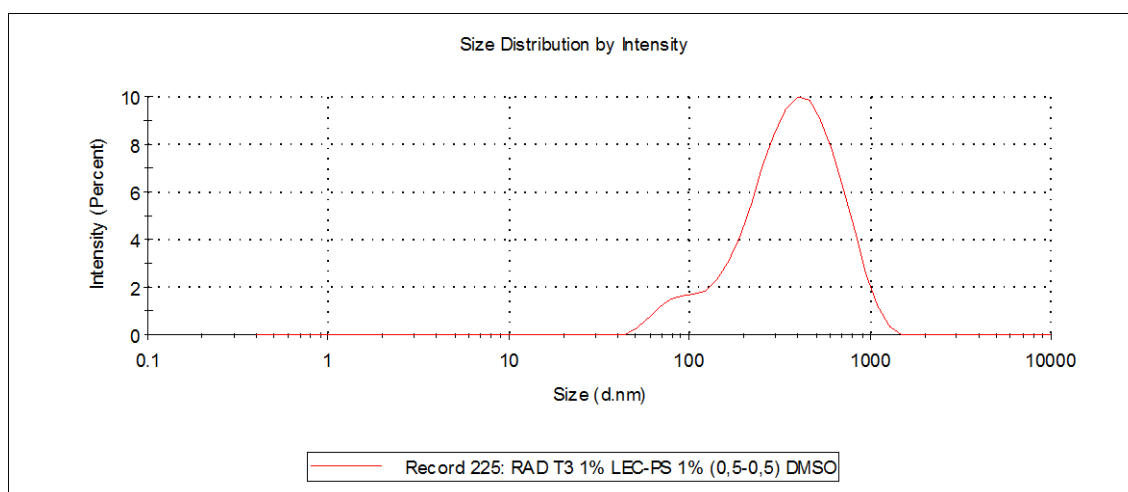
Tabulka č. 6

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2,3	
21.	T3 1%	20%	CET 0,2%	DMSO	124,6	22,98/4,5	345,4
22.	T3 1%	20%	PS-LEC 1% (0,5%+0,5%)	DMSO	413,4	0	295,8
23.	T3 1%	20%	NaLS-LEC 1% (0,1%+0,9%)	DMSO	375,6	4917	258,7
24.	T3 1%	20%	NaLS-LEC 1% (0,3%+0,7%)	DMSO	214,6	3744	173,4

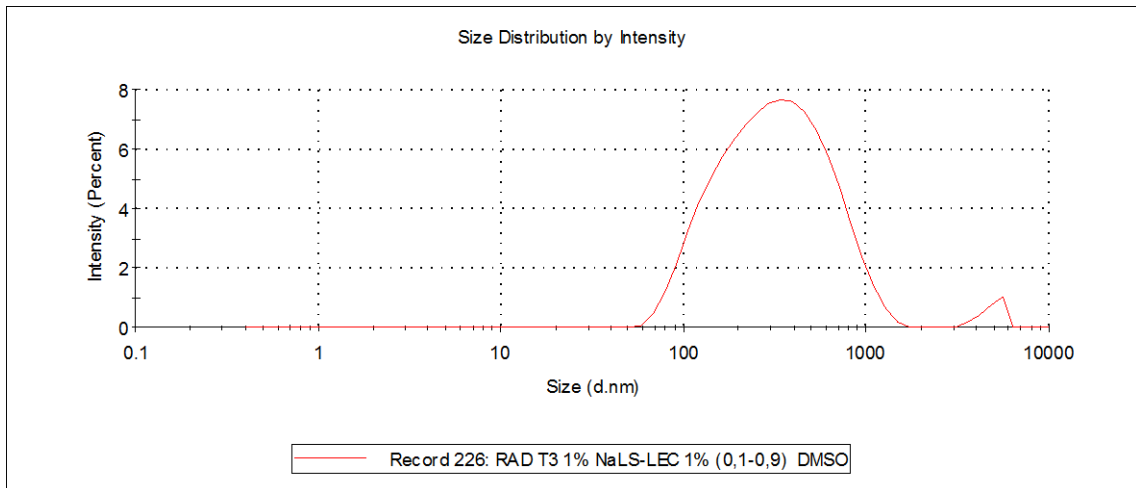
Frekvenční křivka vzorku č. 21



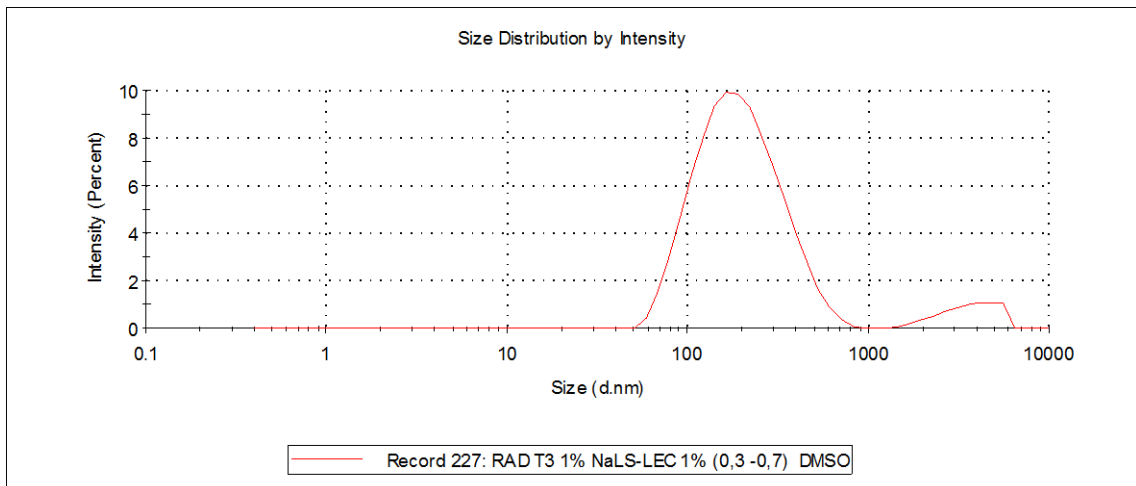
Frekvenční křivka vzorku č. 22



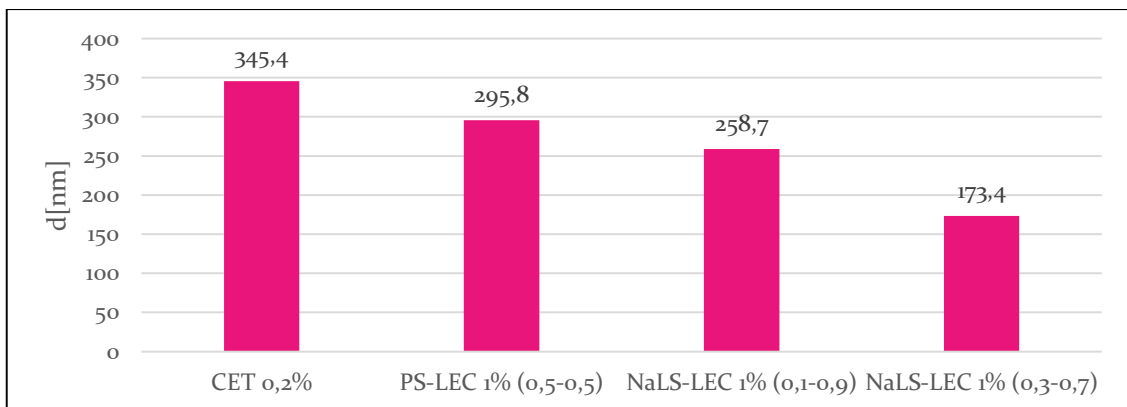
Frekvenční křivka vzorku č. 23



Frekvenční křivka vzorku č. 24



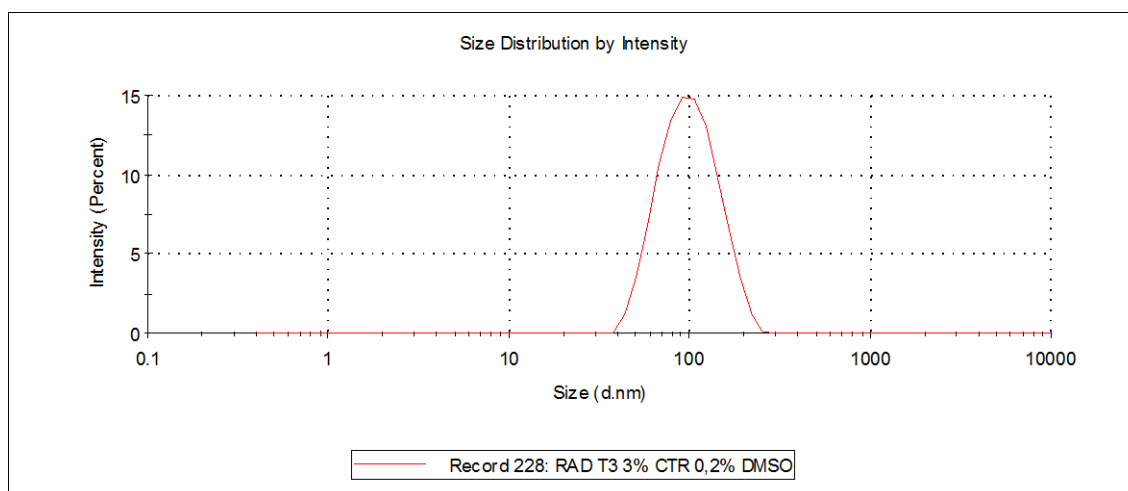
Vliv emulgátorů a jejich směsí o různých poměrech na velikost částic u 1% polymeru T3 při použití DMSO jako rozpouštědla.



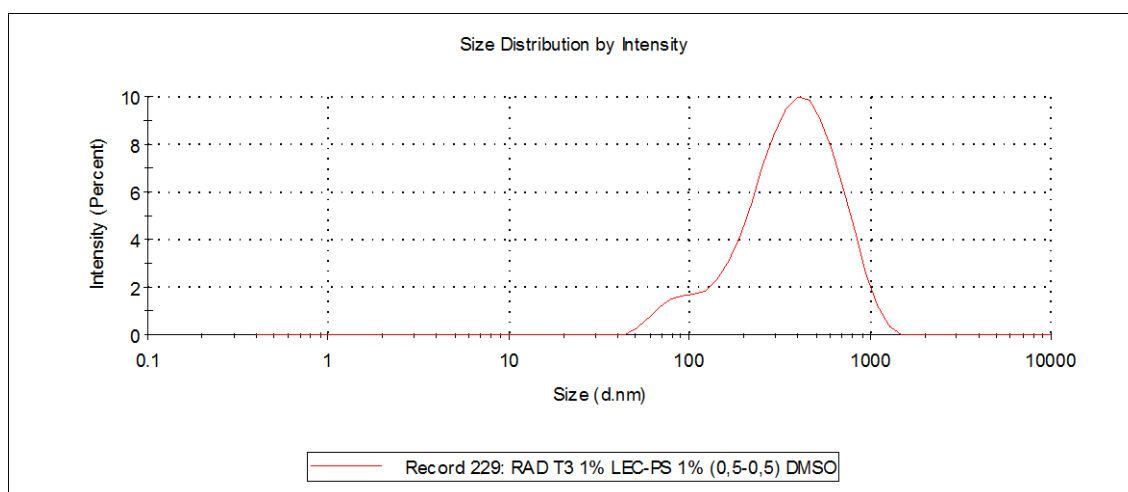
Tabulka č. 7

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2,3	
25.	T3 3%	20%	CET 0,2%	DMSO	104,1	0	92,29
26.	T3 3%	20%	PS-LEC 1% (0,5%+0,5%)	DMSO	448,2	101,9	196,8
27.	T3 3%	20%	NaLS-LEC 1% (0,1%+0,9%)	DMSO	308,3	4000/28,97	195,0
28.	T3 3%	20%	NaLS-LEC 1% (0,3%+0,7%)	DMSO	200,4	4760	152,2

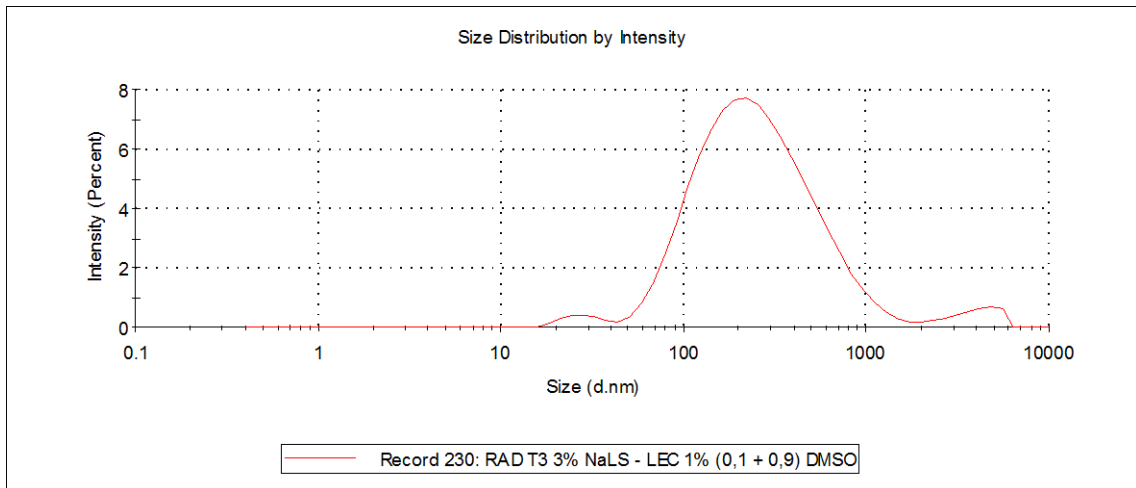
Frekvenční křivka vzorku č. 25



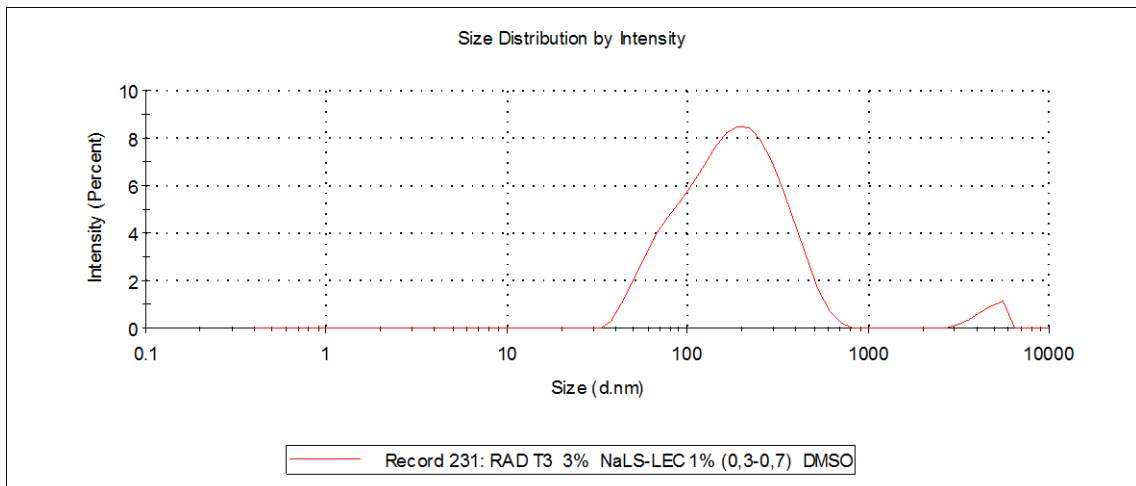
Frekvenční křivka vzorku č. 26



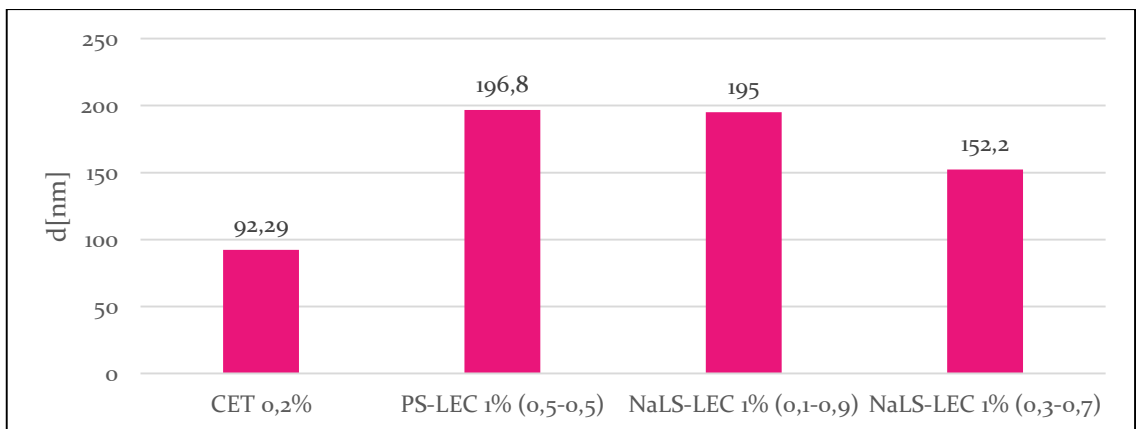
Frekvenční křivka vzorku č. 27



Frekvenční křivka vzorku č. 28



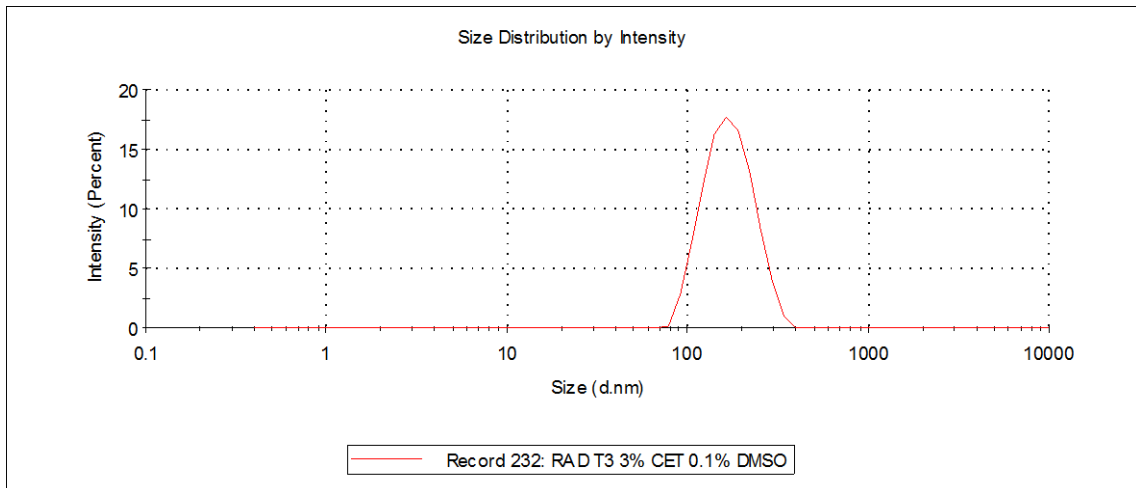
Vliv emulgátorů a jejich směsí o různých poměrech na velikost částic u 3% polymeru T3 při použití DMSO jako rozpouštědla.



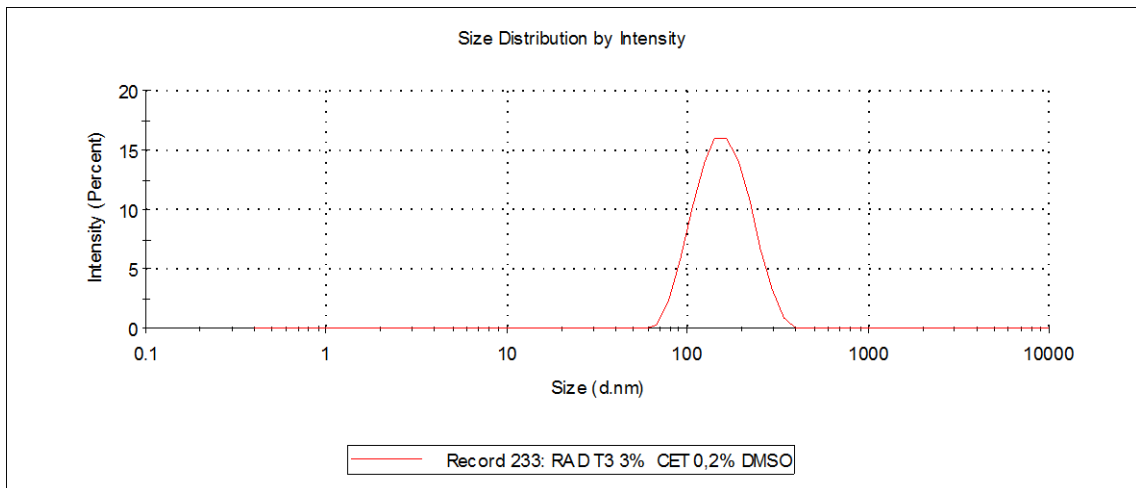
Tabulka č. 8

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
29.	T3 3%	20%	CET 0,1%	DMSO	175,2	0	160,8
30.	T3 3%	20%	CET 0,2%	DMSO	164,2	0	147,8
31.	T3 3%	20%	CET 0,4%	DMSO	152,8	0	136,8

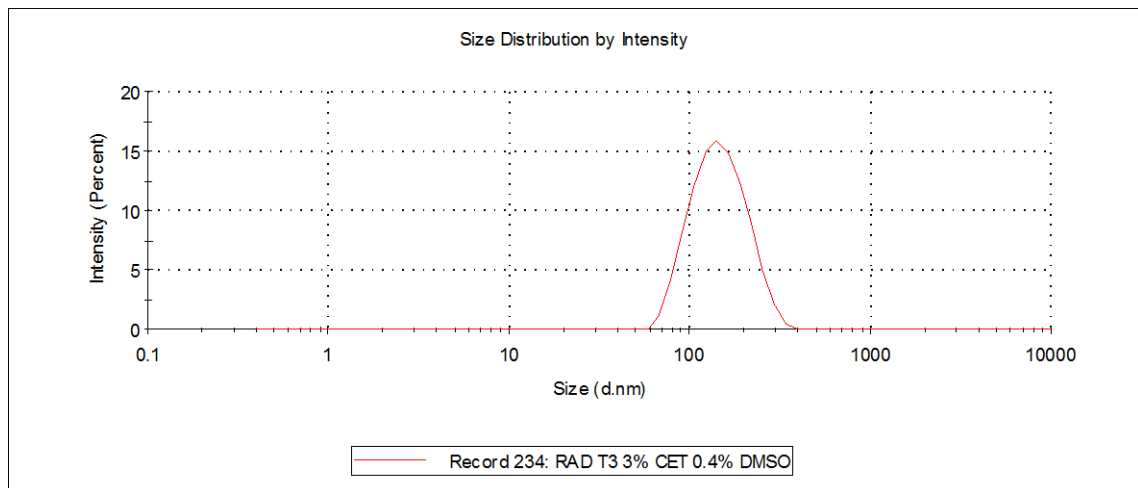
Frekvenční křivka vzorku č. 29



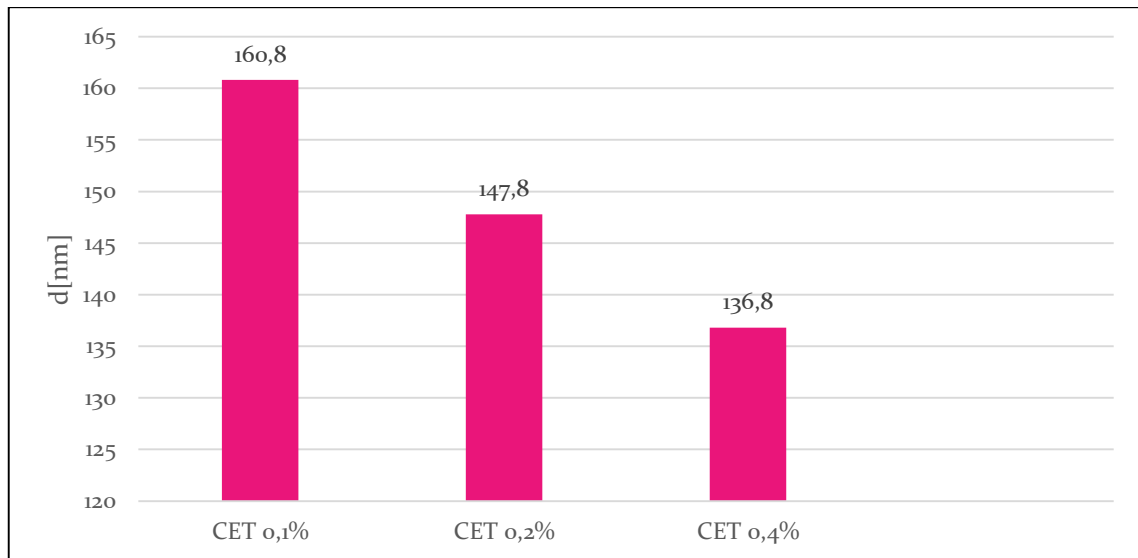
Frekvenční křivka vzorku č. 30



Frekvenční křivka vzorku č. 31



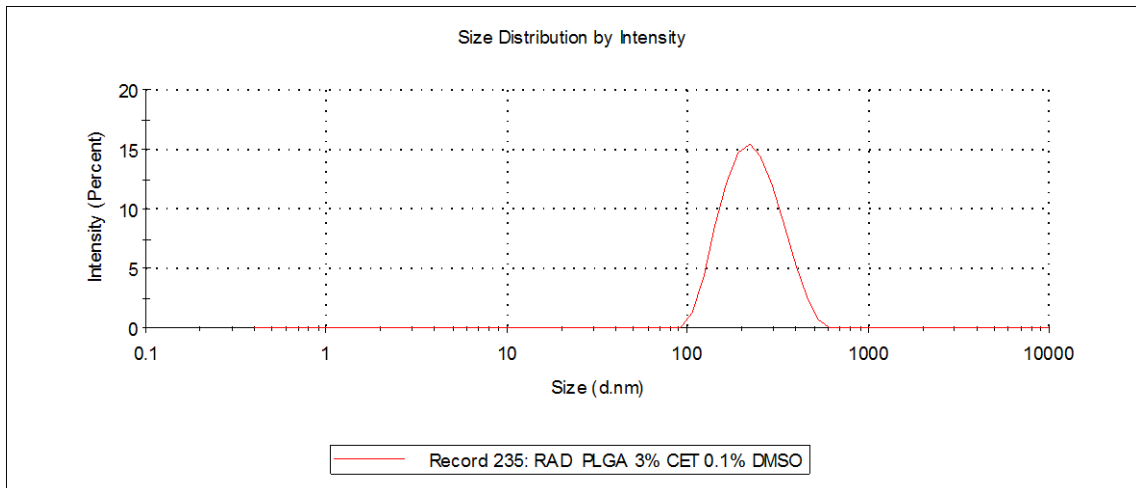
Vliv koncentrace emulgátoru cetrimidu na velikost polymerních nanočástic 3% T3.



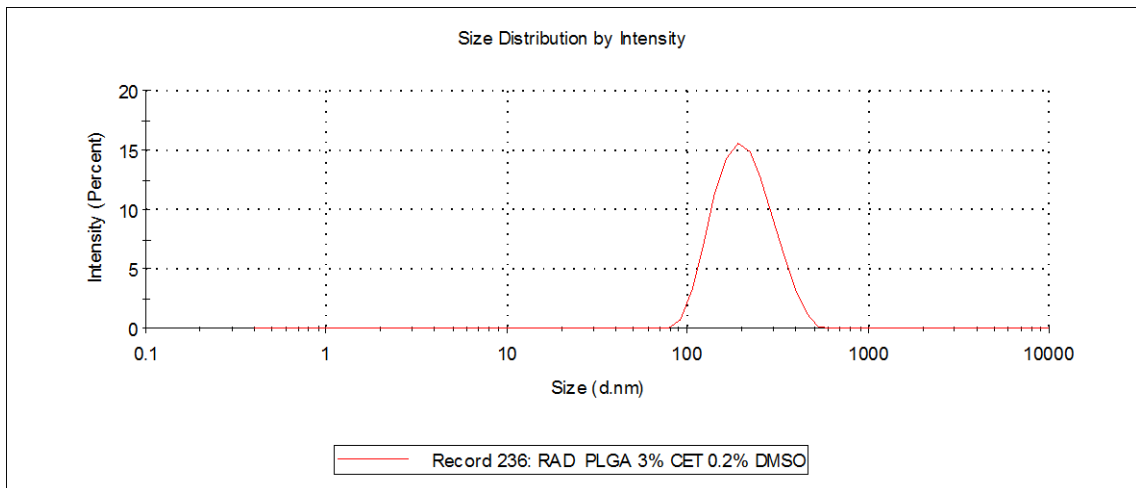
Tabulka č. 9

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
32.	PLGA 3%	20%	CET 0,1%	DMSO	238,3	0	211,8
33.	PLGA 3%	20%	CET 0,2%	DMSO	214,3	0	190,9
34.	PLGA 3%	20%	CET 0,4%	DMSO	194,0	0	176,0

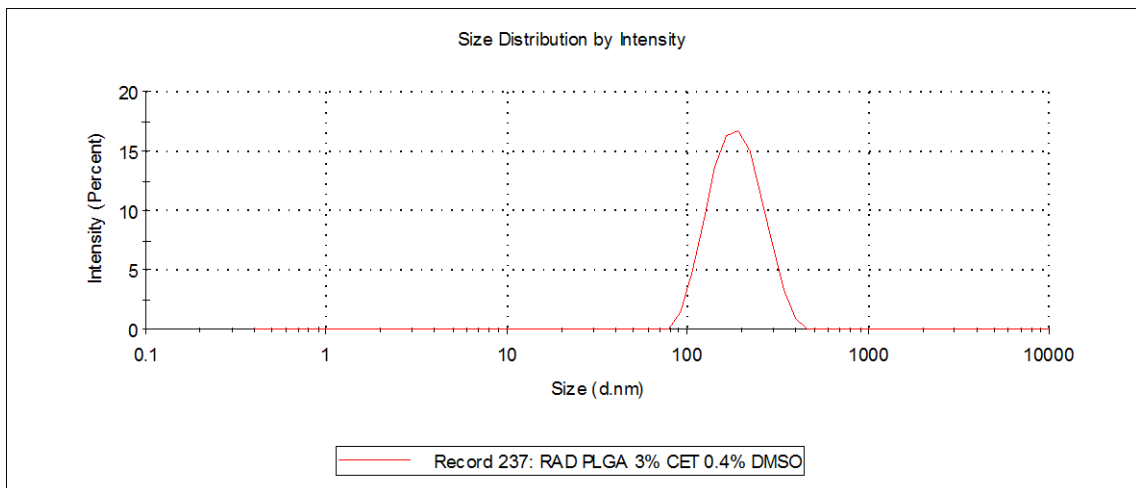
Frekvenční křivka vzorku č. 32



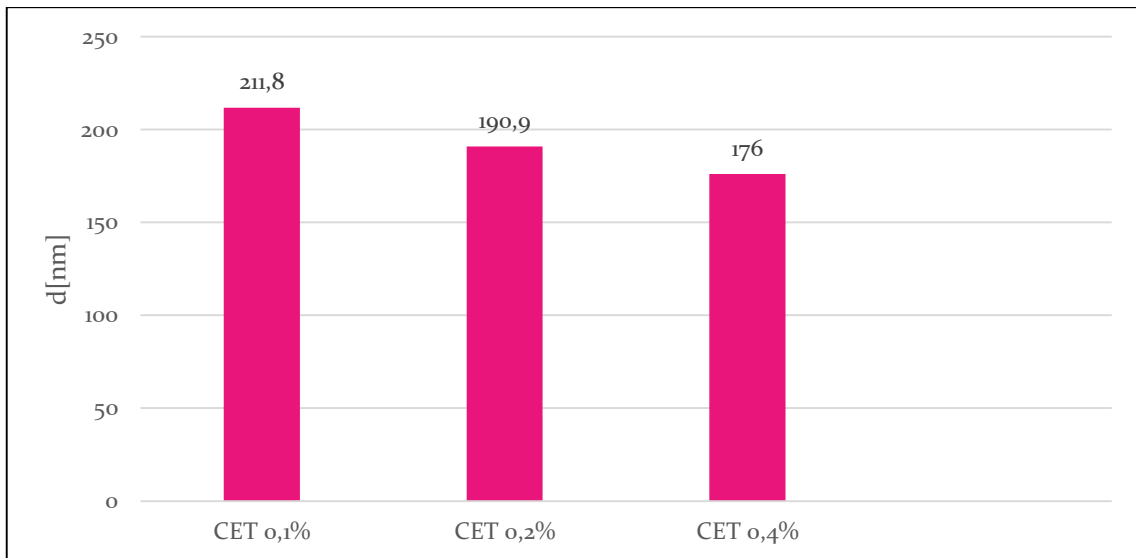
Frekvenční křivka vzorku č. 33



Frekvenční křivka vzorku č. 34



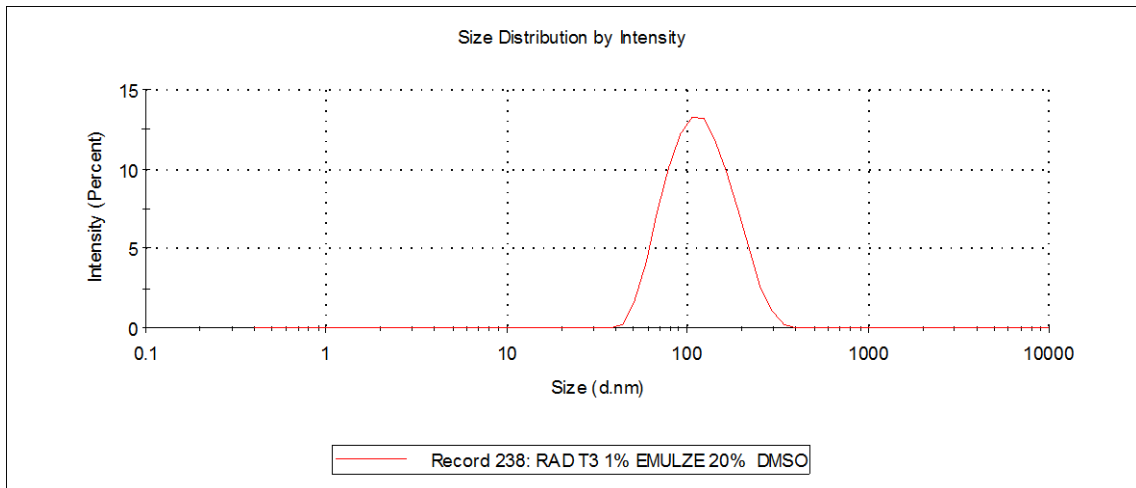
Vliv koncentrace emulgátoru cetrimidu na velikost polymerních nanočástic 3% PLGA.



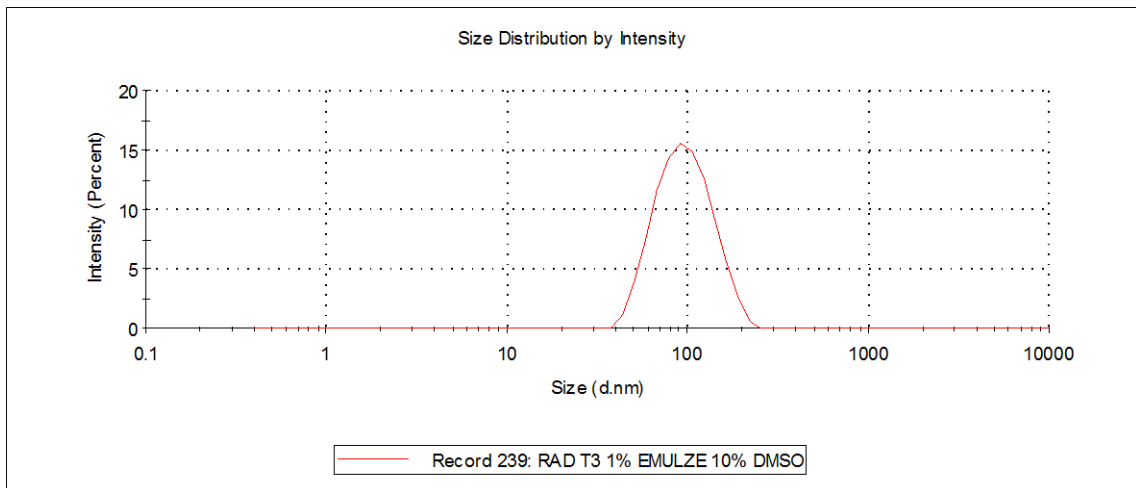
Tabulka č. 10

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
35.	T3 1%	20%	CET 0,2%	DMSO	125,8	0	107,9
36.	T3 1%	10%	CET 0,2%	DMSO	100,3	0	87,42
37.	T3 1%	5%	CET 0,2%	DMSO	96,37	0	85,53

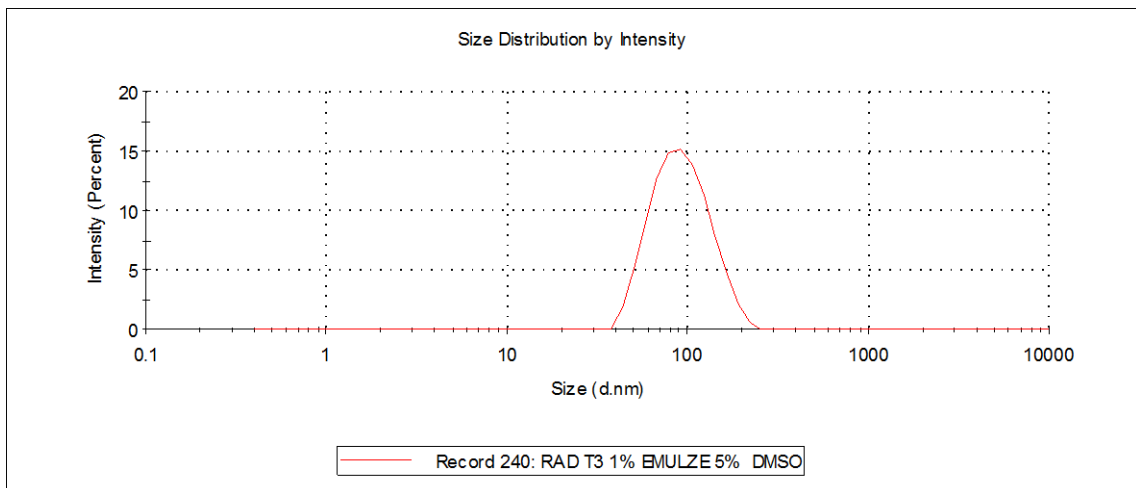
Frekvenční křivka vzorku č. 35



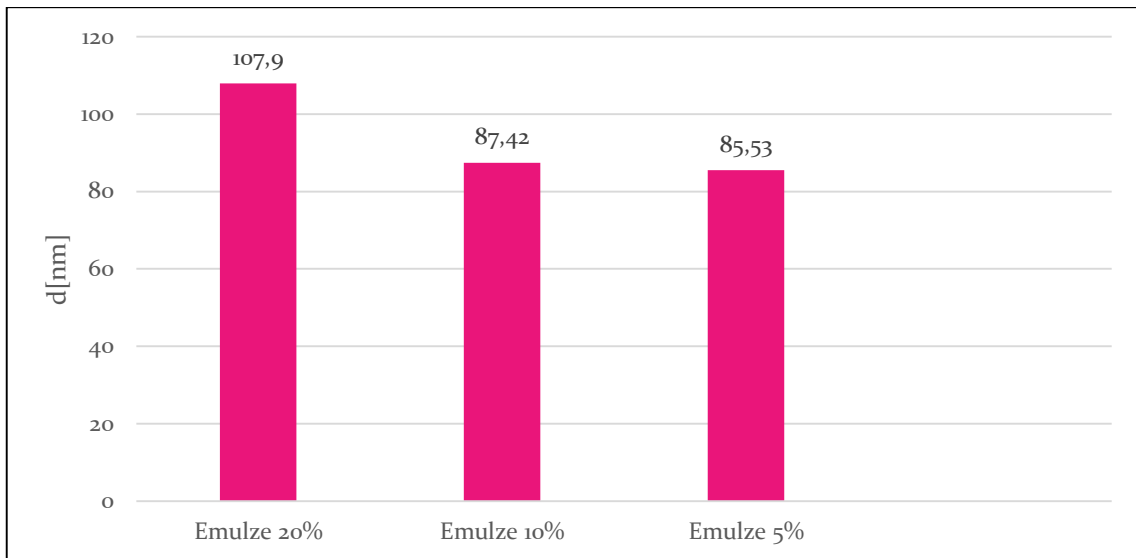
Frekvenční křivka vzorku č. 36



Frekvenční křivka vzorku č. 37



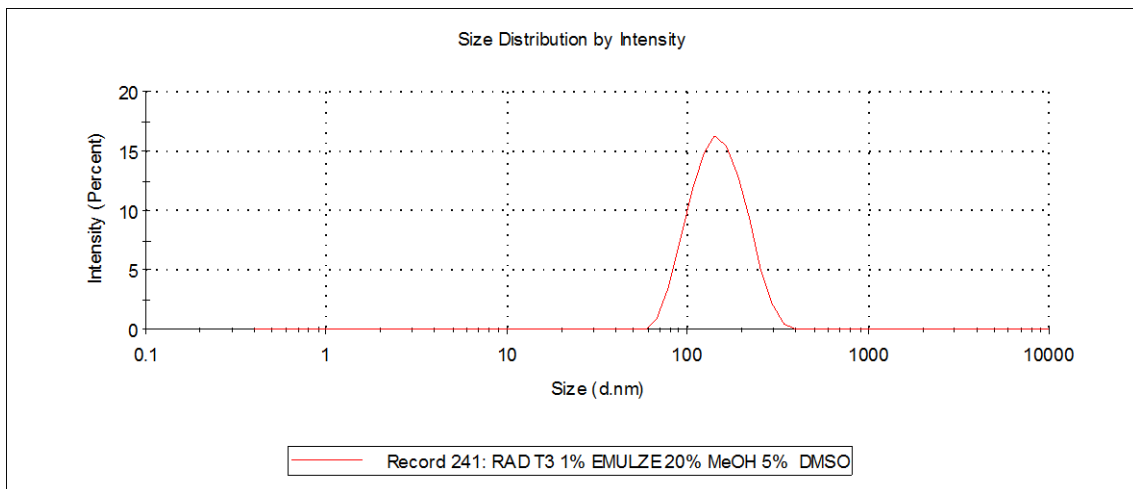
Vliv koncentrace emulze na velikost polymerních nanočástic 1% T3



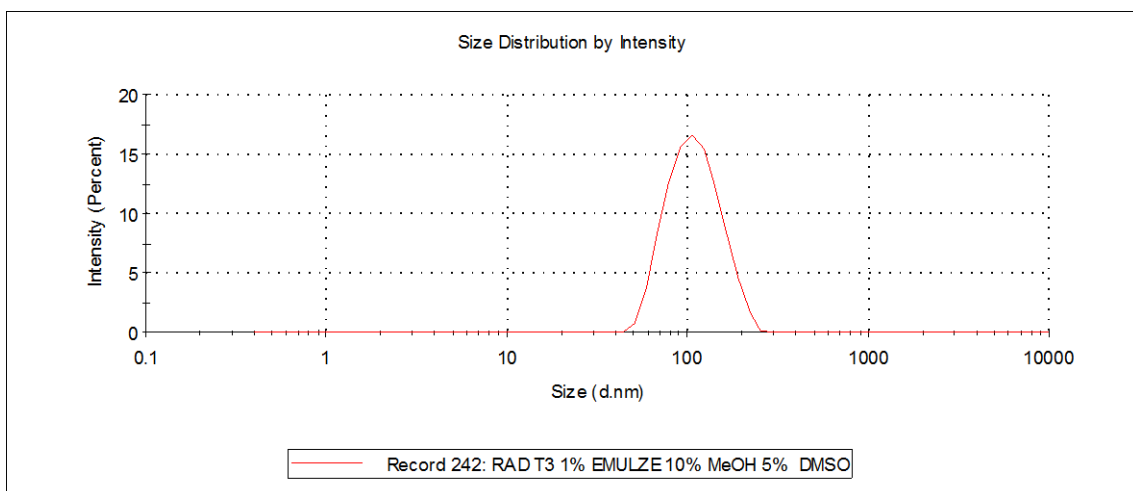
Tabulka č. 11

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
38.	T3 1%	20% + 5%MeOH	CET 0,2%	DMSO	154,4	0	138,7
39.	T3 1%	10%+ 5%MeOH	CET 0,2%	DMSO	112,8	0	102,0
40.	T3 1%	5%+ 5%MeOH	CET 0,2%	DMSO	105,2	0	92,36

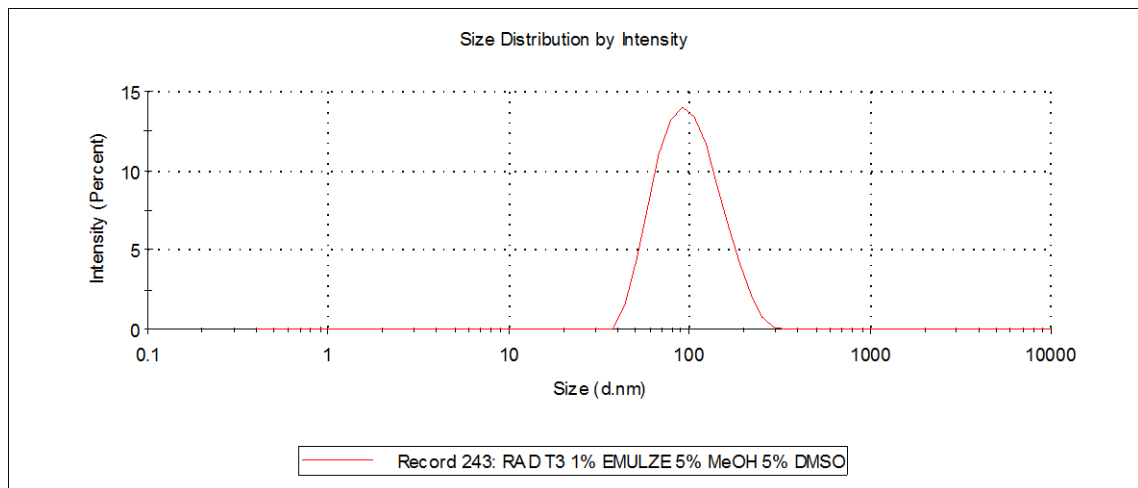
Frekvenční křivka vzorku č. 38



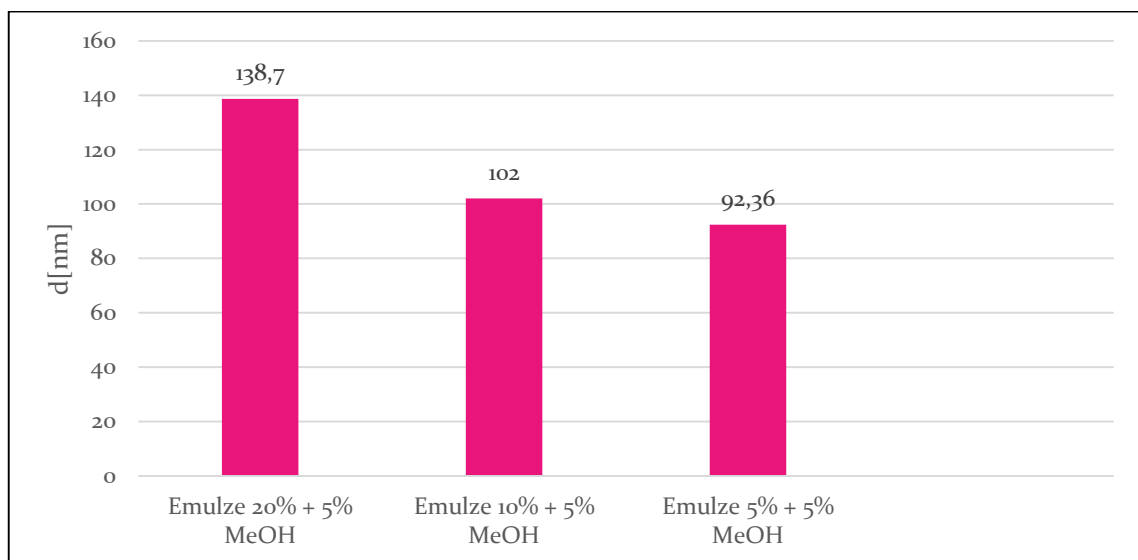
Frekvenční křivka vzorku č. 39



Frekvenční křivka vzorku č. 40



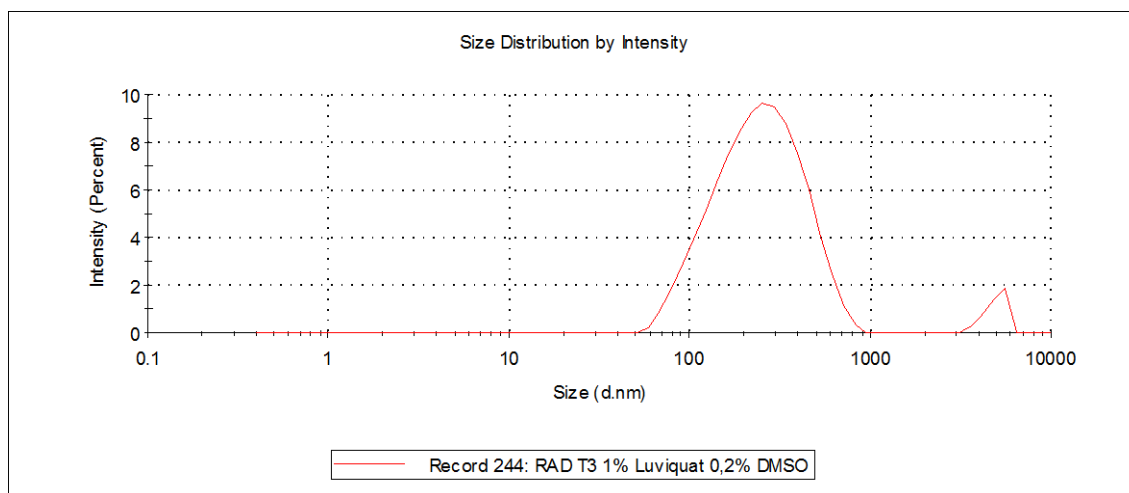
Vliv koncentrace emulze s přidavkem 5% MeOH na velikost polymerních nanočástic 1% T3.



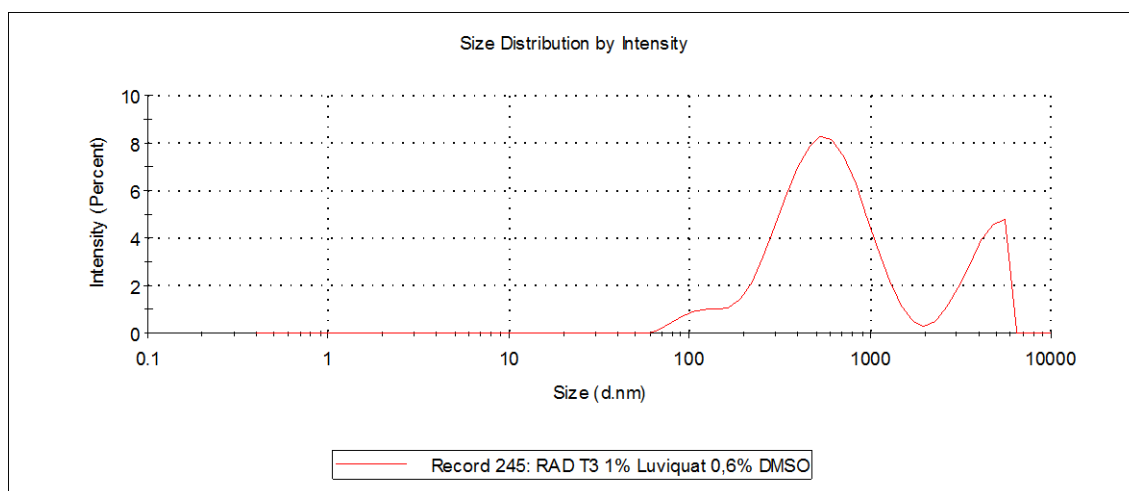
Tabulka č. 12

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2/3	
41.	T3 1%	10%	Luviquat FC 550 0,2%	DMSO	272,2	4934	227,2
42.	T3 1%	10%	Luviquat FC 550 0,6%	DMSO	601,2	4275/112,1	587,5
43.	T3 1%	10%	Luviquat FC 550 2%	DMSO	887,1	0	645,0

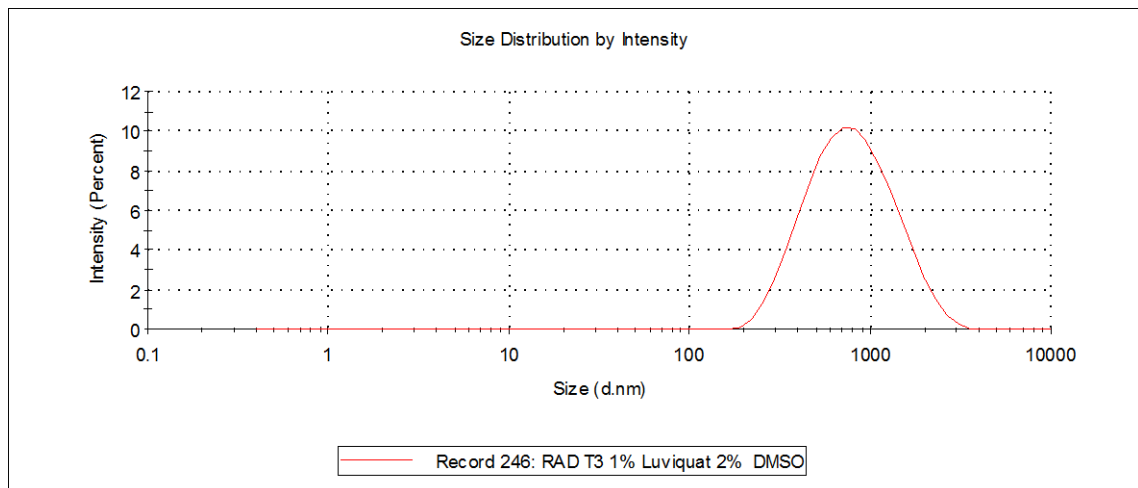
Frekvenční křivka vzorku č. 41



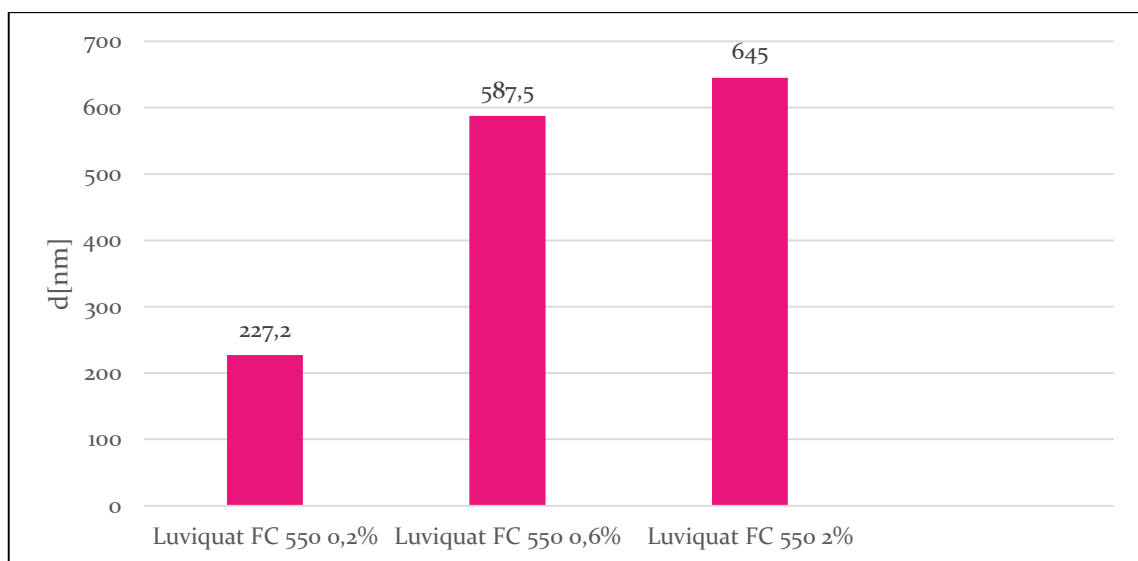
Frekvenční křivka vzorku č. 42



Frekvenční křivka vzorku č. 43



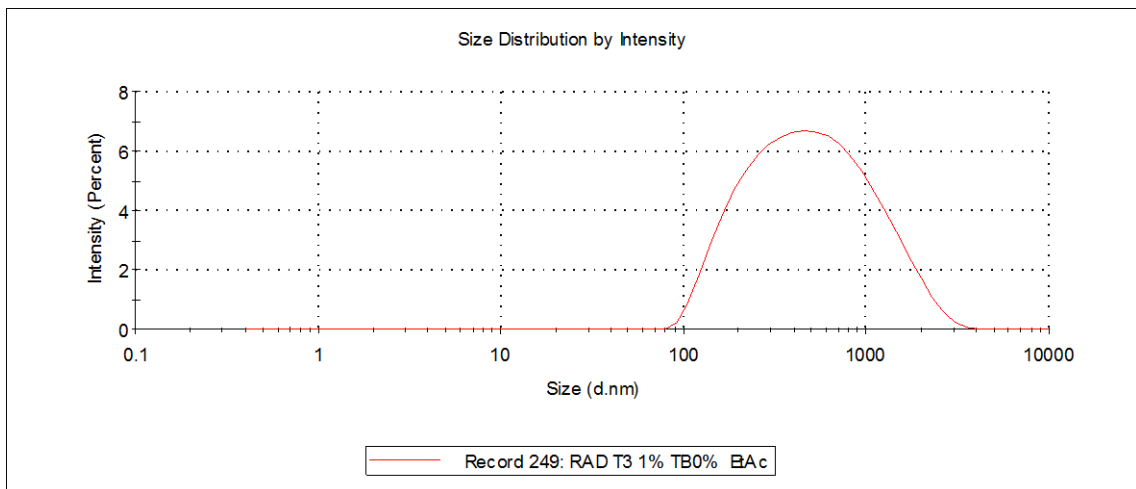
Vliv koncentrace emulgátoru Luviquat FC 550 na velikost polymerních nanočástic 1% T3 při použití 10% emulze.



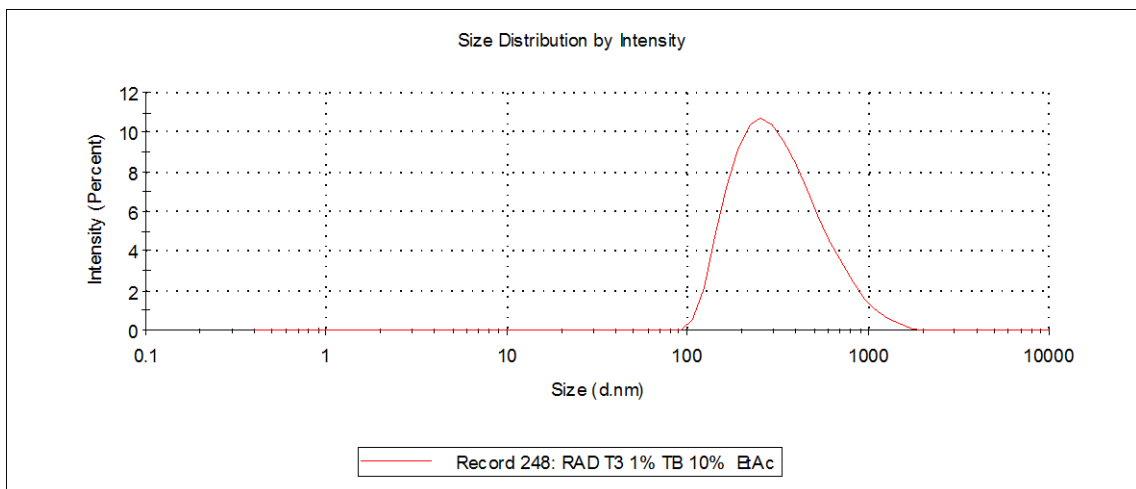
Tabulka č. 13

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
44.	T3 1%	10% + 0%TER	CET 0,2%	EtAc	640,1	0	381,2
45.	T3 1%	10%+ 10%TER	CET 0,2%	EtAc	363,1	0	276,4
46.	T3 1%	10%+ 30%TER	CET 0,2%	EtAc	362,7	4052	328,6

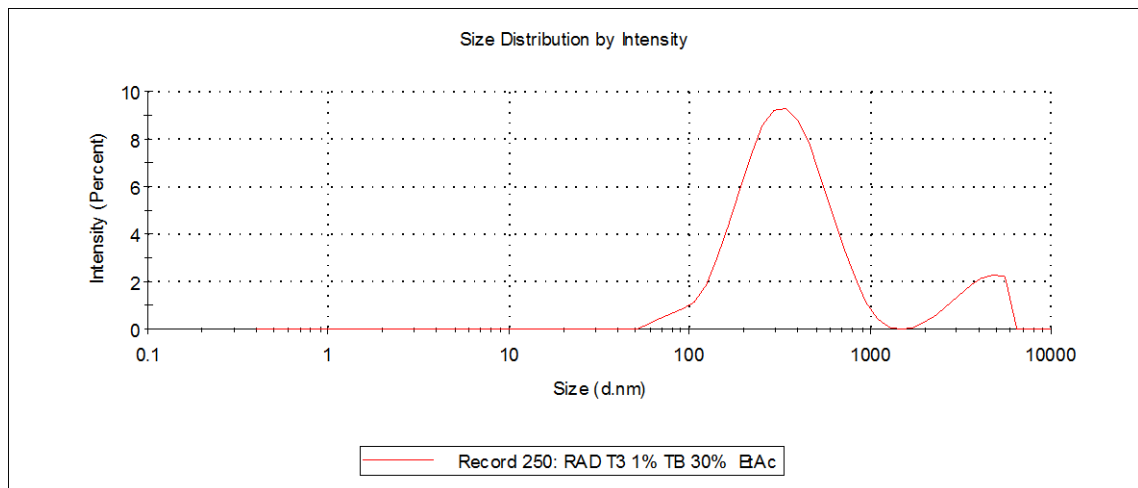
Frekvenční křivka vzorku č. 44



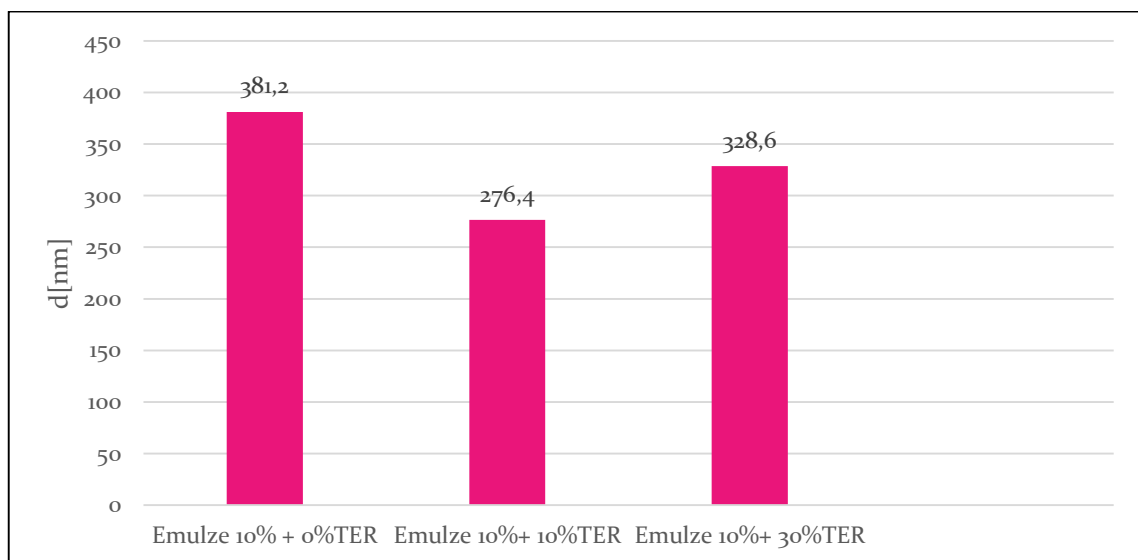
Frekvenční křivka vzorku č. 45



Frekvenční křivka vzorku č. 46



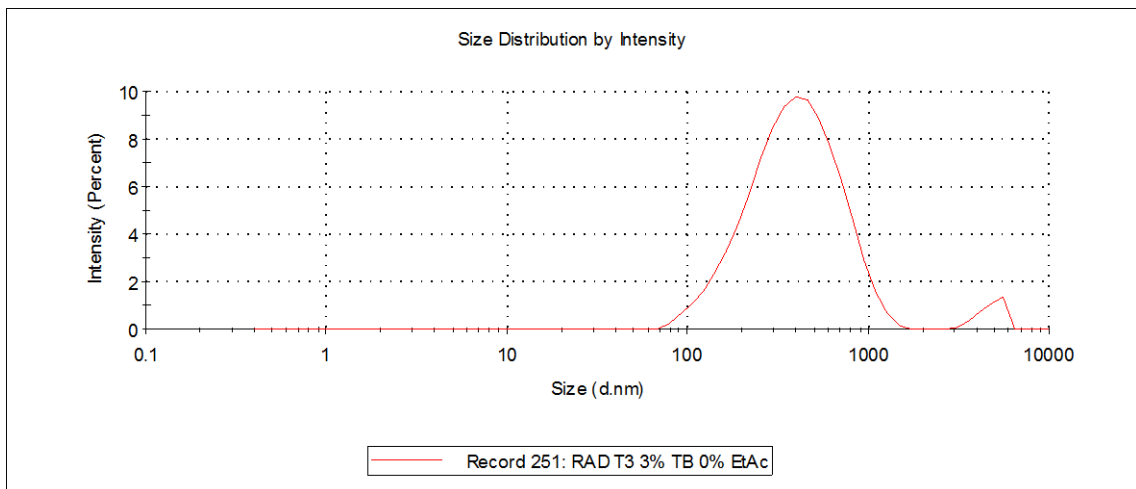
Vliv přidavku terbinafinu na velikost částic 1% T3 při použití rozpouštědla ethylacetátu a 10% emulzi.



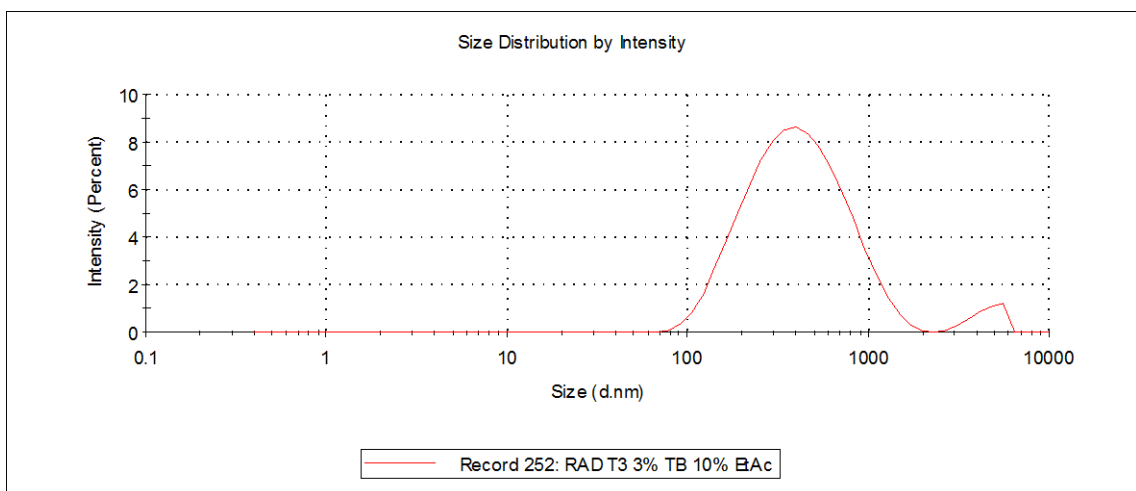
Tabulka č. 14

Vzorek	Polymer	Emulze	Emulgátor	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
47.	T3 3%	10% + 0%TER	CET 0,2%	EtAc	440,4	4798	356,5
48.	T3 3%	10%+ 10%TER	CET 0,2%	EtAc	465,7	4537	358,3
49.	T3 3%	10%+ 30%TER	CET 0,2%	EtAc	265,0	1409	410,9

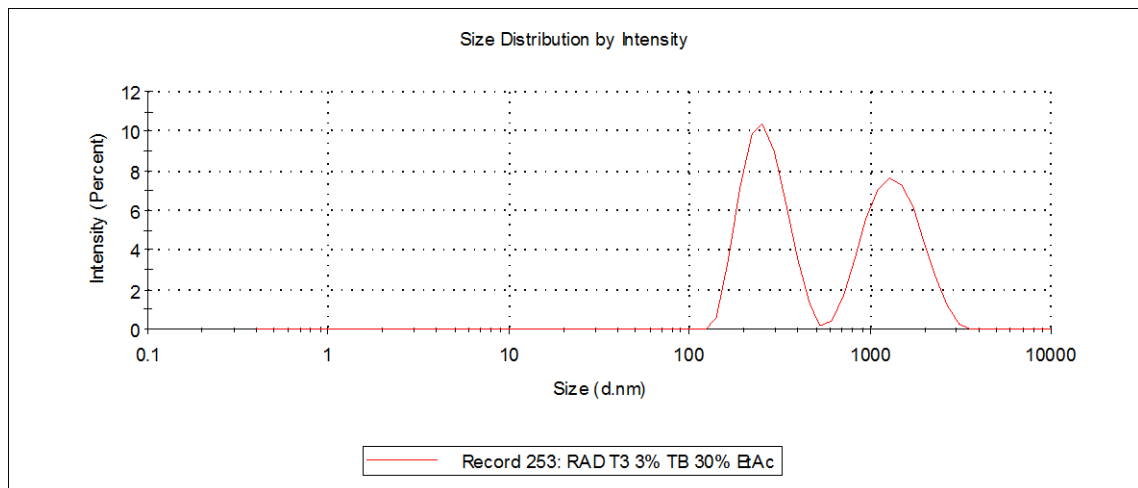
Frekvenční křivka vzorku č. 47



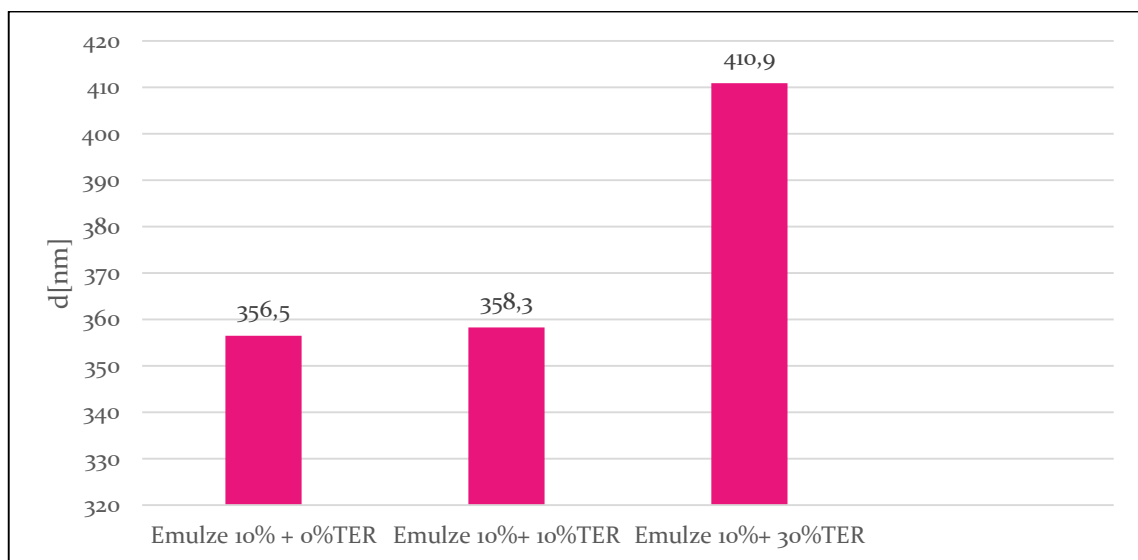
Frekvenční křivka vzorku č. 48



Frekvenční křivka vzorku č. 49



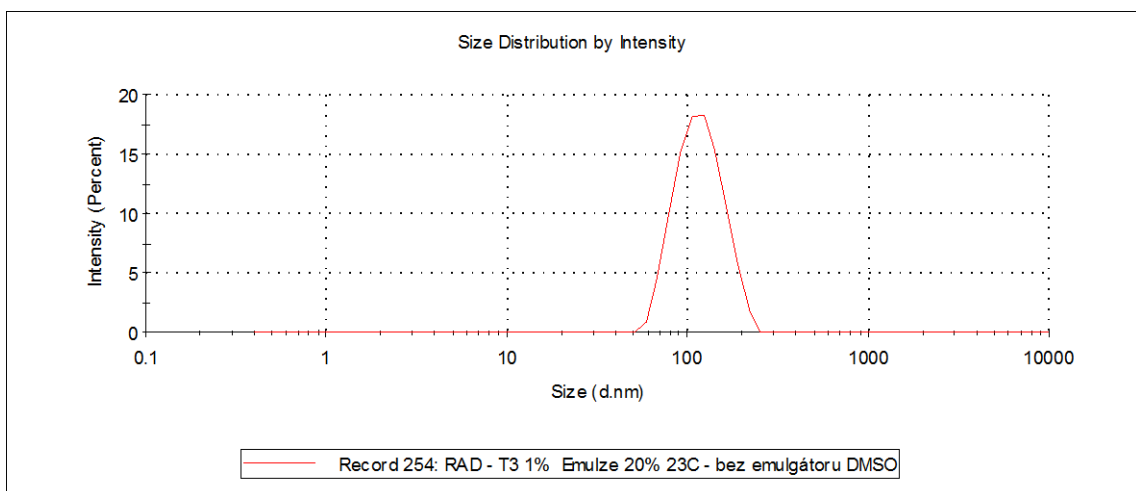
Vliv přidavku terbinafinu na velikost částic 3% T3 při použití rozpouštědla ethylacetátu a 10% emulzi.



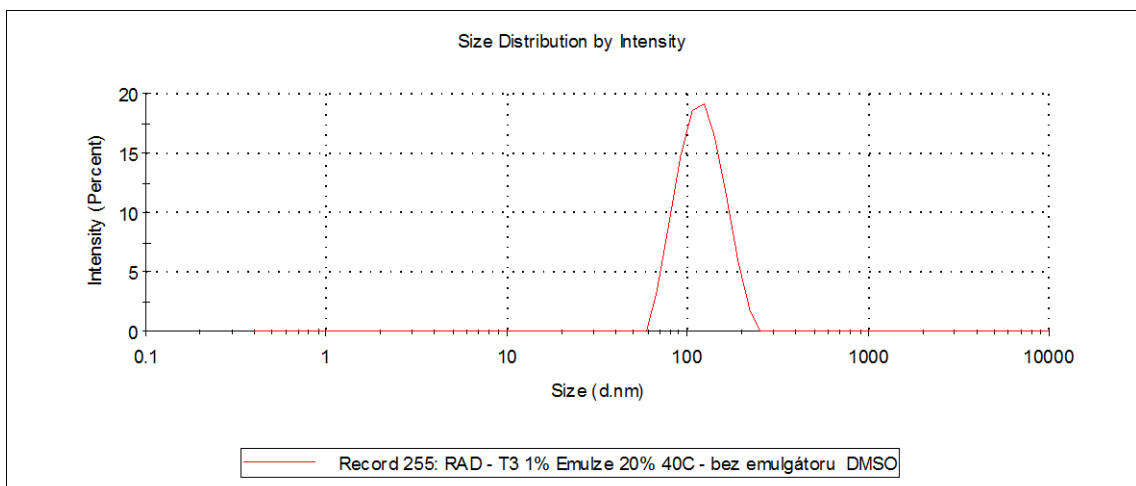
Tabulka č. 15

Vzorek	Polymer	Emulze	Teplota[°C]	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
50.	T3 1%	20%	23	DMSO	102,2	0	111,0
51.	T3 1%	20%	40	DMSO	122,7	0	114,3
52.	PLGA 1%	20%	23	DMSO	99,8	0	88,35
53.	PLGA 1%	20%	40	DMSO	101,8	0	93,70

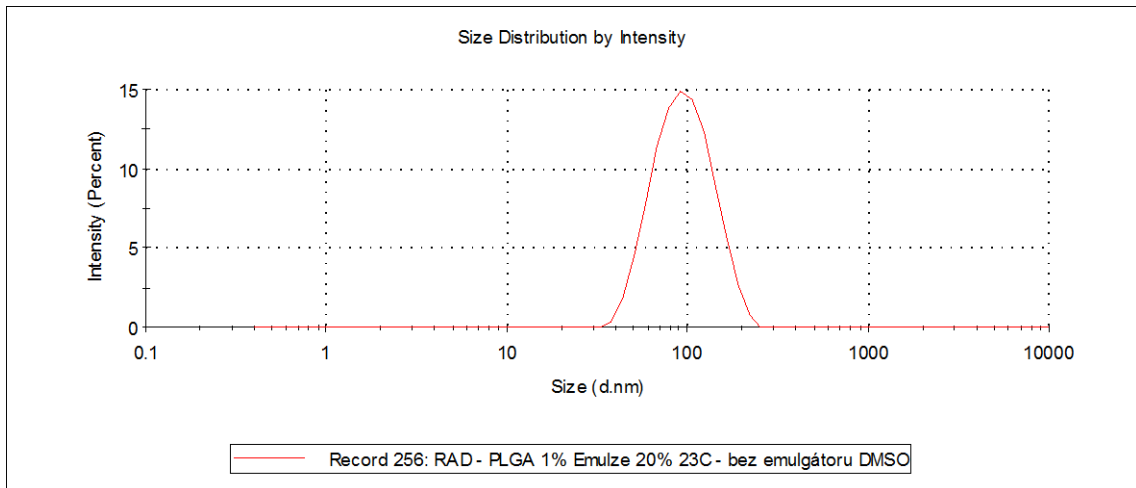
Frekvenční křivka vzorku č. 50



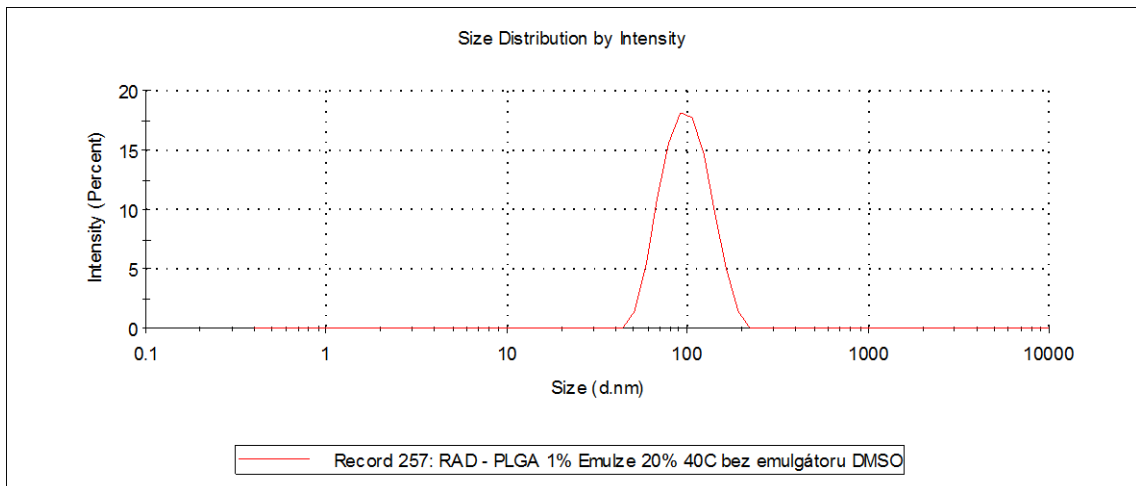
Frekvenční křivka vzorku č. 51



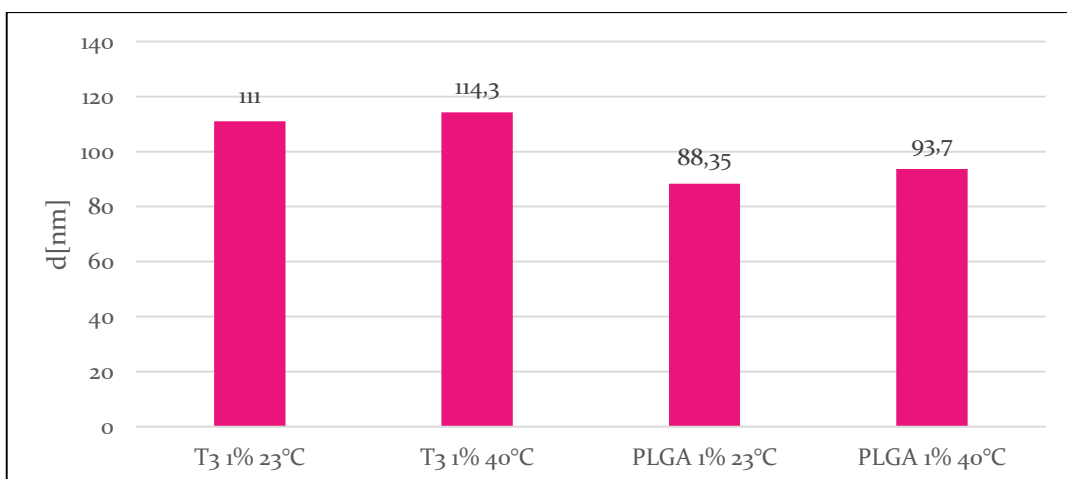
Frekvenční křivka vzorku č. 52



Frekvenční křivka vzorku č. 53



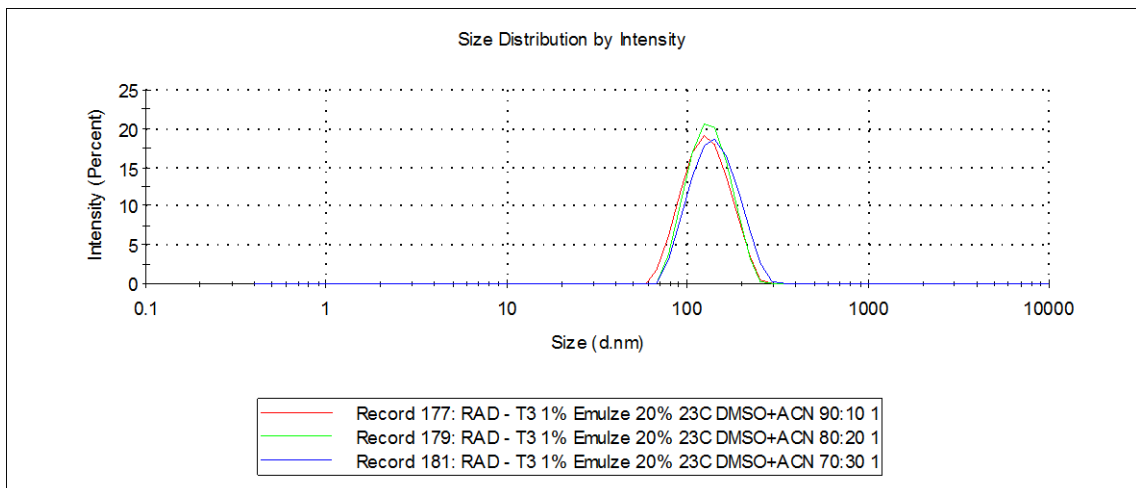
Vliv teploty při přípravě na velikost nanočástic i 1% PLGA a T3 za použití DMSO a absence emulgátoru.



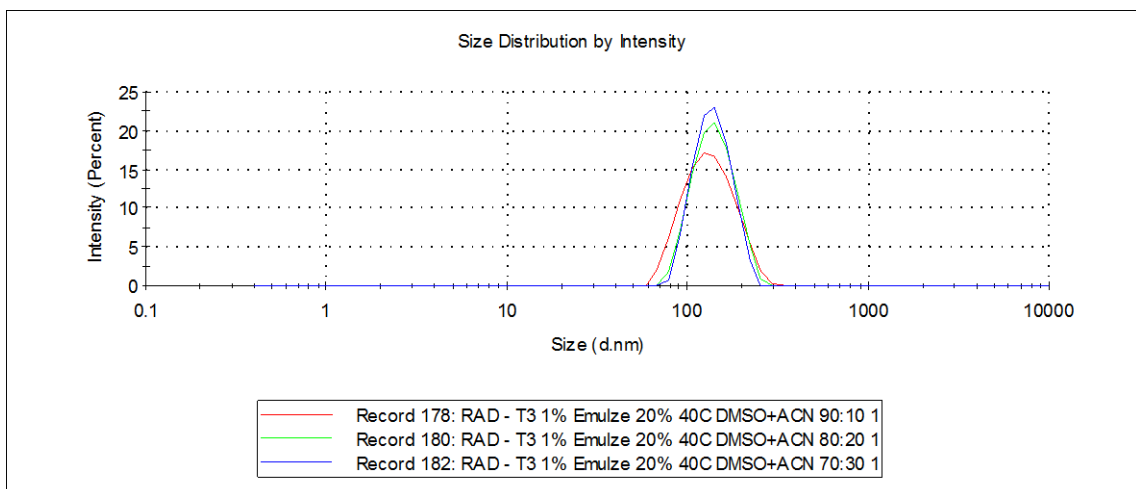
Tabulka č. 16

Vzorek	Polymer	Emulze	Teplota[°C]	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
54.	T3 1%	20%	23	DMSO+ACN(90:10)	131,4	0	122,0
55.	T3 1%	20%	23	DMSO+ACN(80:20)	135,0	0	127,1
56.	T3 1%	20%	23	DMSO+ACN(70:30)	145,6	0	134,3
57.	T3 1%	20%	40	DMSO+ACN(90:10)	137,0	0	124,8
58.	T3 1%	20%	40	DMSO+ACN(80:20)	142,8	0	134,3
59.	T3 1%	20%	40	DMSO+ACN(70:30)	140,0	0	133,6

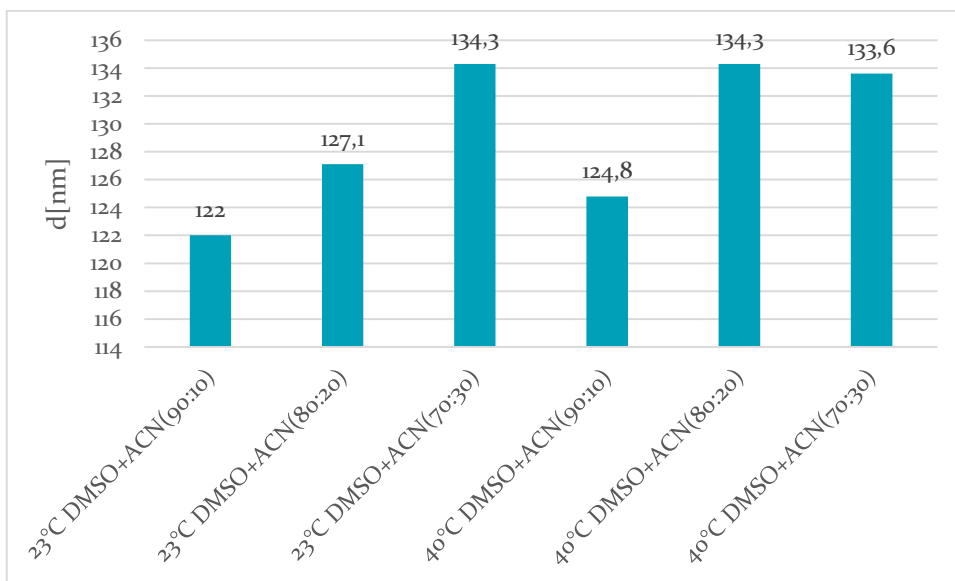
Frekvenční křivka vzorků č. 54-56



Frekvenční křivka vzorků č. 57-59



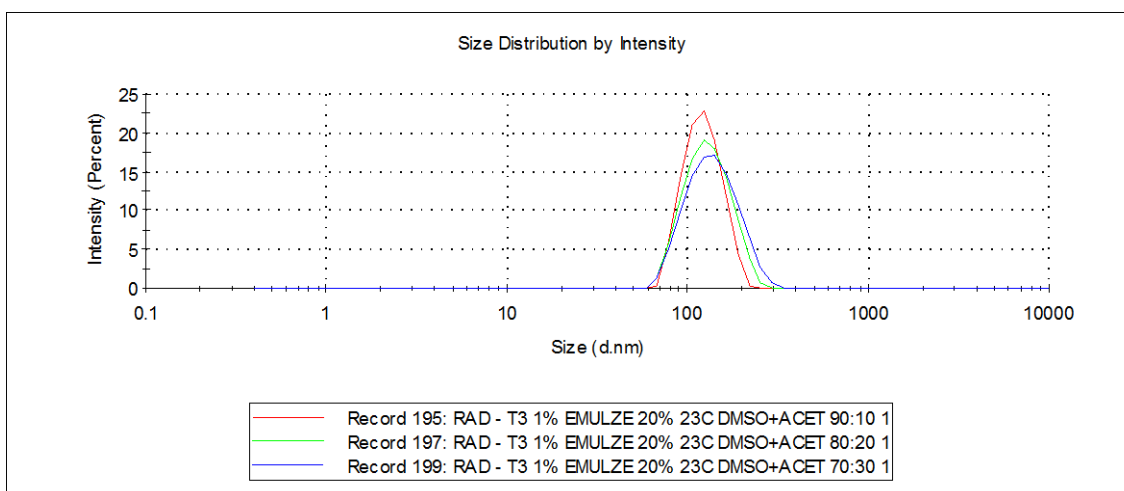
Vliv teploty a směsi rozpouštědel DMSO-ACN a jejich poměrů na velikost částic 1% T3 polymeru při použití 20% emulze.



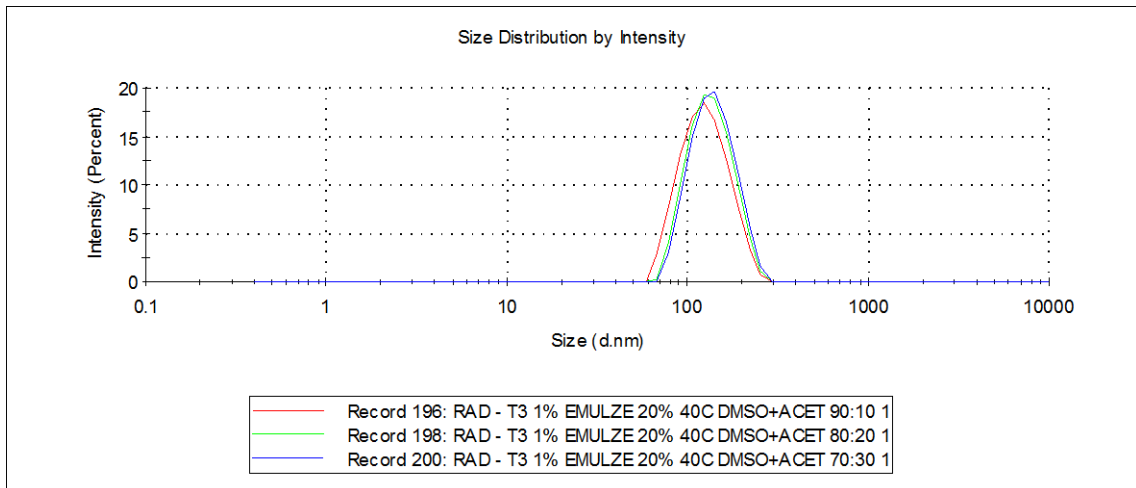
Tabulka č. 17

Vzorek	Polymer	Emulze	Teplota[°C]	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
60.	T3 1%	20%	23	DMSO+ACET(90:10)	123,4	0	117,0
61.	T3 1%	20%	23	DMSO+ACET(80:20)	132,6	0	123,2
62.	T3 1%	20%	23	DMSO+ACET(70:30)	141,6	0	128,9
63.	T3 1%	20%	40	DMSO+ACET(90:10)	128,4	0	118,5
64.	T3 1%	20%	40	DMSO+ACET(80:20)	137,6	0	127,6
65.	T3 1%	20%	40	DMSO+ACET(70:30)	141,7	0	131,9

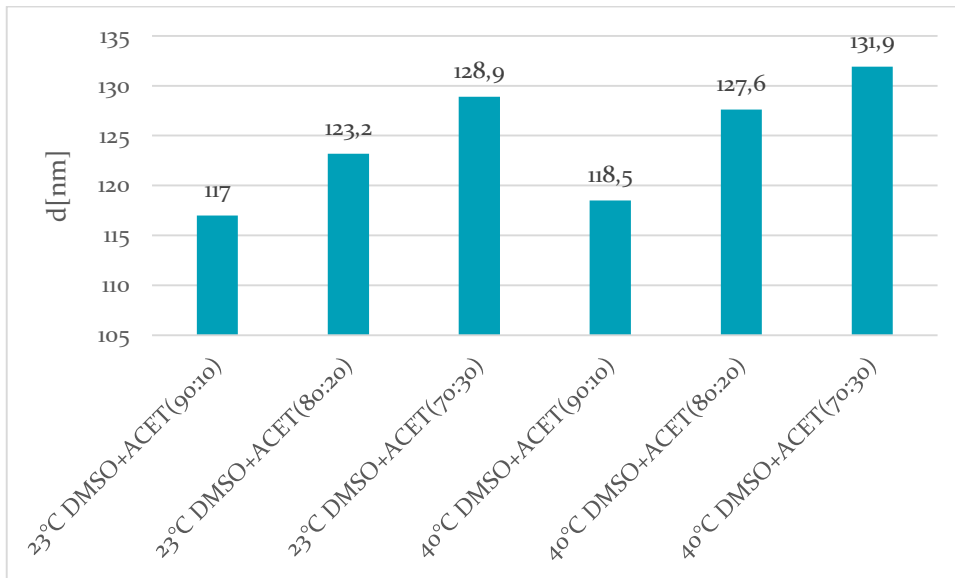
Frekvenční křivka vzorků č. 60-62



Frekvenční křivka vzorků č. 63-65



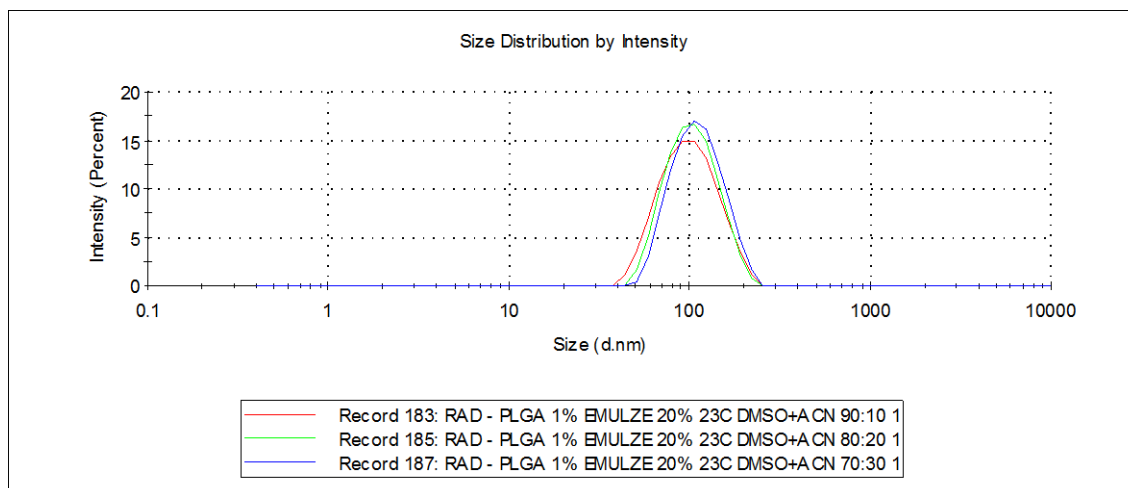
Vliv teploty a směsi rozpouštědel DMSO-ACET a jejich poměrů na velikost částic 1% T3 polymeru při použití 20% emulze.



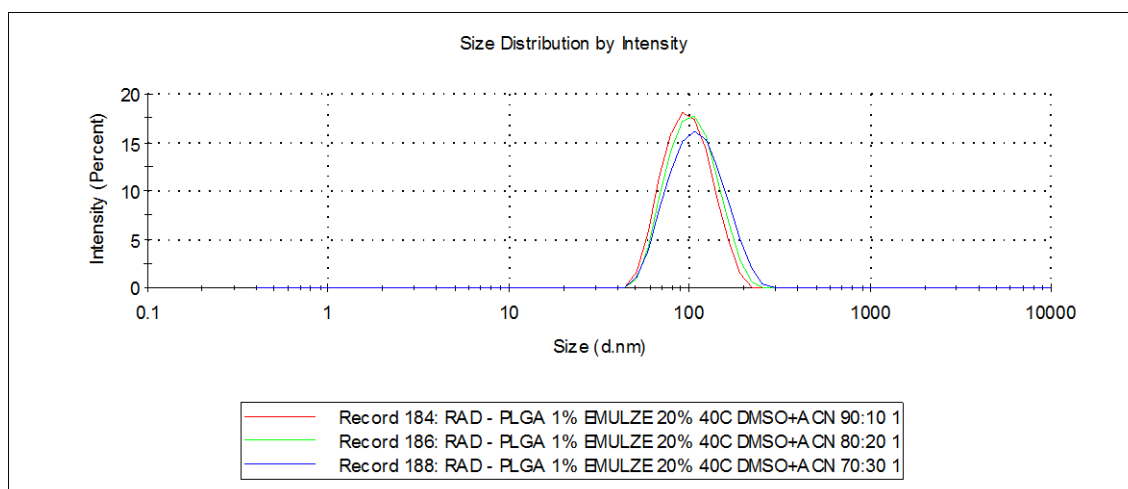
Tabulka č. 18

Vzorek	Polymer	Emulze	Teplota[°C]	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
66.	PLGA 1%	20%	23	DMSO+ACN(90:10)	104,2	0	92,59
67.	PLGA 1%	20%	23	DMSO+ACN(80:20)	107,0	0	97,03
68.	PLGA 1%	20%	23	DMSO+ACN(70:30)	114,7	0	104,3
69.	PLGA 1%	20%	40	DMSO+ACN(90:10)	101,0	0	92,44
70.	PLGA 1%	20%	40	DMSO+ACN(80:20)	107,2	0	98,16
71.	PLGA 1%	20%	40	DMSO+ACN(70:30)	114,1	0	102,8

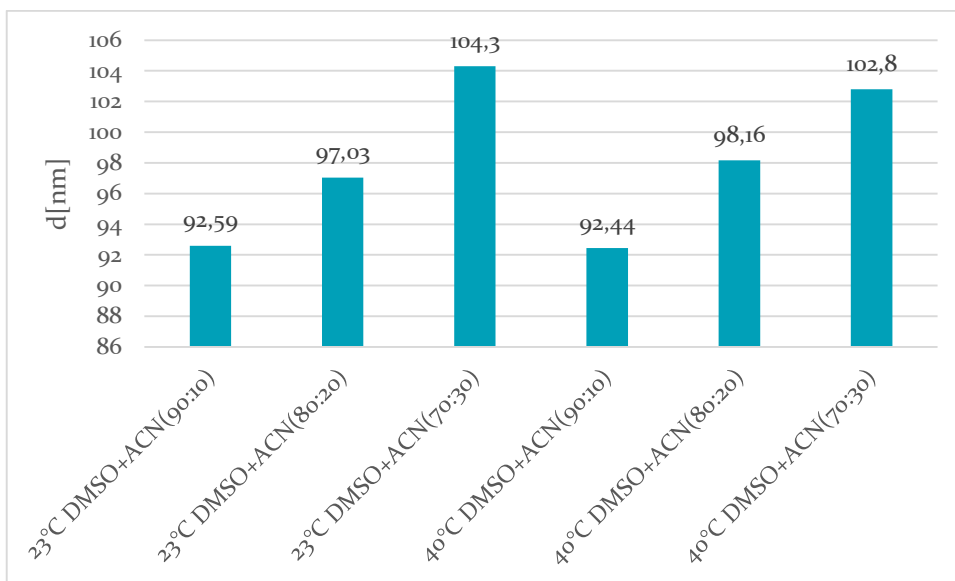
Frekvenční křivka vzorků č. 66-68



Frekvenční křivka vzorků č. 69-71



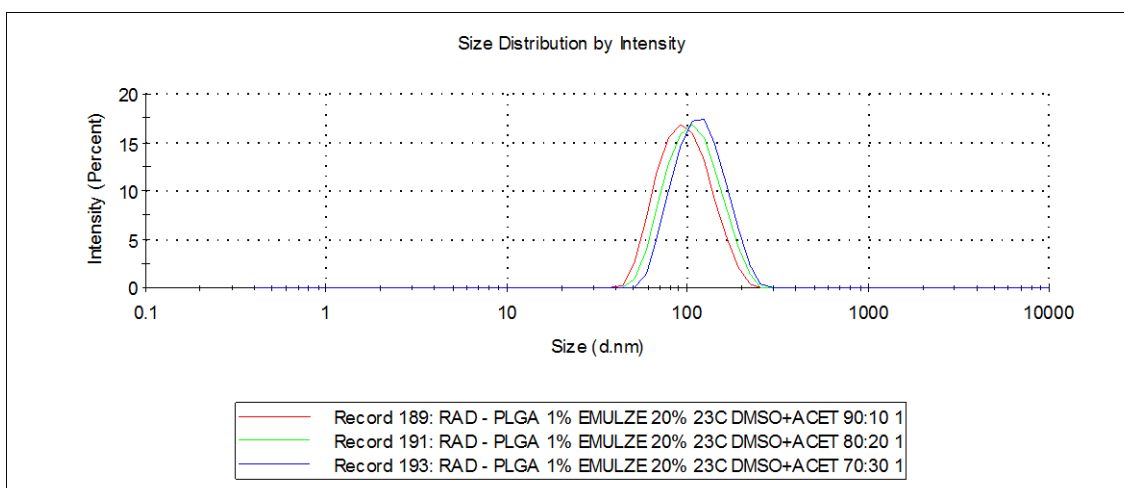
Vliv teploty a směsi rozpouštědel DMSO-ACN a jejich poměrů na velikost částic 1% PLGA polymeru při použití 20% emulze.



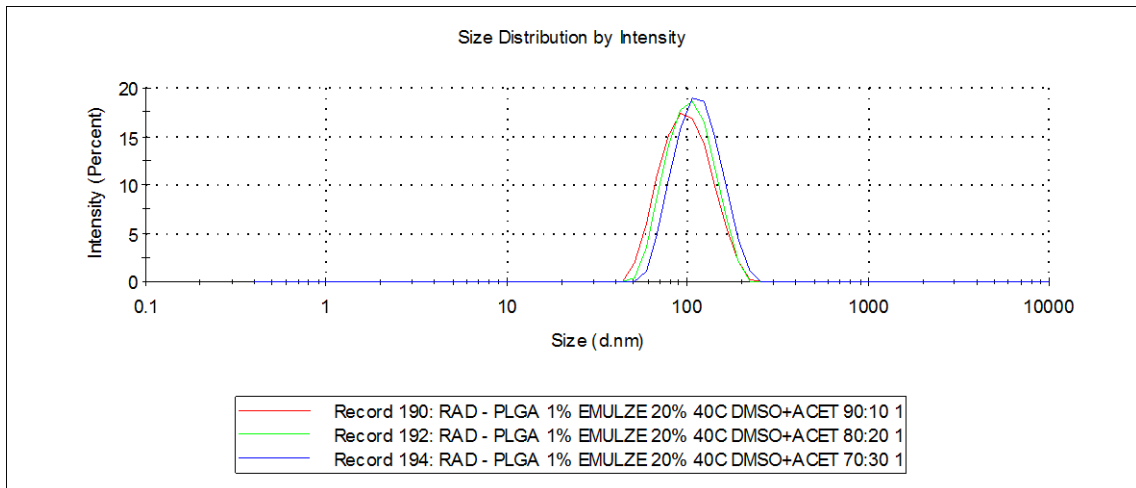
Tabulka č. 19

Vzorek	Polymer	Emulze	Teplota[°C]	Rozpouštědlo	d[nm]		Z-Ave [nm]
					Peak 1	Peak 2	
72.	PLGA 1%	20%	23	DMSO+ACET(90:10)	100,5	0	90,97
73.	PLGA 1%	20%	23	DMSO+ACET(80:20)	111,6	0	101,0
74.	PLGA 1%	20%	23	DMSO+ACET(70:30)	121,2	0	110,7
75.	PLGA 1%	20%	40	DMSO+ACET(90:10)	102,4	0	93,31
76.	PLGA 1%	20%	40	DMSO+ACET(80:20)	107,1	0	99,52
77.	PLGA 1%	20%	40	DMSO+ACET(70:30)	117,5	0	109,5

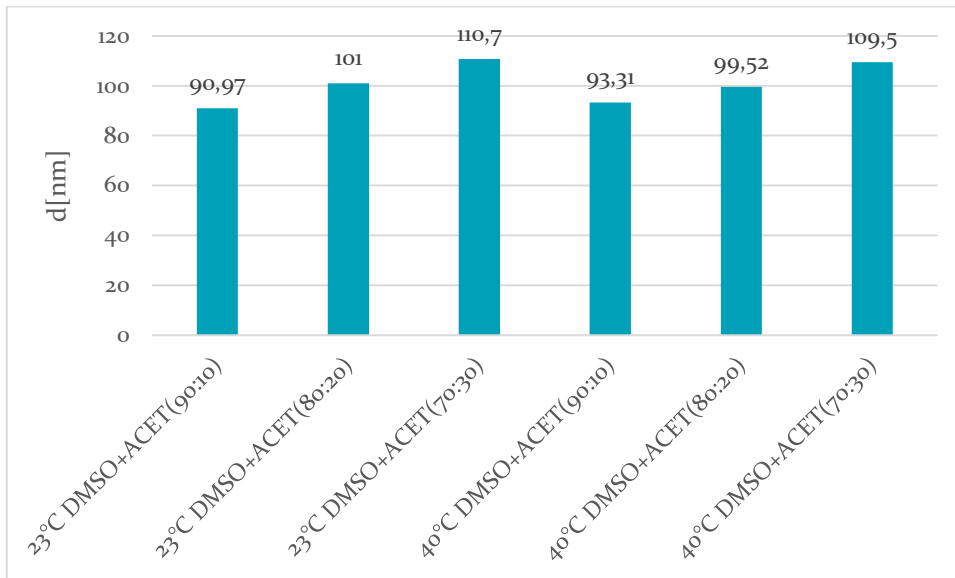
Frekvenční křivka vzorků č. 72-74



Frekvenční křivka vzorků č. 75-77



Vliv teploty a směsi rozpouštědel DMSO-ACET a jejich poměrů na velikost částic 1% PLGA polymeru při použití 20% emulze.



4. Diskuse

4.1 K volbě podmínek přípravy nanočástic

Vycházelo se z dříve dosažených poznatků. Pro získání dostatečných výtěžků byla pro přípravu většiny vzorků zvolena emulze s 20% koncentrací vnitřní fáze emulze. Tato fáze byla tvořena ve většině případů roztoky nosiče označeného symbolem T3. Jednalo se o terpolymer kyselin DL-mléčné a glykolové větvený na centrální molekule tripentaerytritolu. Menší počet vzorků byl připraven z roztoků PLGA s nižší molekulovou hmotností. Koncentrace polymeru v rozpouštědle byla studována na dvou úrovních, jednak jako 1% a také jako 3%. Kromě těchto nosičů byla v některých případech do vnitřní fáze emulze inkorporována báze terbinafinu. Další složkou ve vnitřní fázi emulze bylo rozpouštědlo. Kromě ethylmethylketonu a ethylacetátu jako rozpouštědel s omezenou mísitelností ve vodě byl použit dimethylsulfoxid a aceton jako rozpouštědla neomezeně mísitelná s vodou.

Vnější vodná fáze emulze byla modifikována jednak volbou různých emulgátorů v různých koncentracích a také její zvýšenou teplotou.

Výsledky experimentální práce jsou komplexně shrnuty v 19 tabulkách komplexního charakteru zahrnujících podmínky přípravy, autentické záznamy z přístroje měřícího velikost částic a grafického vyjádření průměrné velikosti částic v podobě sloupcového grafu.

4.2 Vliv ionických emulgátorů na dispergaci polymerů rozpuštěných v ethylmethylnketonu

V Tabulce č. 1 jsou parametry částic připravených z 1% roztoků polymerů za použití 0,2% hydrobromidu cetrimidu a sodné soli laurylsíranu sodného. Z výsledků je patrné, že jako emulgátor je použitelný pouze cetrimid pro dispergaci 1% nosiče T3. Střední intenzitní průměr 700 nm je však příliš velký pro zamýšlené účely využití. V tabulce č. 2 jsou obdobné vzorky. Ionické tenzidy s vysokými hodnotami HLB, jako je sodná sůl laurethsíranu a cetrimid v koncentraci 0,2 % nevedou k dostatečně účinné dispergaci roztoku polymeru T3, laurylsíran sodný patrně solubilizuje připravené částice, 1% směs polysorbátu s lecitinem v poměru 1:1 je nejúčinnější, střední rozměr 620 nm je však také příliš velký. Analogické vzorky lišící se pouze 3% koncentrací polymeru v iniciační fázi dispergace poskytovaly obdobné relace, jak je patrné z výsledků v Tabulce 3. Překvapivá je poloha píku intenzitního průměru částic připravených pomocí 1% směsného emulgátoru polysorbátu s lecitinem (460 nm).

Byly také připraveny směsi sodných solí laurylsíranu a laurethsíranu s lecitinem. Jak je možno s tabulky č. 4 posoudit, tyto směsi dávají produkty, které mají pro některé účely vyhovující střední průměr. Nevýhodou je však značná polydisperzita velikosti daná bimodální distribucí s jedním píkem rozměru přibližně 150 nm a druhým píkem v oboru podstatně vyšších hodnot. Po zvýšení koncentrace roztoků polymeru T3 na 3% (Tabulka 5) byly získány opět částice středního rozměru menšího než u analogických vzorků z 1% roztoků v Tabulce 3. Pro účinnější dispergaci roztoků s vyšší viskozitou nemáme vysvětlení. Jako pracovní hypotézu je možno předložit na základě posouzení grafického záznamu frakci velkých částic mimo obor měřitelných částic. Tak velké částice by bylo snadné separovat. Střední rozměr měřitelných částic byl v rozmezí od 170 do 200 nm.

4.3 Vliv ionických emulgátorů na dispergaci polymerů rozpuštěných v dimethylsulfoxidu

Dimethylsulfoxid se liší od výše popsaného ethylmethylketonu svojí neomezenou mísitelností s vodou. Účinnost těchto dvou rozpouštědel složek ve vnitřní fázi byla srovnávána za stejných podmínek. V tabulce č. 6 je jednoznačně prokázáno, že dimethylsulfoxid je rozpouštědlo, které poskytuje podstatně menší částice. Z připojených záznamů jsou patrné značné rozdíly v účinnosti a vycházející z mechanismu působení jednotlivých emulgátorů. Cetrimid vede k trimodální distribuci, směs polysorbátu a lecitinu poskytuje částice s velkou polydisperzitou. Laurylsíran a laurethsíran sodný mají také velkou polydisperzitu a navíc nezanedbatelnou frakci extrémně velkých agregátů. Obdobné byly vzorky lišící se pouze vyšší (3%) koncentrací polymeru T3. Stejně jako v případě ethylmethylketonových roztoků se buď tato změna koncentrace polymeru výrazněji neprojevila, nebo v případě 0,2% cetrimidu došlo k překvapivému snížení velikosti pod 100 nm hranici.

4.4 Vliv koncentrace kationických tenzidů na dispergaci polymeru T3 a PLGA rozpuštěného v dimethylsulfoxidu

Výhodné vlastnosti cetrimidu při dispergaci polyesterů alifatických hydroxykyselin byly již dříve na pracovišti školitele prokázány. V Tabulce č. 8 jsou výsledky dispergace 3% roztoku polymeru pomocí tří koncentrací tohoto emulgátoru v rozmezí od 0,1% do 0,4%. Jeho účinnost se zvyšuje se zvyšující se koncentrací. Pozitivním zjištěním je, že distribuce velikosti nanočástic je unimodální. Částice tohoto velikostního parametru mohou být použity pro testování v biologických systémech.

Při použití polymeru PLGA 3 % byly získány nanočástice s podobným rozdělením velikostí (Tabulka č. 9), odlišný je posun středních hodnot k vyšším přibližně o 40 nm. Vliv stoupající koncentrace na velikost byl při těchto podmínkách také prokázán.

Luviquad® FC 550 je dalším kationickým tenzidem, který byl zahrnut do testování. V Tabulce č. 12 jsou výsledky měření velikosti částic připravených při jeho 0,2%, 0,6% a 2,0% koncentraci. Je patrné, že tento emulgátor není perspektivní pro přípravu nanočástic za daných podmínek. Zvláště při nižších koncentracích byly získány vzorky s nezanedbatelným podílem částic o velikosti nad limitem měřitelnosti.

4.5 Vliv koncentrace emulze na dispergaci polymeru T3 rozpuštěného v dimethylsulfoxidu

Z hlediska výtěžnosti procesu přípravy nebo výroby nanočástic vsádkovou metodou jsou hlavními parametry koncentrace vnitřní fáze a koncentrace emulze. V tabulce č. 10 jsou údaje, které se týkají tří koncentrací emulzí od 5% do 20%. Se snižováním koncentrace se snižuje velikost nanočástic, což patrně souvisí s viskozitou soustavy a případně i frekvencí kolizí částic při přípravě. Pozitivním faktem je velikost částic z 10% emulze pod hranicí 90 nm.

Po přidání 5% methanolu do vnitřní fáze s dimethylsulfoxidem došlo ke zvýšení parametru velikosti nanočástic u všech tří emulzí. Příčinou může být vyšší viskozita vnitřní fáze, případně odlišná rychlost rozdělování směsi rozpouštědel do vnější fáze disperzní soustavy.

4.6 Vliv přísady terbinafinu na dispergaci polymeru T3 rozpuštěného v ethylacetátu

Ethylacetát je rozpouštědlo, které je po dichlormethanu druhým nejčastěji používaným rozpouštědlem polymerů při přípravě nanočástic. Jeho podstatnou výhodou je nízká toxicita. V Tabulce č. 13 jsou výsledky testování tohoto rozpouštědla v souvislosti s inkorporací terbinafinu. Je patrné, že ethylacetát není rozpouštědlo vhodné pro přípravu nanočástic. Byly získány částice s unimodální distribucí a velkou disperzitou velikosti v nezanedbatelné frakci přesahující intenzitní průměr 1000 nm. Po zvýšení koncentrace polymeru na 3 % byla charakteristika velikosti částic ještě větší (Tabulka 14).

4.7 Vliv teploty na dispergaci polymerů T3 a PLGA rozpuštěných v dimethylsulfoxidu

Při různých teplotách se mění parametry vody jako rozpouštědla, mění se také interakce vody s emulgátory. V Tabulce 15 jsou výsledky, které se týkají vlivu obou testovaných polymerů použitých v 1% koncentraci na výslednou velikost nanočástic v suspenzi. Testovaná teplota byla na úrovních 23 °C a 40°C. Z polymeru T3 vznikly při obou teplotách větší nanočástice než z PLGA. Při vyšší teplotě byly částice o několik nanometrů větší. Po přidání acetonitrilu při použití polymeru T3 1% byly částice větší než v předešlém případě nižší koncentrace polymeru bez acetonitrilu. Se zvyšující se koncentrací acetonitrilu se částice zvětšovaly, zvýšení teploty také nepřineslo požadovaný efekt (Tab. 16).

V tabulce 17 jsou výsledky, které se týkají vzorků z polymeru T3 analogických s předešlou sérií. Rozdílné je složení ve smyslu záměny acetonitrilu za aceton. Částice

byly nepatrně menší než v kompozicích s acetonem, jejich velikost je také nepatrně větší po zvýšení teploty na 40 °C.

4.8 Vliv teploty na dispergaci polymeru PLGA ve směsích dimethylsulfoxidu s acetonitrilem a s acetone

Byl použit 1% roztok PLGA a 20% emulze. Se stoupající koncentrací acetonitrilu ve směsi se zvyšovala hodnota charakteristiky velikosti. Vliv teploty nebyl prokázán, jak je možno posoudit z Tabulky č. 18. V tabulce 19 jsou analogické směsi dimethylsulfoxidu s acetonem. Změna teploty v daných mezích se také neprojevila. Se stoupající koncentrací acetonu se také zvyšovaly hodnoty intenzitního průměru.

5. Závěry

1. Byl prokázán výrazný vliv rozpouštědla polyesterů alifatických hydroxykyselin na velikost částic připravených emulsí metodou. Jako nejvýhodnější rozpouštědlo z hlediska dosažení nejmenších nanočástic se projevil dimethylsulfoxid, částice připravené z ethylacetátových roztoků byly větší, z ethylmethyketonových roztoků byly zcela nevyhovující. Směsi rozpouštědel s acetonitrilem nebo acetonem se také neosvědčily.
2. Anionické emulgátory, jako byl laurylsíran a laureth-2 síran sodný neposkytovaly v případě ethylmethyketonu jako rozpouštědla částice vhodných parametrů, směsi neionického polysorbátu 20 s amfoterním hydrogenovaným lecitinem dávaly nadějně produkty, jako výhodný se jevil cetrimid, jiný kationický tenzid Luviquat FC 550 nebyl dostatečně účinný.
3. Zvýšení teploty soustavy z 20 °C na 40 °C nemělo požadovaný účinek z hlediska získání částic menších rozměrů.

6. Zdroje literatury a obrázků

1. West JL and Halas NJ, Applications of nanotechnology to biotechnology commentary. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:215.
2. Clancy L, Goodman P, Sinclair H, Dockery DW., Effect of air-pollution control on deathrates in Dublin, Ireland: an intervention study: *Lancet* 2002; 360: 1210-1214.
3. Schins RPF, McAlinden A, McNee W, Jimenez LA, Ross JA, Guy K. Persistent depletion of I kappa B alpha and interleukin-8 expresion in human pulmonary epithelialcells exposed to quarz particles. *Toxicol ApplPharmacol*, 2000; 167: 107-117.
4. Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(10):634–641.
5. Leonarduzzi G, Testa G, Sottero B, Gamba P, Poli G. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation v flavonoids. *Curr Med Chem*. 2010;17(1):74–95.
6. Fahr A, van Hoogevest P, May S, Bergstrand N, Leigh ML. Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: consequences for drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2005;26(3–4):251–265.
7. Üner M, Yener G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administrati routes and future perspectives. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(3):289–300.
8. Reverchon E and Adami R. Nanomaterial and supercritical fluids, 2006;(37):1-22.
9. PrasadRaoJ, KurtE.Geckeler Polymer nanoparicles: Preparation techniques and size control parameters, Progress in Polymer Science G Model. *J Pharm Pharmaceuti Sci* -674.

10. Reis C.P, Neufeld R.J, Rabiero A.J, Veiga F. Nanocapsulation I. Methods of preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles
Nanomedicine:Nanotechnology, Biology, and Medicine 2 (2006) 8-21.
11. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. Preparation of biodegradable control.nanoparticles of water-soluble and insoluble drugs with D-Lactide /glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent difusion method, and drug release behavior. *J.Contro.Release* 1993;(25):89-98.
12. Fernandez-Urrusuno R, Calvo P, Remunan-Lopez C, Villa-Jato J.L, Alonso M.J. Enhancement of nasal absorbtion of insulin using chitosan nanoparticles, *Pharm Res* 1999; (16): 1576-1581.
13. Xu Y, Du Y, Huang, R, Gao, L. Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. *Biomaterials* 2003, (24): 5015–5022.
14. Ekman, B., Sjfhholm, I., 1978. Improved stability of proteins immobilized in microparticles prepared by modified emulsion polymerization technique. *J. Pharm. Sci.*1978; 67:693-6.
15. York P. Strategies for particle desing using sepercritical fluid technologies. *Pharm Sci Technol Today* 1999; 2:430-440
16. Weber M, Thies MC. Understanding the REES proces. In: SunYP, editor. Supercritical fluid techology in materials science and engineering: synthesis, properties and applications. New Yourk:Marcel Decker;2002,387-437
17. Meziani MJ, Pathak P, Huruzeanu R, Thies MC, Enick RM, Sun YP. Supercritical fluid processing technique for nanoscale polymer particles. *Angew Chem Ind Ed*2004;43:7047
18. Kalani M, Yunus R. Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. *Intl J of Nanomedicine*. 2011;6:1429-1442. doi:10.2147/IJN.S19021.

19. Panyam J, Labhasewar V; Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55:329-47
20. Ševčíková P, Kašpárková V, Krejčí J, Vltavská P; Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chem. Listy* 2014; 108, 479–482
21. Furusawa, K., Uchiyama, K. Collaborative studies of zeta-potential measurements and electrophoretic measurements using reference sample. *Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects*,1998; 140(1-3), 217-226.
22. Bukšek, H, Luxbacher T, Petrinić, I. Zeta potential determination of polymeric materials using two differently designed measuring cells of an electrokinetic analyzer. *Acta Chimica Slovenica*, 2010; 57(3), 700-706.
23. Freitas, C, Müller R H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International Journal Of Pharmaceutics*,1998; 168, 221-229.
24. Sze A, Erickson D, Ren L, Li D, Zeta-Potential Measurement Using Smoluchowski Equation and the Slope of Current-Time Relationship in Electro-osmotic Flow. *J Colloid Interface Sci*; 2003 (261), 402-410
25. Song X,Bi Y, Cai Z, Chen Q, Li Y, Hou S, Zhao Y, Wu W. PLGA nanoparticles loaded within vicristin sulphate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency; *Int J of Pharmaceutics*, 2008, 350(1-2):320-329
26. Truong, N.P.; Whittaker, M.R.; Mak, C.W.; Davis, T.P. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015 (12): 129–142
27. Swapp S. *Scanning Electron Microscopy (SEM)* [online]. [cit. 29.7.2016]. Dostupný na WWW: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html

28. AUTOR NEZNÁMÝ. <http://www.wikiskripta.eu/> [online]. [cit. 29.7.2016].
Dostupný na WWW:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektronov%C3%BD_mikroskop
29. AUTOR NEZNÁMÝ. <http://www.wikiskripta.eu/> [online]. [cit. 29.7.2016].
Dostupný na WWW:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Kontrastov%C3%A1n%C3%AD_v_elektronov%C3%A9_mikroskopii
30. Jain K.K, Role of nanobiotechnology in developing personalized medicine for cancer. *Technol Cancer Res Treat.*2005;4,645-650
31. Brannon-Peppas L, Blanchette J. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy . *Adv Drug Deliv Rev.*2004;56(11):1679-1659
32. Parveen S, Sahoo S. Polymeric nanoparticles for cancer therapy . *J Drug Target,* 2008; 16(2) :108-123
33. Yoo H, Park T. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *J Control Release.* 2004;96(2):273-283
34. Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release.*2007;40(5):731-739
35. Byrne J, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.*2008;60(15):1615-1626
36. Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.*2006;103(16):6315-6320

Obrázky

1. Watkins R, Wu L, Zhang C, Davis RM, Xu B. *www.dovepress.com/* [online]. [cit. 20.7.2016]. Dostupný na WWW:
https://www.dovepress.com/cr_data/article_fulltext/s92000/92162/img/IJN-92162-F01.jpg
2. Christoforidis J.B, Chang S, Jiang A, Wang J, Cebulla C.M, Davis R.M, Xu B. *www.hindawi.com/* [online]. [cit. 20.7.2016]. Dostupný na WWW:
<http://www.hindawi.com/journals/mi/2012/126463/fig3/>
3. Dudala T.B, Yalavarthi PR, Vadlamudi HC, Thanniru J, Yaga G, Mudumala NL, Pasupati VK. *http://www.jpionline.org/* [online]. [cit. 22.8.2016]. Dostupný na WWW:
http://www.jpionline.org/viewimage.asp?img=PharmInvestigations_2014_4_4_149_143112_f1.JPG
4. Wang Y, Li P, Truong-Dinh Tran T, Zhang J, Kong L. *http://www.mdpi.com/* [online]. [cit. 20.7.2016]. Dostupný na WWW:
http://www.mdpi.com/nanomaterials/nanomaterials-06-00026/article_deploy/html/images/nanomaterials-06-00026-g004-1024.png
5. Autor neuveden. *http://www.icpf.cas.cz/* [online]. [cit. 20.7.2016]. Dostupný na WWW:
http://www.icpf.cas.cz/cs/system/files/users/public/bendova_8/superkrit_diagram.jpg
6. Suresh P, Rabinaryan P. *http://openaccesspub.org/* [online]. [cit. 27.7.2016]. Dostupný na WWW:
http://openaccesspub.org/journals/article_images/image/17japst-12-145-f2.png
7. Fonseca A.C, Ferreira P, Cordeiro R. *https://www.researchgate.net/* [online]. [cit. 27.7.2016]. Dostupný na WWW:
https://www.researchgate.net/profile/Paula_Ferreira11/publication/235348350/figure/fig23/Figure-37-7-Representation-of-the-system-for-the-preparation-of-nanoparticles-by-RESOLV.png

8. Wakure B.S.. <http://www.slideshare.net/> [online]. [cit. 27.7.2016]. Dostupný na WWW: <http://image.slidesharecdn.com/pharmaceuticalapplicationsofscft-090309093925-phpapp01/95/pharmaceutical-applications-of-scft-21-728.jpg?cb=1236591653>
9. Autor neznámý. <http://nanocomposix.eu/> [online]. [cit. 27.7.2016]. Dostupný na WWW: http://50.87.149.212/sites/default/files/images/knowledge-base/general/Zeta_potential.png
10. Luo J, Yao J, Lu Y, Ma W, Zhuang X. <http://www.mdpi.com/> [online]. [cit. 27.7.2016]. Dostupný na WWW: http://www.mdpi.com/sensors/sensors-13-03986/article_deploy/html/images/sensors-13-03986f4-1024.png
11. Jhaveri A.M, Torchilin V.P. <http://journal.frontiersin.org/> [online]. [cit. 27.7.2016]. Dostupný na WWW: http://www.frontiersin.org/files/Articles/88656/fphar-05-00077-r2/image_m/fphar-05-00077-g002.jpg
12. Gu F, Zhang L, Teply B.A, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno A.F, Langer R, Farokhzad O.C. <http://www.pnas.org/> [online]. [cit. 27.7.2016]. Dostupný na WWW: <http://www.pnas.org/content/105/7/2586/F1.large.jpg>