

**Univerzita Karlova**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

**Modifikace parametrů nanočástic  
z polyesterů alifatických hydroxykyselin**

Diplomová práce

Hradec Králové 2017

Marie Křivková

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

V Hradci Králové

.....

## **Poděkování**

Děkuji doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc., za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji i ostatním pracovníkům z Katedry farmaceutické technologie, kteří mi s diplomovou prací pomáhali. Velké díky patří mé rodině a partnerovi za podporu během celého studia.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Student: Marie Křivková

Název diplomové práce: Modifikace parametrů nanočástic z polyesterů alifatických hydroxykyselin

V teoretické části jsou charakterizované polyestery alifatických  $\alpha$ -hydroxykyselin. Značná část je věnována zejména polyesteru PLGA, u kterého jsou popsány fyzikálně-chemické vlastnosti, proces biodegradace a biodistribuce. Dále jsou uvedené příklady využití PLGA ve farmacii a v medicíně. Teoretická část popisuje také difúzní metodu pro přípravu nanočástic, která byla použita v části experimentální, a dále princip měření velikosti nanočástic a jejich povrchového náboje. Stěžejní část diplomové práce je založena na experimentu. Experiment je zaměřen na různé přístupy k formulaci nanočástic z alifatických polyesterových nosičů s různou konstitucí molekul. Použity byly polymery PLGA s lineární molekulou a polymery obsahující PLGA větvenou na trientaerythritolu a na kyselině polyakrylové. Z těchto nosičů byly připraveny nanočástice difúzní metodou. Vodná vnější fáze byla modifikována cetrimidem použitým v různé koncentraci před dispergací a po dispergaci roztoku polymerů. Do nanočástic tvořících vnitřní dispergovanou fázi byl alternativně inkorporován cetrimid za vzniku kompozitních struktur. Takto připravené vzorky byly hodnoceny z granulometrického hlediska a z aspektu povrchového náboje.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Student: Marie Křivková

Title of Thesis: Modification of parameters of nanoparticles prepared from aliphatic hydroxyacids polyesters

Polyesters of aliphatic  $\alpha$ -hydroxyacids are mentioned in the theoretical part. A significant part of it is mostly devoted to the polyester PLGA. Physicochemical properties, the process of biodegradation and biodistribution are described there. Subsequently, some examples of PLGA utilization in pharmacy and medicine are mentioned. The theoretical part deals also with the method of diffusion used for nanoparticles preparation, which was used in the experimental part, and the principles of size and surface charge measurements of these nanoparticles. The crucial part of this master thesis is based upon an experiment. It is focused on various approaches to the formulation of nanoparticles out of aliphatic polyester carriers with variable molecular constitution. Polymer PLGA with linear molecule and polymers containing PLGA branched on triphentaerythritol and polyacrylic acid were used. Using the diffusion method, nanoparticles were prepared out of these carriers. The outer water-based phase was modified by use of cetrimide of different concentrations before and even after the polymer solutions dispersion. Cetrimide was alternatively incorporated into the nanoparticles which formed the inner dispersive part of the phase by creating composite structures. Samples obtained by this way were assessed from granulometric and surface charge points of view.

# Obsah

1 Zadání práce.....	9
2 Seznam použitých zkratk ..... 10	10
3 Úvod.....	11
4 Teoretická část .....	12
4.1 Nanočástice.....	12
4.1.1 Obecná charakterizace .....	12
4.1.2 Pomocné látky pro přípravu nanočástic.....	12
4.2 Alifatické polyestery $\alpha$ -hydroxykyselin .....	13
4.2.1 Obecná charakterizace .....	13
4.2.2 PLGA .....	13
4.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti PLGA .....	14
4.2.4 Biodegradace PLGA .....	15
4.2.5 Faktory ovlivňující degradaci PLGA.....	16
4.2.6 Biodistribuce PLGA .....	17
4.2.7 Využití PLGA nanotechnologie ve farmacii a medicíně.....	18
4.3 Příprava nanočástic metodou nanoprecipitace.....	21
4.4 Velikost částic.....	23
4.5 Zeta potenciál částic.....	25
5 Experimentální část.....	28
5.1 Použité přístroje .....	28
5.2 Použité chemikálie.....	28

5.2.1 Seznam chemikálií .....	28
5.2.1 Charakteristika chemikálií .....	29
5.3 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství polymeru ve vnitřní fázi.....	30
5.4 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství centrimidu přidaném do vnější fáze.....	31
5.5 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství cetrimidu přidaném do hotové nanodisperze .....	32
5.6 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze.....	33
5.7 Měření velikosti a zeta potenciálu nanočástic .....	34
5.8 Příprava roztoků polymerů pro měření povrchového napětí a viskozity.....	35
5.9 Měření povrchového napětí roztoků polymerů.....	36
5.10 Měření viskozity roztoků polymerů.....	37
5.11 Enkapsulační účinnost nanočástic .....	38
5.11.1 Kalibrační křivka pro měření enkapsulační účinnosti nanočástic s fluoresceinem .....	38
5.11.2 Návrh postupu přípravy nanočástic s fluoresceinem a postupu měření enkapsulační účinnosti.....	41
6 Výsledky .....	43
6.1 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství polymeru ve vnitřní fázi ..	43
6.2 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnější fáze .....	49
6.3 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do hotové nanodisperze .....	54

6.4 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze .....	56
6.5 Povrchové napětí roztoků polymerů .....	58
6.6 Viskozita roztoků polymerů.....	60
6.7 Kalibrační křivka fluoresceinu pro měření enkapsulační účinnosti nanočástic	65
7 Diskuze .....	66
7.1 K tématu diplomové práce .....	66
7.2 Nanočástice připravené bez tenzidu .....	67
7.3 Nanočástice připravené v roztocích tenzidu .....	68
7.4 Nanočástice připravené bez tenzidu dekorované cetrimidem.....	69
7.5 Nanočástice připravené inkorporací tenzidu do vnitřní fáze .....	69
7.6 K povrchovému napětí roztoků polymerů .....	70
7.8 K viskozitě roztoků polymerů.....	70
8 Závěr .....	71
9 Seznam tabulek .....	72
10 Seznam obrázků .....	74
11 Seznam použité literatury .....	77



## **1 Zadání práce**

Cílem předložené práce bylo vyzkoušet různé modifikace difúzní metody přípravy nanočástic z polyesterů alifatických hydroxykyselin s odlišnou konstitucí molekul. Byly předloženy polymerní a oligomerní sloučeniny odvozené od PLGA jednak ve formě lineární molekuly, jednak v podobě struktur PLGA větvených na tripentaerythritolu a na kyselině polyakrylové. Zájmem bylo prozkoumat možnosti inkorporace cetrimidu jako modelového API (Active Pharmaceutical Ingredient) do nanočástic a alternativně také vyzkoušet možnosti jeho navázání na povrch nanočástic jednak v procesu jejich vzniku, jednak přidáním tohoto tenzidu do hotové stabilizované nanodisperze.

## **2 Seznam použitých zkratek**

<b>A2</b>	Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a kyseliny polyakrylové 2%
<b>A4</b>	Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a kyseliny polyakrylové 4%
<b>Cetrimid</b>	N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>PdI</b>	Index polydisperzity
<b>Pk Area Int</b>	Plocha píku
<b>Pk Mean Int</b>	Výška píku
<b>PLGA</b>	Kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné 50:50
<b>T3</b>	Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu 3%
<b>Z-Ave</b>	Z-Average, střední hodnota velikosti částic měřená jako průměr (diameter) částic
<b>ZP</b>	Zeta potenciál

### **3 Úvod**

Nanotechnologie je věda, která propojuje poznatky jak technické, tak fyzikální i chemické. Charakterizuje materiály v řádu nanometrů, obvykle od 1 do 100 nm. Zkoumá částice až na úrovni jednotlivých atomů a molekul. Osobou, která jako první vznesla myšlenku nanotechnologie v roce 1867 během svého experimentu známého jako Maxwell's Demon (Maxwellův démon), byl skotský vědec James Clerk Maxwell. Avšak za otce nanotechnologie je považován americký vědec Richard Feynman, který na výroční konferenci Americké společnosti fyziků v Caltechu v roce 1959 představil myšlenku a koncept nanovědy v přednášce *There's Plenty of Room at the Bottom* (Tam dole je spousta místa) a popsal postup, podle něhož by měli být vědci schopni manipulovat s jednotlivými atomy a molekulami. V dnešní době je nanotechnologie široce používána v různých oblastech, jako je molekulární biologie, organická chemie, lékařské vědy, elektronika, biomateriály, výroba energie ad. (1).

V posledních přibližně padesáti letech lze pozorovat i ve farmaceutické technologii rozvoj a využití nanotechnologie. Během této doby došlo k přechodu od jednotkových lékových forem (tobolek, tablet, mastí, injekčních roztoků apod.) k vývoji násobných lékových forem, jako jsou např. pelety, mikročástice anebo právě nanočástice. Postupem času dochází k jejich zavádění do terapeutické praxe. Jedním z důvodů jsou nepochybné přednosti, které částicové lékové formy nabízejí. Z farmakoterapeutického hlediska je to především zmírnění vedlejších nežádoucích účinků jak lokálních, tak i systémových. Dále pak zvýšení účinnosti terapie nebo možnost řízeného uvolňování léčiv (2).

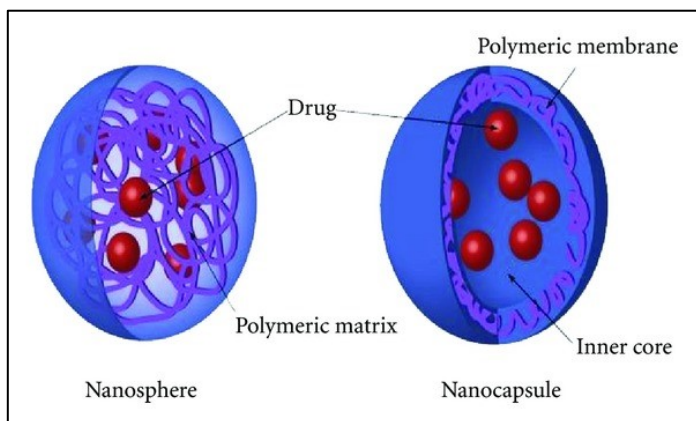
## **4 Teoretická část**

### **4.1 Nanočástice**

#### **4.1.1 Obecná charakterizace**

Nanočástice jsou obecně definovány jako pevné koloidní částice, které se liší především svou strukturou a velikostí. Z hlediska struktury nanočástic rozlišujeme nanosféry a nanotobolky jako dva základní typy. Nanosféry mají matricový charakter. Pokud obsahují léčivou látku, je rovnoměrně dispergovaná v celé části matrice. Nanotobolky se vyznačují jádrem, do kterého může být umístěna léčivá látka, a stěnou. Velikostní rozmezí definující nanočástice není úplně jednotné. V nanotechnologii se udává rozmezí od 1 do 100 nm, jak již bylo zmíněno v úvodu. Nicméně v běžné praxi dosahují nanočástice určené pro terapii nebo diagnostiku obvykle velikosti 100–500 nm. Za horní velikostní limit nanočástic je v biologických a lékařských disciplínách považován průměr 1000 nm (3).

*Obrázek 1 Struktura nanosféry a nanotobolky (4)*



#### **4.1.2 Pomocné látky pro přípravu nanočástic**

Pro přípravu nanočástic ve farmaceutické technologii se používá celá řada pomocných látek, jejichž počet na základě rychlého vývoje stále stoupá. K základním nejčastěji používaným materiálům patří alifatické polyestery (kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová a jejich kopolymery, poly- $\epsilon$ -kaprolakton), polyhydroxyalkanoáty, polyalkylkyanoakryláty, polysacharidy nebo albumin

či želatina (2). Obecně musí nanomateriály používané jako nosiče léčiv vykazovat kompatibilitu s léčivou látkou, biokompatibilitu, vhodnou biodegradační kinetiku a vhodné mechanické vlastnosti (5).

## **4.2 Alifatické polyestery $\alpha$ -hydroxykyselin**

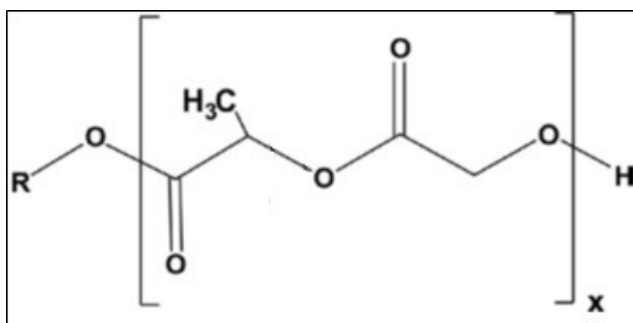
### **4.2.1 Obecná charakterizace**

Alifatické polyestery tvořené  $\alpha$ -hydroxykyselinami, jako je kyselina polymléčná, kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) nebo poly- $\epsilon$ -kaprolakton, představují širokou škálu syntetických biodegradabilních polymerů, u nichž byla a je rozsáhle zkoumána možnost jejich lékařského využití. Tyto polymery mají velmi dobrou tkáňovou snášenlivost a bezpečnostní profil. Byly schváleny Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických) a European Medicine Agency (Evropská léková agentura) pro biomedicínskou aplikaci v podobě nosičů léčiv, stehů či implantátů. Biodegradovatelné nanočástice z těchto polymerů byly zkoumány jako nosiče hydrofobních i hydrofilních léčiv (6). Mají nepochybné výhody jako např. možnost prodlouženého uvolňování léčivé látky nebo zvýšení stability léčiv (5).

### **4.2.2 PLGA**

Jak již bylo zmíněno výše, zkratka PLGA představuje kopolymer dvou  $\alpha$ -hydroxykyselin, kyseliny mléčné (LA) a kyseliny glykolové (GA). Kyselina mléčná obsahuje chirální uhlíkový atom. Podle uspořádání substituentů na tomto uhlíku rozlišujeme D- a L-formu kyseliny mléčné. Pod obecnou zkratkou PLGA se rozumí, že zastoupení D- a L-formy kyseliny mléčné je ve stejném poměru (7). Syntéza PLGA probíhá tedy za použití racemické směsi těchto dvou kyselin. Během polymerace dojde mezi monomery k vytvoření esterové vazby, čímž vzniká lineární, amorfní polyester PLGA. Různé formy PLGA jsou obvykle označeny vzájemným poměrem monomerů. Např. PLGA 50:50 znamená, že tento kopolymer obsahuje 50 % kyseliny mléčné a 50 % kyseliny glykolové (8).

**Obrázek 2** Struktura PLGA (9)



Polyester PLGA je velice dobře odbouratelný a biokompatibilní. Tento biomateriál je již komerčně dostupný a patří k nejpoužívanějším polyesterům v biomedicině vůbec. Používá se ve formě různých systémů určených pro podávání léčiv, jako jsou nanočástice, mikrosféry, pelety, membrány, matrice ad. Nanočástice z PLGA slouží např. jako nosiče léčiv ze skupiny antipsychotik, anestetik, antibiotik, antiparazitik, hormonů, protinádorových látek ad. (9).

#### **4.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti PLGA**

K tomu, aby mohla být látka použita pro formulaci přípravku určeného pro řízené podání léčiva, je nutné znát fyzikální a chemické vlastnosti dané látky (7). Mezi základní vlastnosti polymerů patří molekulová hmotnost, krystalinita, index polydisperzity a teplota skelného přechodu. Tyto vlastnosti pak mají vliv na mechanickou pevnost polymeru, na jeho tokové chování, na rychlost biodegradace a hydrolýzy.

Fyzikálně-chemické vlastnosti obou opticky aktivních forem kyseliny mléčné jsou do jisté míry stejné. Obecně platí, že polymer kyseliny L-mléčné (PLLA) se vyskytuje v krystalické formě a polymer kyseliny D-mléčné (PDLA) v důsledku neuspořádaných polymerních řetězců ve formě amorfni. Kyselina polyglykolová (PGA) nemá na rozdíl od kyseliny polymléčné (PLA) žádnou postranní methylovou skupinu. Z toho důvodu vykazuje vysoce krystalickou strukturu. Výsledná krystalinita PLGA vychází tedy především z poměru jednotlivých monomerních složek. Obecně platí, že čím více je v PLGA zastoupena kyselina mléčná oproti kyselině glykolové, tím je výsledný stupeň krystalinity kopolymeru nižší (10; 7).

PLGA 50:50 má teplotu skelného přechodu ( $T_g$ ) 45 °C. Teplota skelného přechodu je tedy nad fyziologickou teplotou 37 °C. Proto je tento kopolymer v organismu obvykle ve skelném stavu, což mu dává významnou mechanickou pevnost. Bylo zjištěno, že teplota skelného přechodu klesá s poklesem obsahu kyseliny mléčné v kopolymeru. Mechanická pevnost je mimo jiné ovlivňována i molekulovou hmotností a indexem polydispersity (11).

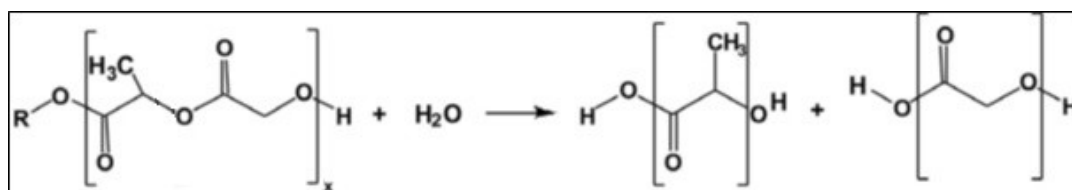
Vzájemný poměr monomerů ovlivňuje také rychlost biodegradace a hydrolyzy PLGA. PLA je díky přítomnosti postranních methylových skupin více hydrofobní oproti PGA. PLGA polymery, kde je tedy více zastoupena složka LA, absorbují méně vodu a díky tomu se rozkládají pomaleji. Zpravidla se zvyšujícím se obsahem GA stoupá tedy i rychlost hydrolyzy. Výjimkou je však PLGA 50:50, který vykazuje nejrychlejší hydrolyzu vůbec (7; 11).

#### 4.2.4 Biodegradace PLGA

Kopolymer PLGA podléhá ve vodném prostředí degradaci na základě hydrolyzy esterových vazeb řetězce. Bylo zaznamenáno, že hydrolyza řetězců nabobtnalého polymeru je náhodná. Proces biodegradace lze rozdělit do tří fází:

- 1) V první fázi probíhá náhodně proces štěpení řetězců polymeru. Během tohoto procesu značně klesá molekulová hmotnost polymeru. Nedochozí však k tvorbě rozpustných monomerů.
- 2) Ve druhé fázi je pokles molekulové hmotnosti doprovázen rozpadem tělesa polymeru a začínají být formovány produkty ve formě oligomerů a monomerů.
- 3) Ve třetí fázi jsou oligomerní fragmenty štěpeny až na jednotlivé rozpustné monomery. V této fázi dochází ke kompletnímu rozpuštění polymeru (12).

**Obrázek 3 Hydrolyza PLGA (13)**



PLGA nanočástice podstupují hydrolyzu esterových vazeb i v lidském těle. Vzniklé monomery a oligomery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové jsou běžnými vedlejšími produkty metabolických drah za normálních fyziologických podmínek. Díky tomu jsou produkty degradace jednoduše metabolizovány v těle pomocí Krebsova cyklu a následně eliminovány. Na základě toho je toxicita spojená s používáním PLGA jako nosiče léčiv nebo biomateriálů minimální. Úloha enzymů v procesu biodegradace PLGA je zřejmě nevýrazná. Většina literárních zdrojů uvádí, že degradace probíhá bez jakékoliv enzymatické aktivity a že se jedná čistě jen o hydrolyzu. Jak již bylo zmíněno výše, nejrychleji biodegradabilní je kopolymer PLGA 50:50 (14; 13).

#### **4.2.5 Faktory ovlivňující degradaci PLGA**

Faktorů, které ovlivňují biodegradaci, je celá řada. Pro to, aby byly nosiče léčiv z PLGA co nejefektivnější a nejúčinnější, je třeba tyto faktory znát. Na základě jejich znalosti je lze ovlivnit a tím zvýšit žádoucí vlastnosti PLGA (13).

Jedním z faktorů je kompozice polymeru, tedy vzájemný poměr LA a GA v polymeru. Efekt tohoto faktoru na rychlost degradace je již zmíněn v kapitole 4.2.3. Kompozice polymeru ovlivňuje i další důležité vlastnosti, jako je krystalinita a teplota skelného přechodu. Tyto vlastnosti mají nepřímý vliv na degradaci. V současné době existují protichůdné informace o tom, jaký vliv má krystalinita na rychlost degradace (15). Několik zdrojů se přiklání k tomu, že krystalinita L-formy kyseliny mléčné zvyšuje rychlost degradace proto, že degradace krystalického polymeru probíhá rychleji z důvodu vyšší hydrofilicity. Na rozdíl od toho ale jiné studie ukázaly, že zvýšením krystalinity vzorku dochází ke snížení rychlosti degradace (16). Dalším faktorem je molekulová hmotnost. Molekulová hmotnost má přímý vztah s velikostí polymerního řetězce. Obecně mají polymery s vyšší molekulovou hmotností delší polymerní řetězce a vykazují nižší míru degradace. Degradace delších řetězců tedy vyžaduje více času než degradace řetězců kratších (17).

Velký vliv na degradaci má i typ léčiva, které je zakomponované do polymerní matrice. Přítomnost léčiva může měnit mechanismus degradace



z celkové eroze na povrchovou degradaci (18). Stejně tak může mít vliv i na rychlost degradace. Je tedy potřeba znát chemické vlastnosti léčiva, zejména pak jeho hydrofilitu. Na základě toho pak lze odhadnout uvolňování léčiva ze systému biodegradabilního polymeru. Dalším důležitým faktorem je i množství účinné látky v matrici, které ovlivňuje především rychlost degradace a tím i rychlost uvolnění dané látky. U matric, které mají vyšší obsah léčiva, dochází z počátku k uvolnění většího množství léčiva než u matric s nízkým obsahem účinné látky. Tento jev je dán především poměrem polymeru a léčiva (19).

Neméně důležitým faktorem je i velikost a tvar matrice. Poměr plochy povrchu k objemu je důležitým faktorem degradace zejména u matricí většího typu. Obecně čím větší je plocha povrchu, tím rychleji a ve větším rozsahu probíhá degradace matrice. Tento jev je závislý také na mechanismu degradace polymeru. Degradace, jak již bylo zmíněno výše, může být buď čistě povrchová, nebo objemová. Objemová degradace, kdy dochází k celkové erozi matrice, je rychlejší než degradace povrchová (16).

Vliv na degradaci PLGA má i pH hodnota prostředí. Pokusy *in vitro* prokázaly, že hydrolýza PLGA v alkalickém nebo silně kyselém prostředí probíhá rychleji. Rozdíl ve slabě kyselém a neutrálním prostředí je pak málo výrazný v důsledku autokatalýzy pomocí koncových karboxylových skupin (20).

#### **4.2.6 Biodistribuce PLGA**

Studie biodistribuce ukazují, že nanočástice PLGA zvyšují biodistribuci diagnostických a terapeutických látek. Pomocí PLGA nanočástic dochází ke zvýšené akumulaci a retenci látek v organismu. Jako příklad uvedeme indocyaninovou zeleň, která byla podávána zdravé myši jednak v nanočásticích a jednak v roztoku. Koncentrace indocyaninu byla u myši v obou případech testována pomocí fluorimetrické testovací metody. V případě, kdy byl myši indocyanin podáván ve formě nanočástic, byla jeho koncentrace v orgánech dva až osmkrát a v krvi pět až desetkrát vyšší než v případě, kdy byl indocyanin podáván v roztoku. To naznačuje obrovský potenciál nanočástic PLGA jakožto nosiče léčivých a diagnostických látek. Tento efekt je ještě větší, pokud je povrch nanočástic PLGA stíněný nějakým

hydrofilním polymerem, jako je např. polyethylenglykol (PEG). Nanočástice s hydrofilním polymerním řetězcem na povrchu jsou stericky stabilizované a chráněné proti opsonizaci a následné fagocytóze (21).

#### **4.2.7 Využití PLGA nanotechnologie ve farmacii a medicíně**

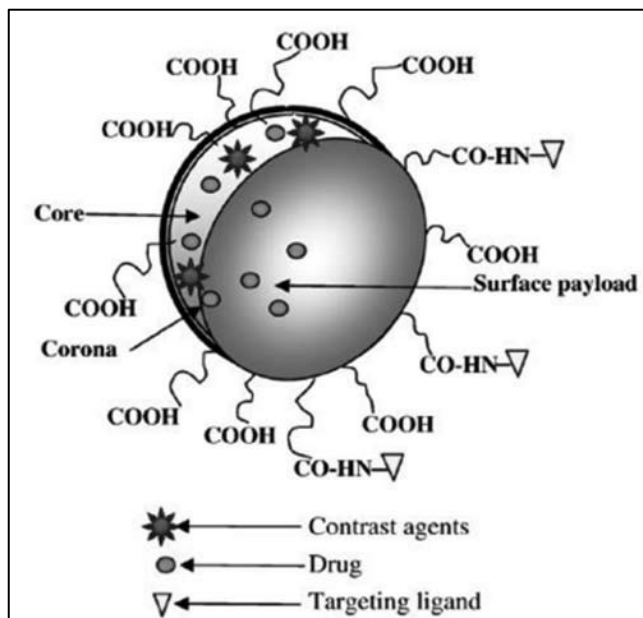
Obecně se očekává, že využití nanotechnologie k podávání léčiv v dohledné době změní charakter farmaceutického a biotechnologického průmyslu. Nanotechnologie v oblasti léčiv přináší řadu možností a výhod. Za použití nanotechnologie lze dosáhnout lepšího přenosu léčiv, která jsou ve vodě špatně rozpustná. Dalším potenciálem je cílená dodávka léčiv do určitých tkáňových a buněčných struktur. Pomocí nanotechnologie lze také umožnit přenos léčiv transcytózou přes těsné epiteliální a endoteliální bariéry. Jednou z výhod je dále přenos makromolekulárních léčiv do intracelulárního prostoru k místu účinku. Také kombinovaná terapie pomocí dvou a více účinných látek je za použití nanotechnologie možná. Neméně důležitá je i možnost kombinace jak terapeutických, tak zobrazovacích činidel, díky nimž lze lokalizovat distribuci léčiv v organismu atd. Výrobní složitost nanotechnologie v oblasti léčiv navíc může představovat velkou překážku pro generické farmaceutické firmy k tomu, aby vyvíjely rovnocenná terapeutika. To by znamenalo velkou výhodu pro inovativní farmaceutické firmy (22).

#### **Nádory**

V posledních letech je věnována velká pozornost nanotechnologii PLGA především v souvislosti s aplikací protinádorových látek. Hlavním důvodem je zvýšení účinnosti a snížení toxicity protinádorových látek. Nanočástice PLGA pro cílenou distribuci protinádorových látek jsou opatřené ligandy, jako jsou např. cytokiny, hormony, očkovací látky nebo chemoterapeutická činidla. Díky tomu vykazují vysokou afinitu a specifčnost k nádorovým buňkám. Nanotechnologie PLGA je intenzivně vyvíjena nejen pro cílenou léčbu, ale i pro diagnostiku nádorů. Nanočástice sloužící k diagnostice nádorů obsahují diagnostické činidlo (např. optické, magnetické nebo radioisotopické) a na svém povrchu mají ligand. Takovéto nanočástice umožňují detekci nádorových buněk v časně fázi nádoru.

Na Obr. 4 je znázorněna multifunkční nanočástice PLGA, sloužící jednak k diagnostice a zobrazení nádoru a jednak k léčbě nádoru, neboť protinádorová látka i diagnostické činidlo mohou být současně zapouzdřeny v jádru nanočástice (13).

**Obrázek 4 Multifunkční PLGA nanočástice obsahující diagnostické činidlo, protinádorovou látku a ligand pro cílenou distribuci (13)**



Nanočástice PLGA jsou pro terapii a diagnostiku nádorů atraktivní také z toho důvodu, že se obecně více hromadí v nádorové tkáni než ve tkáni zdravé. Tento efekt je založen na rozdílné patofyziologii nádorové tkáně. Na rozdíl od zdravé tkáně mají nádory vysokou hustotu abnormálních krevních cév, které jsou dilatované, špatně diferencované, mají chaotické uspořádání a špatné větvení. Cévní systém nádoru je celkově oslabený, což způsobuje vyšší koncentraci plazmatických bílkovin v nádorové tkáni oproti tkáni zdravé. V důsledku toho je v nádoru zvýšená propustnost cév. Zároveň je však snižena rychlost clearance. To je způsobeno nedostatkem lymfatických cév v nádoru. Díky těmto jevům se nanočástice v nádorové tkáni po intravenózním podání pasivně kumulují (23).

Další výhodou nanočástic z PLGA je také to, že vykazují vyšší stabilitu v tělních tekutinách než jiné koloidní nosiče, jako jsou např. liposomy nebo jiné lipidové částice. A to z toho důvodu, že nanočástice PLGA nepodléhají enzymaticky katalyzovanému metabolismu (13).

## Kardiovaskulární systém

Expanze nanotechnologie otevřela nové možnosti i pro léčbu nemocí kardiovaskulárního systému. Pokroky v aplikaci PLGA nanotechnologie v rámci kardiovaskulárního systému jsou zaznamenány především v cévním tkáňovém inženýrství, v diagnostice a léčbě (13).

Tkáňové inženýrství slouží k tvorbě umělých orgánů a tkání, jakou jsou např. i krevní cévy. Jako příklad využití PLGA nanočástic v tkáňovém inženýrství uvedeme technologii pro tvorbu cévních štěpů, kterou vyvinul Sarkar a další. Technologie spočívá v inkorporaci PLGA mikro- a nanočástic do roztaveného biopolymeru poly-ε-kaprolaktonu (PCL). Značně vyšší teplota tání PLGA oproti PCL zajišťuje, že během inkorporace PLGA částic do roztaveného PCL nedojde k porušení a roztavení částic PLGA. Vrstvy PCL s částicemi PLGA jsou lisovány v mechanickém tepelném lisu. Pomocí lisu vznikne tenký film. Film se následně ponoří do roztoku hydroxidu sodného, čímž dochází rychle k degradaci PLGA částic. Struktura PCL zůstane během procesu loužení neporušena. Tím vznikne biodegradabilní mikroporézní cévní štěp z PCL. Vrstvením těchto štěpů lze vytvořit cévní stěnu (24).

Pomocí nanočástic PLGA bylo také dosaženo lepších klinických výsledků při aplikaci stentů z polytetrafluorethylenu (PTFE). Stent z PTFE je pokrýván léčivou látkou paklitaxel, která má zabránit hyperplazii neointimy, ke které po implantaci stentu často dochází. Problém u jednoduše potažených stentů byl ale v tom, že zpočátku došlo k rychlému uvolnění velkého množství paklitaxelu. Paklitaxel byl proto formulován do nanočástic PLGA. Nanočástice byly následně umístěny na vnitřní část PTFE stentů. Tím se dosáhlo řízeného uvolňování paklitaxelu. Z takto modifikovaných stentů se paklitaxel zpočátku neuvolňuje v tak velké dávce, doba uvolňování léčivé látky je naopak prodloužena (25).

Nanočástice se zobrazovacími kontrastními činidly jsou využívány v diagnostice patologických znaků signalizujících počátek aterosklerózy a zánětlivých procesů (13).

Bylo také zjištěno, že mikrobubliny z PLGA jsou stabilní vůči destrukci ultrazvukem. Na základě toho mohou být PLGA mikrobubliny využity při detekci poruch perfuze myokardu pomocí ultrazvuku. Ultrazvuk se od mikrobublin lépe odráží, což zlepšuje kvalitu vyšetření. Navíc PLGA mikrobubliny nevykazují žádný negativní vedlejší účinek na organismus. Injekční aplikaci PLGA mikrobublin pro zlepšení kvality ultrazvukového vyšetření myokardu vyvinul Wheatley a další, kteří provedli *in vivo* studie na králících (26).

Terapeutická aplikace nanomateriálů v léčbě kardiovaskulárních onemocnění zahrnuje i nové technologie pro redukci akumulovaného cholesterolu nebo rozpouštění sraženin (26).

Mimo léčbu nádorů a onemocnění kardiovaskulárního systému je zkoumáno využití nanočástic PLGA i při léčbě řady dalších onemocnění, jako je např. diabetes mellitus, bolest, revmatoidní artritida, onemocnění střev, neurologická onemocnění aj. (13).

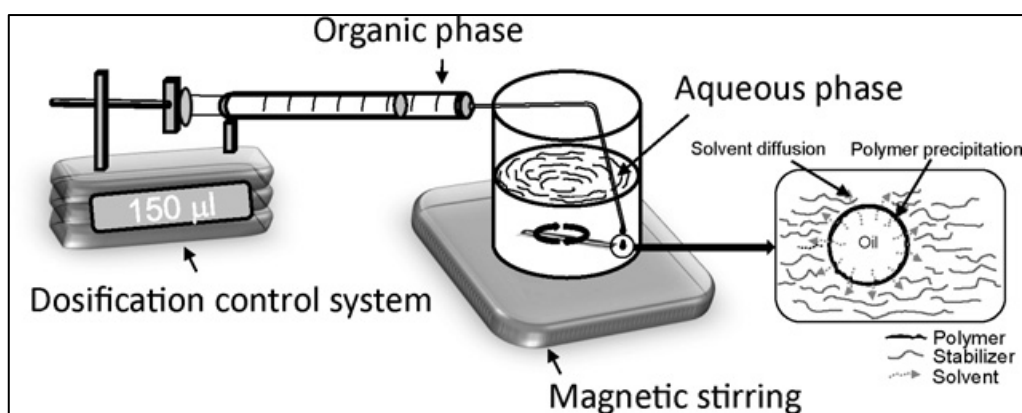
### **4.3 Příprava nanočástic metodou nanoprecipitace**

Nanoprecipitace, nazývaná také jako Solvent Displacement Method (metoda přemístění rozpouštědla) nebo difúzní metoda, je jednou z řady metod, kterou lze použít k přípravě nanočástic. Za průkopníka této metody je považován vědec Fessi H., který ve spolupráci s dalšími vědci publikoval tuto metodu v roce 1988 a nechal si ji spolu s ostatními spolupracovníky patentovat (27).

Tato metoda spočívá v precipitaci polymeru rozpuštěného v organickém rozpouštědle po přidání do vodného prostředí, ve kterém polymer rozpustný není. Polymer se tedy nejprve rozpustí ve středně polárním rozpouštědle, které je mísitelné s vodou. Takto připravená fáze je aplikována injektáží do fáze vodné, která je pomalu míchána. Na základě rychlé difúze rozpouštědla dochází k okamžité spontánní tvorbě emulze. Polymer se nachází na rozhraní mezi vodou a organickým rozpouštědlem a vytváří tak nanočástice. Do fáze organického rozpouštědla může být přidán netoxický olej, který je pak uzavřen v dutině vzniklých nanočástic. Přidání oleje do organického rozpouštědla vykazuje vysokou efektivitu především

pro enkapsulaci lipofilních léčiv. Úspěšnost této jednoduché metody pro přípravu nanočástic je limitována vodou mísitelnými rozpouštědly, u kterých musí být rychlost difúze dostatečná, aby došlo ke spontánní emulgaci. Pokud je rychlost difúze rozpouštědla nedostatečná, dojde k procesu koalescence, během kterého jsou formovány větší kapičky organického rozpouštědla ve vodě, a tudíž nedojde k vytvoření částic o velikosti nanometrů. Klíčovými proměnnými faktory tohoto procesu k tvorbě nanočástic jsou rychlost přidání organické fáze, rychlost míchání vodné fáze a vzájemný poměr těchto fází (28; 29).

**Obrázek 5 Sestava pro přípravu nanočástic metodou nanoprecipitace (27)**



Ohledně mechanismu této metody pro přípravu nanočástic existují neshody. Jedna teorie říká, že proces formování částic metodou precipitace se skládá ze tří stupňů, kterými jsou: nukleace, růst a agregace. Rychlost každého kroku precipitace podmiňuje výslednou velikost částic. Hybnou silou je u této teorie přesycení. Klíčovým faktorem pro získání uniformních nanočástic je separace částic mezi stupněm nukleace a stupněm růstu částic. V ideálním případě by měly být podmínky procesu nastaveny tak, že dojde k rychlé nukleaci závislé na přesycení, zatímco rychlost růstu částic bude pomalá.

Druhá teorie mechanismu nanoprecipitace říká, že k formování částic dochází na základě rozdílného povrchového napětí kapalin. Kapalína s vyšším povrchovým napětím (vodná fáze) působí na kapalinu s nízkým povrchovým napětím (fáze organického rozpouštědla) silněji. Rozdílné povrchové napětí kapalin vytváří gradient mezifázového napětí, který způsobuje turbulence a tepelnou nerovnost v systému vedoucí ke kontinuální tvorbě vírů na rozhraní dvou kapalin. V důsledku

toho je možné pozorovat nucené mísení dvou kapalin. Polymer má tendenci agregovat na povrchu organické fáze a vytvářet tak nanočástice. Na rozdíl od předchozí teorie dochází podle této teorie k formování nanočástic pomocí agregace polymeru ve stabilizovaných kapkách emulze. Stupeň nukleace a růstu nanočástic tato teorie nezahrnuje (27).

#### **4.4 Velikost částic**

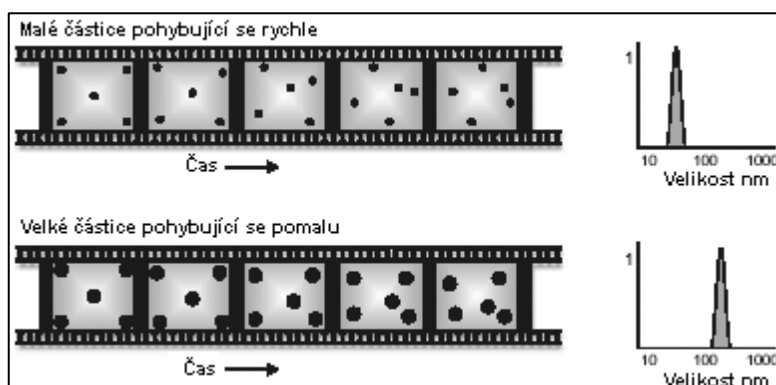
Velikost částic je rozměrová vlastnost částice v prostoru charakterizovaná jednotkou délky. V ideálním případě materiál obsahuje pouze částice stejné velikosti. Naproti tomu reálný materiál se skládá z částic o určitém velikostním rozpětí. V praxi se proto při popisu velikosti používá pojem distribuce velikosti částic. Distribuce velikosti částic vyjadřuje procentuální rozložení částic podle jejich velikosti (30).

##### **4.4.1 Princip měření velikosti částic metodou DLS**

Velikost se stanovuje měřením rychlosti Brownova pohybu částic ve vzorku za použití dynamického rozptylu světla (Dynamic Light Scattering–DLS). Proces měření na základě DLS se provádí osvětlením částic laserem a analyzováním intenzity rozptýleného světla. Velikost částice měřená na přístroji s použitím DLS je vztažená na průměr koule, která difunduje danou rychlostí (31). Tato metoda je nejčastěji používaná při posuzování velikosti nanočástic (32).

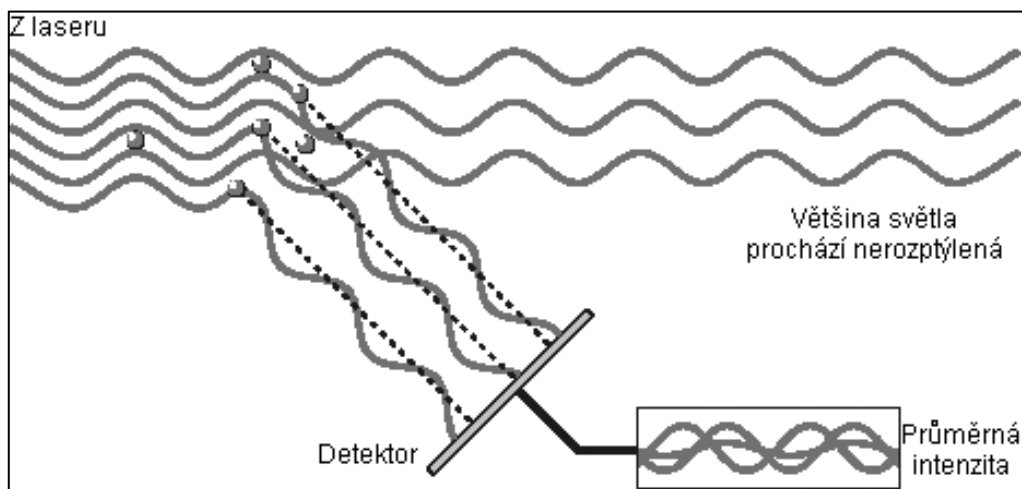
Brownův pohyb je definován jako náhodný neustálý pohyb částic o velikosti 1  $\mu\text{m}$  a méně. Tento neustálý a neuspořádaný pohyb je důsledkem náhodných srážek s molekulami kapaliny, které částici obklopují. Rychlost pohybu částic se používá pro stanovení jejich velikosti. Je známo, že malé částice se v kapalině pohybují rychle a velké částice se pohybují pomaleji. Tento pohyb probíhá neustále, takže pokud vytvoříme dva „obrazy“ vzorku oddělené krátkým časovým intervalem např. 100  $\mu\text{s}$ , lze vidět, o kolik se částice přesunula, a na základě toho vypočítat, jak velká je. Jestliže došlo k minimálnímu pohybu a změně polohy částic, pak budou částice ve vzorku velké. Naopak pokud došlo k velkému pohybu a změně polohy částic, pak jsou částice malé (31).

**Obrázek 6 Rozdíl v rychlosti pohybu malých a velkých částic (31)**



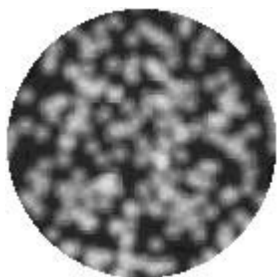
Měření velikosti na principu DLS je založené na tom, že pokud je malá částice osvětlena zdrojem světla, jako je laser, částice rozptyluje světlo v různých směrech. Obr. 7 ukazuje šíření vln světla rozptýleného částicemi. Detektor bude osvětlený rozptýleným světlem a vznikne obraz skvrn znázorněný na Obr. 8. Obraz skvrn se bude skládat z oblastí jasného světla a tmavých oblastí, kde se žádné světlo nedetekuje. Jasně oblasti na obrazu vzniknou tam, kde světlo rozptýlené částicemi dospěje na detektor a konstruktivně interferuje za vytvoření jasné skvrny. Protože jsou částice v neustále pohybu, bude se zdát, že se obraz skvrn také pohybuje. Jak se částice pohybují kolem, světlé a tmavé oblasti přibývají a ubývají na intenzitě nebo řečeno jinak, zdá se, že intenzita světla fluktuuje. Přístroj za použití DLS měří rychlost fluktuace intenzity světla a pak ji používá pro vypočítání velikosti částic (31).

**Obrázek 7 Šíření vln světla rozptýleného částicemi (31)**





*Obrázek 8 Obraz skvrn vzniklý zachycením rozptýleného světla na detektoru (31)*



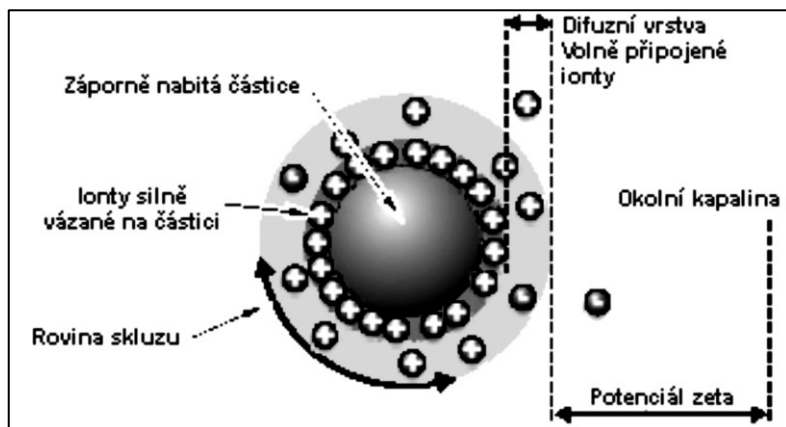
## 4.5 Zeta potenciál částic

Vodné roztoky obvykle obsahují ionty. Ionty mohou být buď záporně nabitě, pak je nazýváme anionty, nebo kladně nabitě kationty. Když je nabitá částice suspendovaná v kapalině, budou k povrchu částice přitahovány ionty opačných nábojů. Tedy záporně nabitý vzorek přitahuje kladné ionty z kapaliny a obráceně kladně nabitý vzorek přitahuje ionty záporné.

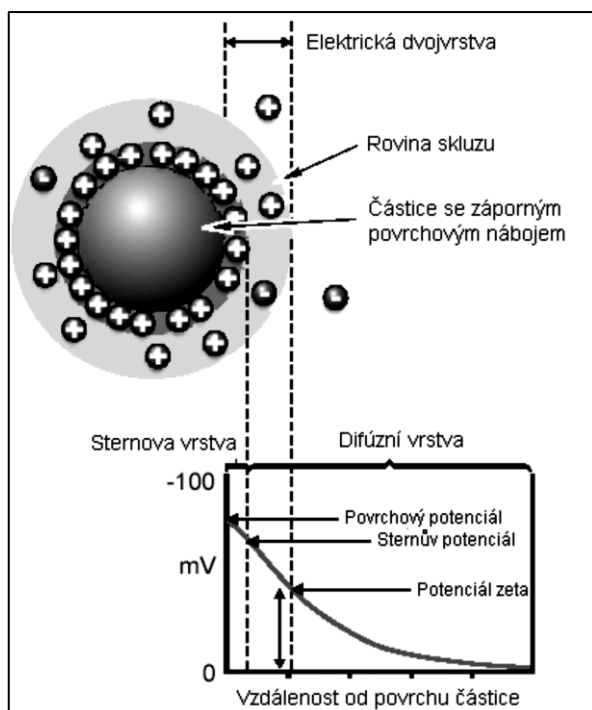
Ionty blízko u povrchu částice se budou silně vázat k částici, zatímco ionty, které jsou dále od částice, se budou vázat volněji. Kolem každé částice existuje elektrická dvojvrstva. Vnitřní vrstva kapaliny obklopující částici, kde jsou ionty silně vázané, je nazývána jako Sternova vrstva. Vnější oblast, kde jsou ionty méně pevně připojené, vytváří tzv. difuzní vrstvu. U difuzní vrstvy existuje pomyslná hranice. Ionty uvnitř této hranice tvoří spolu s částicí stabilní jednotku, a pokud se částice pohybuje v kapalině, ionty uvnitř této hranice se pohybují s ní. Ale ionty za hranicí difuzní vrstvy zůstanou tam, kde jsou, a s částicí se nepohybují. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku neboli rovina skluzu.

Mezi povrchem částice a rozptylující se kapalinou existuje potenciál, který se mění podle vzdálenosti od povrchu částice. Tento potenciál na rovině skluzu se nazývá zeta potenciál (31).

Obrázek 9 Záporně nabitá částice ponořená do kapaliny (31)



Obrázek 10 Hodnoty potenciálu mění se v závislosti na vzdálenosti od povrchu částice (31)



Potenciál zeta se měří s použitím kombinace technik měření, jako je elektroforéza a laserová Dopplerova velocimetrie, někdy nazývaná také jako laserová Dopplerova elektroforéza. Tato metoda měří, jak rychle se částice pohybuje v kapalině, když se aplikuje určité elektrické pole. Pokud známe rychlost částice a aplikované elektrické pole, můžeme s použitím dvou dalších známých konstant vzorku, viskozity a dielektrické konstanty, vypočítat potenciál zeta.

Potenciál zeta vzorku určuje, zda budou mít částice v kapalině tendenci k flokulaci (shlukování), nebo ne. Znalost zeta potenciálu je z tohoto důvodu užitečná v mnoha průmyslových odvětvích, jako je např. keramický průmysl, nebo technologie disperzních soustav, jako jsou emulze či suspenze. U keramiky se požaduje takový zeta potenciál, aby se zajistilo, že keramické částice budou silně zhuštěné a tím bude konečný výrobek vykazovat dostatečnou pevnost. U emulzí a suspenzí slouží zeta potenciál k určení toho, zda zůstane disperze v daném prostředí stabilní. Jestliže všechny částice v soustavě mají velký záporný nebo velký kladný zeta potenciál, pak budou inklinovat k vzájemnému odpuzování a není u nich tendence k flokulaci. Jestliže však částice mají hodnoty zeta potenciálu kolem 0 mV, pak neexistuje žádná síla k tomu, aby zabránila částicím se shlukovat. Dělicí čára mezi stabilní a nestabilní soustavou je zpravidla při +30 mV nebo -30 mV. Částice s potenciálem zeta v absolutních hodnotách vyšších než +30 mV, nebo nižších než -30 mV se považují obecně za stabilní (31).

Zeta potenciál je důležitý nejen z hlediska stability disperze, ale také proto, že ovlivňuje interakci nosičů léčiv a biomolekul s cílovými systémy. Buněčné membrány, DNA a některé proteiny jsou záporně nabitě. Nosič s pozitivním zeta potenciálem má tendenci silněji interagovat právě se systémy, které jsou opačného náboje, tedy záporné. Kladný zeta potenciál nosičů léčiv, jako jsou nanočástice, může vést tedy k jejich větší akumulaci v záporně nabitých cílových buňkách (33).

## **5 Experimentální část**

### **5.1 Použité přístroje**

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

Magnetická míchačka IKA-RT

Reometr Kinexus Pro+, Malvern Instruments

Spektrofluorimetr FS 970, Schoeffel Instrument

Tenziometr Krüss K 100, Krüss GmbH

Váhy Kern PLE, max 420 g, d = 0,001 g, Fisher Scientific

Váhy Kern FKB, max 8100 g, d = 0,05 g, Fisher Scientific

Váhy Kern 572, max 421 g, d = 0,001 g, Fisher Scientific

Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments

### **5.2 Použité chemikálie**

#### **5.2.1 Seznam chemikálií**

Acetonitril (HPLC), Fisher Scientific

Cetrimid (N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid), Merc

Čištěná voda, příprava na FaF UK HK

Dichlormethan, Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich

Fluorescein disodná sůl

Kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové 50:50 (PLGA), syntéza na KFT, FaF UK HK

Terpolymer kyseliny DL-mléčné, glykolové větven na 2 % kyseliny polyakrylové (A2), syntéza na KFT, FaF UK HK

Terpolymer kyseliny DL-mléčné, glykolové větven na 4 % kyseliny polyakrylové (A4), syntéza na KFT, FaF UK HK

Terpolymer kyseliny DL-mléčné, glykolové větven na 3 % tripentaerythritolu (T3), syntéza na KFT, FaF UK HK

### **5.2.1 Charakteristika chemikálií**

Pro přípravu nanočástic byly použity polymery PLGA, A2, A4 a T3. Polymer PLGA je kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové s lineární strukturou. Podrobněji je charakterizován v teoretické části v kapitole 4.2.2. Další tři polymery vznikly modifikací polymeru PLGA pomocí větvicí složky. Jedná se tedy o terpolymery s rozvětvenou strukturou. U polymerů A2 a A4 je větvicí složkou kyselina polyakrylová v koncentraci 2 % nebo 4 %. K větvení dochází díky vzniku esterové vazby mezi hydroxylovými konci řetězce PLGA a karboxylovou skupinou kyseliny polyakrylové. Polymery A2 a A4 se vyznačují tedy tím, že mají volné karboxylové konce řetězců PLGA. U polymeru T3 představuje větvicí složku molekula tripentaerythritolu, která má 8 volných hydroxylových skupin. K větvení dochází tvorbou esterových vazeb mezi hydroxylovými skupinami tripentaerythritolu a karboxylovými konci PLGA. Polymer T3 má tedy volné především hydroxylové konce PLGA. K modifikaci nanočástic byl použit cetrimid neboli N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid. Jedná se o sůl, která je tvořena kvartérním amoniiovým kationtem a aniontem bromu. U cetrimidu se předpokládá interakce kvartérního amoniiového kationtu s volnými karboxylovými skupinami za vzniku kvartérní amoniiové soli.

### 5.3 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství polymeru ve vnitřní fázi

#### Příprava vnější fáze emulze

Na vahách bylo do kádinky naváženo 40,0 g čištěné vody. Kádinka s vodou a míchadlem byla umístěna na magnetickou míchačku.

#### Příprava vnitřní fáze emulze

Vnitřní fázi tvořilo 10,0 g roztoku polymeru v DMSO. Byly použity polymery PLGA, A2, A4 a T3. Od každého polymeru byla připravována řada vzorků s obsahem 9 %, 7 %, 5 %, 3 % a 1 % polymeru v DMSO. Příprava vnitřní fáze byla prováděna ředěním 9% zásobního roztoku pomocí DMSO. Pro přehlednost jsou níže uvedeny Tab. 1–3, které charakterizují přípravu a složení emulze.

*Tabulka 1 Příprava 9% zásobního roztoku polymeru*

Navážovaná látka	Navážka [g]
Polymer	18,0
DMSO	182,0

*Tabulka 2 Příprava vnitřní fáze emulze*

Koncentrace polymeru ve vnitřní fázi [%]	Hmotnost 9% roztoku polymeru [g]	Hmotnost doplněného DMSO [g]
9	10,0	0,0
7	7,8	2,2
5	5,6	4,4
3	3,3	6,7
1	1,1	8,9

*Tabulka 3 Souhrnné složení vnitřní a vnější fáze emulze*

Koncentrace polymeru [%]	Vnitřní fáze		Vnější fáze
	Polymer [g]	DMSO [g]	Voda [g]
9	0,9	9,1	40,0
7	0,7	9,3	40,0
5	0,5	9,5	40,0
3	0,3	9,7	40,0
1	0,1	9,9	40,0

### Příprava nanočástic

Vnitřní fáze byla za stálého míchání rychle přidána do fáze vnější. Míchání bylo prováděno pomocí magnetické míchačky a míchadla, které bylo předem umístěné v kádince s vnější fází. Emulze se takto míchala po dobu minimálně 30 minut. Poté byly odebírány vzorky pro měření velikosti a ZP vzniklých nanočástic.

### **5.4 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnější fáze**

#### Příprava vnitřní fáze emulze

Vnitřní fáze byly připravovány mísením 9% zásobního roztoku polymeru a čistého DMSO. Byly použity polymery PLGA, A2, A4 a T3. Konkrétně se připravovaly 1 a 3% vnitřní fáze. Podrobný postup je uveden v Tab. 2.

#### Příprava vnější fáze emulze

Do kádinky bylo naváženo určené množství 1% zásobního roztoku cetrimidu ve vodě. K tomuto roztoku pak byla doplněna čištěná voda do 40,0 g. Připravovala se řada vzorků, které se lišily množstvím přidaného cetrimidu. Koncentrace cetrimidu

byla v tomto případě vztahována na celkovou hmotnost nanodisperze, tedy na 50,0 g. Pro přehlednost jsou uvedené Tab. 4 a 5.

**Tabulka 4 Příprava 1% zásobního roztoku cetrimidu ve vodě**

Navazovaná látka	Navážka [g]
Cetrimid	10,0
Čištěná voda	990,0

Pro rozpuštění cetrimidu bylo nutné čistou vodu zahřát na 35 °C. Voda byla zahřívána pomocí rychlovarné konvice.

**Tabulka 5 Příprava a složení vnější fáze emulze s cetrimidem**

Koncentrace cetrimidu [%]	Hmotnost cetrimidu [g]	Hmotnost 1% roztoku cetrimidu [g]	Hmotnost doplněné vody [g]
0,010	0,0050	0,5	39,5
0,025	0,0125	1,3	38,7
0,050	0,0250	2,5	37,5
0,100	0,0500	5,0	35,0
0,200	0,1000	10,0	30,0

## Příprava nanočástic

Příprava nanočástic byla realizována vylitím vnitřní fáze do fáze vnější za stálého míchání. Po 30 minutách bylo provedeno měření velikosti a ZP.

## 5.5 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství cetrimidu přidaném do hotové nanodisperze

### Příprava vnější fáze, vnitřní fáze a nanočástic

V tomto případě byly vnější a vnitřní fáze připravovány stejným způsobem jako v kapitole 5.3. Vnější fázi tedy tvořilo 40,0 g vody a vnitřní fázi 10,0 g roztoku polymeru v DMSO. Pro měření byly připravovány vnitřní fáze A2 1%, A2 3%,



PLGA 1% a PLGA 3%. Vnitřní fáze byla přidána za stálého míchání do fáze vnější, a tak došlo k vytvoření nanodisperze.

### Příprava roztoku cetrimidu přidávaného do nanodisperze

K vytvořeným nanočásticím bylo po 30 minutách přidáno 5,0 g roztoku cetrimidu ve vodě. A to takovým způsobem, aby byla **hmotnost přidaného cetrimidu stejná jako v předchozí části**, kde byl cetrimid přidáván do fáze vnější. Přesné navážky a postup jsou v Tab. 6. Po přidání roztoku cetrimidu byla disperze míchána dalších 30 minut. Poté byla měřena velikost a ZP nanočástic.

*Tabulka 6 Příprava a složení roztoku cetrimidu přidávaného do nanodisperze*

Hmotnost přidaného cetrimidu [g]	Hmotnost 1% roztoku cetrimidu [g]	Hmotnost dovážené vody [g]
0,0050	0,5	4,5
0,0125	1,3	3,7
0,0250	2,5	2,5
0,0500	5,0	0,0

## 5.6 Příprava nanočástic pro měření velikosti a ZP v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze

### Příprava vnitřní fáze emulze

Na přípravu vnitřní fáze byl použit 9% zásobní roztok polymeru v DMSO, 1% zásobní roztok cetrimidu v DMSO a čistý DMSO. Bylo pracováno pouze s polymerem T3. Připravovala se vnitřní fáze s 1% a 3% obsahem polymeru. Procenta cetrimidu byla v tomto případě vztažena na **hmotnost polymeru** ve vnitřní fázi. Nejprve bylo naváženo příslušné množství 9% zásobního roztoku polymeru. K tomu byl přidán 1% zásobní roztok cetrimidu v DMSO. Nakonec byl doplněn DMSO do hmotnosti 10,0 g. Postup přípravy je uveden v Tab. 7 a 8.

**Tabulka 7 Příprava 1% zásobního roztoku cetrimidu v DMSO**

Navazovaná látka	Navážka [g]
Cetrimid	2,5
DMSO	247,5

Pro rozpuštění cetrimidu bylo nutné DMSO mírně zahřát v mikrovlnné troubě.

**Tabulka 8 Příprava a složení vnitřní fáze emulze s cetrimidem**

Koncentrace T3 ve vnitřní fázi [%]	Hmotnost T3 [g]	Procenta cetrimidu [%]	Hmotnost cetrimidu [g]	Navážka 1% roztoku cetrimidu [g]
1	0,1	5	0,005	0,5
		10	0,010	1,0
		20	0,020	2,0
3	0,3	5	0,015	1,5
		10	0,030	3,0
		20	0,060	6,0

### Příprava vnější fáze emulze a nanočástic

Vnější fázi tvořilo 40,0 g navážené čištěné vody. Příprava probíhala jako obvykle vylištěním vnitřní fáze do vnější za stálého míchání. Po 30 minutách byla měřena velikost a ZP nanočástic.

## 5.7 Měření velikosti a zeta potenciálu nanočástic

Měření velikosti nanočástic a jejich zeta potenciálu bylo prováděno pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Přístroj byl zapnut 30 minut před začátkem měření, aby došlo ke kalibraci přístroje. Teplota byla kalibrována vždy na 25 °C. Pro měření velikosti byly používány jednoúčelové kyvety z polymetylmakrylátu, které se naplnily vzorkem do stanovené výšky. Pro měření zeta potenciálu byla používána složená kapilární cela DTS1070. Do složené kapilární cely byl vzorek plněn pomocí injekční stříkačky. Cela musela být plněna pomalu a takovým způsobem, aby nedošlo k vytvoření bublinek. Následně po naplnění se cela uzavřela pomocí

dvou zátek. Naplněné cely či kyvety byly vloženy do Zetasizeru a byl spuštěn příslušný program pro měření velikosti nebo ZP nanočástic. Cely musela být po každém měření řádně propláchnuta. Proplachování se provádělo vodou a poté ještě následujícím měřeným vzorkem pomocí stříkačky.

Při měření velikosti nanočástic byly zaznamenávány hodnoty Z-Ave a PDI. Hodnota Z-Ave udává střední průměr částic ve vzorku. PDI je index polydisperzity, který nabývá hodnot 0–1. Čím blíže je hodnota PDI k 0, tím více jsou částice ve vzorku velikostně stejné. A naopak čím více je PDI k 1, tím více je soustava polydisperzní. V rámci měření velikosti bylo také zjišťováno, kolik skupin nanočástic s obdobnou velikostí se ve vzorku nachází. Každá taková skupina nanočástic tvoří v grafu vlastní pík. Ideálně by měl být ve vzorku vždy jen jeden pík. Pík je charakterizován svou výškou (Pk Mean Intensity) a plochou (Pk Area Intensity). Výška píku je udána v nanometrech a představuje průměr nanočástic, který je ve vzorku nejvíce zastoupen. Plocha píku je v procentech a znázorňuje, kolik procent z celkové plochy všech píků konkrétní pík zaujímá. Hodnoty zeta potenciálu u vzorků byly měřeny vždy třikrát. V tabulkách je pak uvedena průměrná hodnota zeta potenciálů ze tří měření. U vybraných vzorků bylo provedeno měření velikosti a ZP znovu následující den. Sledovalo se tím, zda jsou tyto parametry nanočástic stabilní, nebo jestli dochází v čase k nějakým změnám. U velikosti by mohlo dojít ke změně na základě bobtnání, rozpadu či shlukování částic. Zeta potenciál byl znovu měřen především tam, kde se jej podařilo změnit z hodnot záporných na kladné.

## **5.8 Příprava roztoků polymerů pro měření povrchového napětí a viskozity**

Příprava vzorků probíhala ředěním 9% zásobního roztoku polymeru v DMSO. Navážky pro vytvoření tohoto zásobního roztoku jsou uvedeny v Tab. 1. Byly připravovány vzorky s 1%, 3%, 5%, 7% a 9% koncentrací polymeru. K měření se používaly tyto polymery: A2, A4, PLGA a T3. Pro stanovení viskozity byly připravovány roztoky o hmotnosti 10,0 g a pro měření povrchového napětí o hmotnosti 60,0 g. Přesné navážky pro vytvoření těchto roztoků jsou uvedené v Tab. 2 a 9.

*Tabulka 9 Příprava roztoků polymerů pro měření povrchového napětí*

Koncentrace polymeru [%]	Hmotnost 9% zásobního roztoku polymeru [g]	Hmotnost doplněného DMSO [g]
1	6,7	53,3
3	20,0	40,0
5	33,3	26,7
7	46,7	13,3
9	60,0	0,0

## 5.9 Měření povrchového napětí roztoků polymerů

Měření povrchového napětí roztoků polymerů v DMSO bylo provedeno pomocí tenziometru Krüss K 100. Přístroj byl zapnut hodinu před začátkem měření, aby došlo ke kalibraci přístroje. V programu byla nastavena hustota tekuté fáze, která je v případě dimethylsulfoxidu  $1,1 \text{ g/cm}^3$ . Povrchové napětí bylo stanoveno pomocí platinového kroužku. Tato metoda spočívá v tom, že je měřena síla potřebná k vytažení kroužku, který je zanořený v hladině kapaliny. Platinový kroužek byl před začátkem měření třikrát vyžihán v plamenu plynového kahanu. Po vychladnutí se upevnil do držáku v přístroji, který je umístěn nad skleněnou miskou určenou pro vzorek. Skleněná miska byla naplněna měřeným vzorkem. Prostor s kroužkem a vzorkem se uzavřel průhlednými dvířky. Poté byl kroužek pomocí regulačního zařízení umístěn těsně nad hladinu měřené kapaliny tak, aby byl vidět na hladině jeho odraz. Na počítači se spustilo měření povrchového napětí vzorku. Přístroj si sám upravil výšku kroužku tak, aby byly zajištěné optimální podmínky pro měření. Po každém měření byl kroužek vytažen z kapaliny. Skleněná miska se vypláchla acetonem, čištěnou vodou a následně byla sušena pomocí proudu vzduchu pod tlakem. Kroužek byl pokaždé třikrát vyžihán v plamenu. Byl sledován vztah mezi povrchovým napětím a koncentrací polymeru v roztoku DMSO.

## 5.10 Měření viskozity roztoků polymerů

Měření viskozity roztoků polymerů v DMSO bylo provedeno pomocí rotačního reometru Kinexus Pro+. Nejprve bylo zapotřebí zkontrolovat přívod stlačeného vzduchu. To bylo zřejmé z toho, že indikátor stlačeného vzduchu svítil zeleně. Dále byly odstraněny ochranné kryty vzduchového ložiska a kryty dolní geometrie. Poté byl reometr zapnut a nechal se kalibrovat 5 minut. Následně byl na počítači spuštěn software rSpace for Kinexus. Pak byla nasazena horní geometrie. Geometrie pro měření vzorku byly v uspořádání kužel-deska. Dolní geometrie byla tvořena deskou. Horní geometrii představoval kužel CP 1/60, to znamená, že mezi kuželem a deskou byl úhel  $1^\circ$ . Číslo 60 pak představuje průměr horní geometrie v milimetrech. Mezi horní a dolní geometrií byla nastavena nulová mezera. Vzorky byly nanášeny pomocí plastové kopistky na střed dolní geometrie v takovém objemu, aby byl prostor mezi dolní a horní geometrií zcela vyplněn měřeným vzorkem. Zároveň však nesměl vzorek přesahovat kraje geometrií, a pokud přesahoval, byl přebytek odstraněn pomocí plastové kopistky. Vhodnost množství naneseného vzorku byla zjištěna ve chvíli, kdy se pomocí softwaru sjelo s horní geometrií dolů. Pokud byl vzorek nanesen správně a ve vhodném objemu, přiložil se na geometrie se vzorkem ochranný kryt a bylo spuštěno měření. Byla zvolena sekvence Toolkit V001-1 Table of Shear Rates / Equilibrium Flow Curve pro získání tokových a viskozitních křivek. Vzorky byly měřeny při teplotě  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a byly proměřovány v rozmezí rychlostního spádu  $0,1\text{--}100\text{ s}^{-1}$ . Po ukončení měření byl odstraněn kryt a horní geometrie vyjela nahoru. Geometrie byly následně očištěny od vzorku pomocí buničiny. Výsledky byly analyzovány Newtonovým modelem a modelem mocninného vztahu. Sledován byl vztah mezi viskozitou a koncentrací polymeru v DMSO.

## 5.11 Enkapsulační účinnost nanočástic

Byla vytvořena kalibrační křivka pro měření enkapsulační účinnosti nanočástic pomocí fluoresceinu určená pro další experimentální práci na pracovišti školitele. V diplomové práci je uvedena naměřená kalibrační křivka fluoresceinu a navržený postup pro tvorbu a měření vzorků nanočástic s fluoresceinem. Uvedené informace a kalibrační křivku pak mohou využít kolegové, kteří se budou enkapsulační účinností nanočástic dále zabývat.

Pro tvorbu kalibrační křivky a měření vzorků s fluoresceinem byl zvolen přístroj Spektrofluorimetr FS 970. Princip stanovení koncentrace fluoreskující látky spočívá v tom, že je látka excitována pomocí monochromatického světla o určité vlnové délce na vyšší energetickou hladinu. Při návratu do původního energetického stavu látka emituje záření. Emitované záření je pak snímáno pomocí detektoru. Intenzita emitovaného záření je závislá na koncentraci látky, která je schopna excitace a emise.

### 5.11.1 Kalibrační křivka pro měření enkapsulační účinnosti nanočástic s fluoresceinem

Nejprve bylo zapotřebí stanovit maximální excitační a emisní vlnovou délku fluoresceinu. Je nutné si uvědomit, že hodnoty excitačních ( $\lambda_{ex}$ ) a emisních ( $\lambda_{em}$ ) vlnových délek konkrétní látky závisí mimo jiné na tom, v jakém prostředí se látka nachází. Znamená to, že i použité rozpouštědlo má vliv na výslednou hodnotu vlnových délek. Analýza emisního a excitačního spektra musí být proto prováděna vždy v rozpouštědle, ve kterém má být následně vzorek měřený. Čisté rozpouštědlo nám během měření slouží jako tzv. blank neboli slepý vzorek, u něhož je koncentrace měřené látky nulová. Proti blanku jsou pak měřeny vzorky obsahující fluoreskující látku.

Jako rozpouštědlo pro měření fluoresceinu byl nejprve zvolen acetonitril. Maximální excitační a emisní vlnová délka se stanovila pomocí analýzy emisních a excitačních spekter. V programu spektrofluorimetru byl nastaven rozsah vlnových délek, ve kterých má být vzorek proměřen. Zvolený rozsah byl odvozen od hodnot

$\lambda_{\text{ex}}$  a  $\lambda_{\text{em}}$  fluoresceinu nalezených v literatuře, které byly sice pro jiná rozpouštědla, ale posloužily jako orientační body. Rozsah vlnových délek pro měření spekter byl ještě několikrát upravován tak, aby mělo výsledné spektrum výrazné maximum. Hodnota vlnové délky v maximu pak byla zvolena jako maximální excitační či emisní vlnová délka.

Po zjištění  $\lambda_{\text{ex}}$  a  $\lambda_{\text{em}}$  fluoresceinu v acetonitrilu následovalo stanovení kalibrační křivky pomocí programu ve spektrofluorimetru, který je přímo pro tvorbu kalibračních křivek určen. Do programu se zadaly hodnoty  $\lambda_{\text{ex}}$  a  $\lambda_{\text{em}}$  a blank. Následně byly měřeny vzorky fluoresceinu v acetonitrilu od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Měřeným vzorkem byla naplněna kyveta do stanovené výšky. Kyveta se vložila do měřicí komory spektrofluorimetru. Měřicí komora musela být dobře uzavřena kovovým víkem, aby nedocházelo ke znehodnocování výsledků světlem v místnosti. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Program vypočítal průměr výsledků ze tří měření. Na základě průměrných hodnot intenzity emitovaného záření neboli tzv. signálu vytvořil program kalibrační křivku. U dané křivky byla vždy uvedena i hodnota spolehlivosti  $R^2$ .

Koncentrace fluoresceinu ve vzorcích pro měření kalibrační křivky byly odvozené od koncentrace fluoresceinu, která byla zvolena pro tvorbu nanodisperze. Nejvyšší koncentrace fluoresceinu shodná s koncentrací v nanodisperzi byla 27  $\mu\text{g/ml}$ . Další měřené koncentrace byly: 13,5  $\mu\text{g/ml}$ , 6,75  $\mu\text{g/ml}$  a 3,375  $\mu\text{g/ml}$ . Příprava vzorků probíhala ředěním zásobního roztoku fluoresceinu v acetonitrilu o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 10 mg neboli 10 000  $\mu\text{g}$  fluoresceinu v 10 ml acetonitrilu. Měřeného vzorku bylo připraveno 5 ml. Postup přípravy vzorků o daných koncentracích fluoresceinu je uveden v Tab. 10. Objemy kapalin byly odebírány pomocí mikropipet.

*Tabulka 10 Příprava vzorků fluoresceinu v acetonitrilu pro stanovení kalibrační křivky*

<b>Koncentrace [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>Objem zásobního roztoku [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>Objem čistého acetonitrilu [<math>\mu\text{l}</math>]</b>
27,000	135	4865
13,500	68	4932
6,750	34	4966
3,375	17	4983

Pomocí takto připravených vzorků byla stanovena kalibrační křivka. Kalibrační křivka však nebyla lineární a hodnota spolehlivosti se neblížila jedné. Bylo zapotřebí nalézt příčinu. S řešením tohoto problému nám pomáhal Ing. Martin Drastík, Ph.D., z Katedry biofyziky a fyzikální chemie. Nejprve pan doktor Drastík zjišťoval, zda není chyba v přípravě vzorků. Vzorky o dané koncentraci připravil znovu a provedl stanovení kalibrační křivky. Ta ale opět nebyla lineární a měla nedostačující hodnotu spolehlivosti. Další možnou příčinou mohlo být nevhodné rozpouštědlo pro měření fluorescence. Pan doktor Drastík proto zkusil použít místo acetonitrilu 0,1 M roztok NaOH. Nejprve musela být opět stanovena maximální excitační a emisní vlnová délka pro fluorescein v prostředí 0,1 M NaOH. Následně připravil vzorky fluoresceinu o různé koncentraci v prostředí 0,1 M NaOH a poté stanovil kalibrační křivku. Vzorky připravoval tak, že ředil roztoky fluoresceinu v acetonitrilu zhruba stokrát pomocí 0,1 M NaOH. Tento postup byl zvolen z toho důvodu, že vysušené nanočástice s fluoresceinem se pro měření koncentrace enkapsulovaného fluoresceinu v acetonitrilu rozpouští. V acetonitrilu fluorescein ale nelze se spolehlivostí měřit. Proto musí být nanočástice s fluoresceinem v acetonitrilu zředěné 0,1 M NaOH. Koncentrace fluoresceinu ve vzorcích pro stanovení kalibrační křivky v prostředí 0,1 M NaOH byly z důvodu zhruba stonásobného zředění mnohem nižší než při stanovení fluoresceinu v acetonitrilu. Signál byl ale i tak dost silný. Výsledná kalibrační křivka fluoresceinu v 0,1 M NaOH byla lineární a hodnota spolehlivosti se blížila k jedné. Tímto způsobem připravená kalibrační křivka byla zvolena jako vhodná pro měření enkapsulační účinnosti nanočástic s fluoresceinem.



### **5.11.2 Návrh postupu přípravy nanočástic s fluoresceinem a postupu měření enkapsulační účinnosti**

Vnitřní fáze by měla celkový objem 20 ml. Na její přípravu by byl použit roztok polymeru v DMSO, jehož objem by se odvíjel od toho, kolika procentní by měla vnitřní fáze být. Dále by byl použit roztok fluoresceinu v DMSO a čistý DMSO. Vnější fázi emulze by představovalo 80 ml vody. Jak již bylo uvedeno výše, koncentrace fluoresceinu v nanodisperzi by měla být 27  $\mu\text{g/ml}$ . Z toho je zřejmé, že na 100 ml emulze, která vznikne vylitím vnitřní fáze do fáze vnější, je nutno použít 2700  $\mu\text{g}$  fluoresceinu. Navrhují tedy vytvořit si zásobní roztok fluoresceinu v DMSO o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Pak by se na přípravu vnitřní fáze použilo 2,7 ml tohoto zásobního roztoku.

Je nutné si uvědomit, že v tomto případě je žádoucí odměřovat kapaliny pro přípravu emulze a následující úpravu vzorku pomocí objemu a ne pomocí hmotnosti, jako tomu bylo např. při přípravě nanočástic pro měření jejich ZP a velikosti. Jednak z toho důvodu, že koncentraci zde stanovujeme v  $\mu\text{g/ml}$ , jednak protože pro úpravu vzorku se používají kapaliny, které mají různou hustotu. To znamená, že např. 1 g vody nemá zdaleka stejný objem jako 1 g acetonitrilu. Výsledky by byly při použití hmotnosti kapalin nepřesné z důvodu nelineárních změn objemu směsí rozpouštědel.

Vytvořené nanočástice s fluoresceinem by se separovaly na základě odstředivé síly pomocí ultracentrifugy. Na dně zkumavek by došlo k usazení a slepení nanočástic s enkapsulovaným fluoresceinem a zbylý roztok s fluoresceinem, který nebyl enkapsulován, by byl pomocí mikropipet odstraněn.

Nanočástice usazené na dně zkumavek by se poté rozpustily v dichlormethanu a následně by se vzorek sušil několik dní ve vakuové sušárně. Po dokonalém vysušení by vzorek teoreticky obsahoval pouze polymer a enkapsulovaný fluorescein.

Vysušený vzorek by byl následně rozpuštěn přidáním 20 ml acetonitrilu.

Roztok fluoresceinu v acetonitrilu by byl zředěn stokrát pomocí 0,1 M NaOH. Například pro přípravu vzorku pro měření na spektrofluorimetru o objemu 5000  $\mu\text{l}$  by bylo požito 50  $\mu\text{l}$  roztoku fluoresceinu v acetonitrilu a 4950  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH.

Takto připravený vzorek by se měřil na spektrofluorimetru. Nejprve by se načetla již hotová kalibrační křivka. Spolu s kalibrační křivkou se načtou vždy i maximální excitační a emisní vlnové délky. Následně by byla stanovena koncentrace fluoresceinu ve vzorku. Vzorek by byl proměřován vždy třikrát a z výsledků by se vypočítala průměrná koncentrace.

Koncentrace, která se takto stanoví na spektrofluorimetru, není výsledná koncentrace enkapsulovaného fluoresceinu. A to z toho důvodu, že během úpravy vzorku byl vzorek pětkrát koncentrovaný ve chvíli, kdy byly vysušené nanočástice s fluoresceinem rozpuštěny ve 20 ml acetonitrilu oproti původním 100 ml, které tvořily nanodisperzi. A naopak byl vzorek stokrát zředěný v momentě, když jsme ředili roztok fluoresceinu v acetonitrilu pomocí 0,1 M NaOH. Z toho důvodu je nutné koncentraci, kterou naměří spektrofluorimetr, vynásobit dvacetí. Tím získáme výslednou koncentraci enkapsulovaného fluoresceinu. Pomocí této koncentrace pak můžeme stanovit enkapsulační účinnost nanočástic v procentech.

#### **Výpočet enkapsulační účinnosti nanočástic s fluoresceinem:**

27  $\mu\text{g/ml}$ .....100 %

Y  $\mu\text{g/ml}$ .....X %

$$X = \frac{Y \cdot 100}{27}$$

27  $\mu\text{g/ml}$  = původní koncentrace fluoresceinu v nanodisperzi

Y = výsledná koncentrace enkapsulovaného fluoresceinu [ $\mu\text{g/ml}$ ]

X = enkapsulační účinnost nanočástic [%]

## 6 Výsledky

### 6.1 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství polymeru ve vnitřní fázi

*Tabulka 11 Složení vzorků č. 1–20 s obsahem polymerů PLGA, A2, A4 a T3 v koncentraci 1 až 9 %*

Číslo vzorku	Polymer	Koncentrace polymeru ve vnitřní fázi [%]
1	PLGA	1
2		3
3		5
4		7
5		9
6	A2	1
7		3
8		5
9		7
10		9
11	A4	1
12		3
13		5
14		7
15		9
16	T3	1
17		3
18		5
19		7
20		9

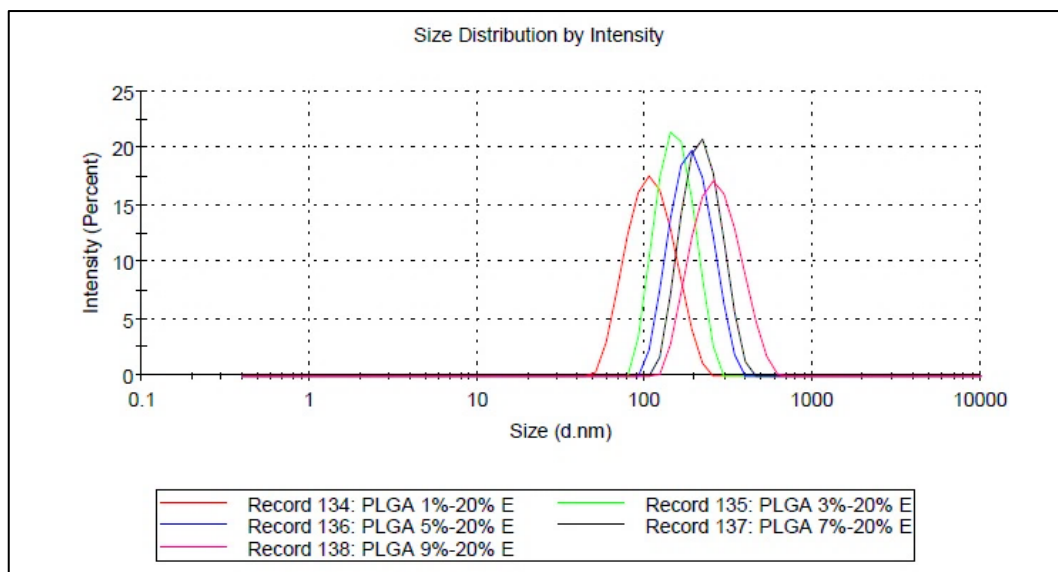
*Tabulka 12 Velikost nanočástic vzorků č. 1–20 v závislosti na množství polymeru ve vnitřní fázi*

Číslo vzorku	Polymer	Z-Ave [nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1	PLGA	103,1	0,079	112,7	100
2		146,4	0,041	154,8	100
3		181,0	0,067	194,4	100
4		209,2	0,063	223,4	100
5		251,6	0,091	277,1	100
6	A2	71,39	0,080	78,35	100
7		104,4	0,078	115,0	100
8		126,5	0,065	136,7	100
9		151,9	0,057	162,3	100
10		209,8	0,093	234,2	100
11	A4	59,92	0,131	70,02	100
12		85,61	0,099	95,68	100
13		116,5	0,093	129,7	100
14		128,8	0,073	140,3	100
15		204,8	0,079	223,4	100
16	T3	124,3	0,064	134,5	100
17		175,2	0,056	187,6	100
18		221,7	0,066	240,0	100
19		241,4	0,078	263,5	100
20		266,6	0,026	279,0	100
1 (2.den)	PLGA	102,9	0,070	112,1	100
5 (2.den)		242,9	0,043	254,9	100
6 (2.den)	A2	71,78	0,071	78,33	100
10 (2.den)		210,7	0,064	227,0	100

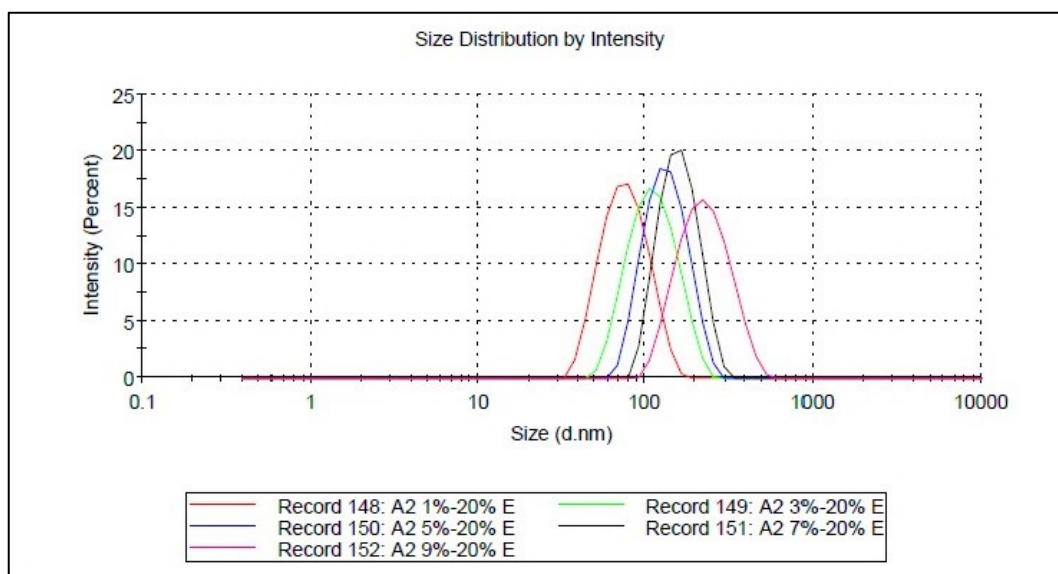
*Tabulka 13 Zeta potenciál nanočástic vzorků s 1, 3 a 9% obsahem polymeru ve vnitřní fázi*

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Polymer</b>	<b>ZP [mV]</b>
<b>1</b>	<b>PLGA</b>	-17,7
<b>2</b>		-15,6
<b>5</b>		-14,7
<b>6</b>	<b>A2</b>	-19,3
<b>7</b>		-18,5
<b>10</b>		-19,2
<b>11</b>	<b>A4</b>	-20,3
<b>12</b>		-19,1
<b>15</b>		-19,8
<b>16</b>	<b>T3</b>	-15,6
<b>17</b>		-12,9
<b>20</b>		-8,9

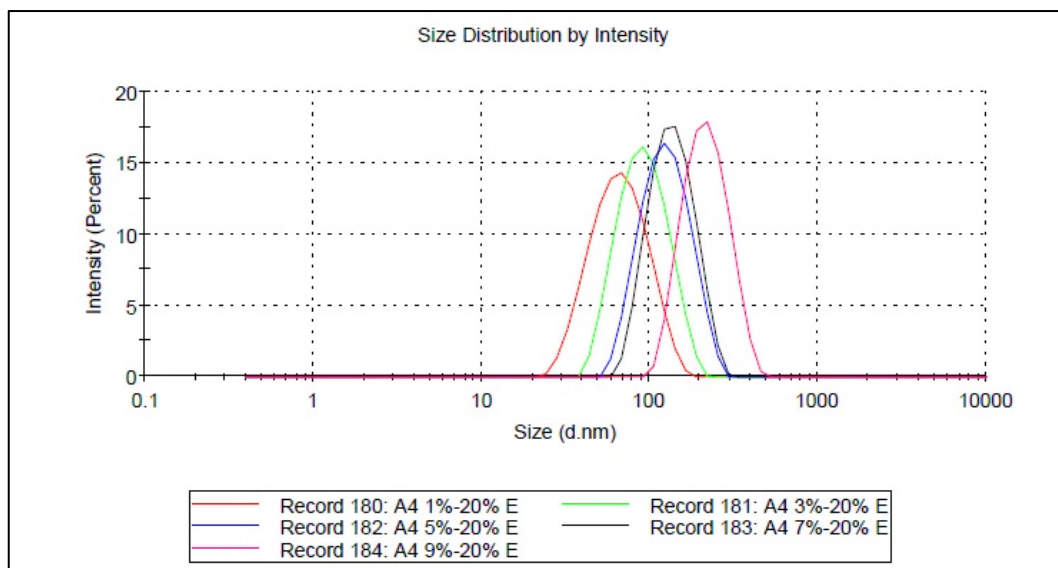
**Obrázek 11** Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 1–5 obsahujících polymer PLGA



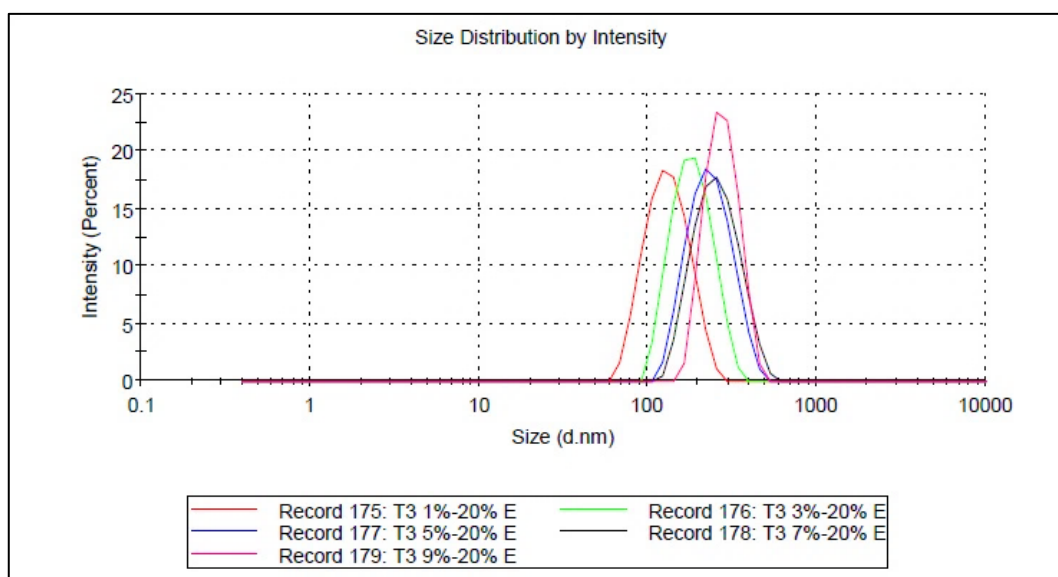
**Obrázek 12** Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 6–10 obsahujících polymer A2



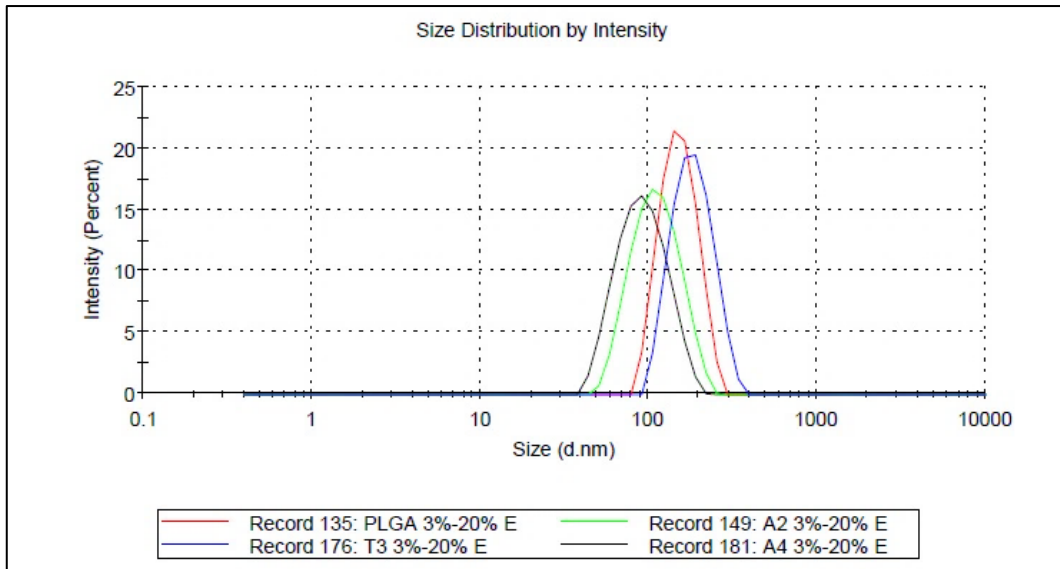
**Obrázek 13** Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 11–15 obsahujících polymer A4



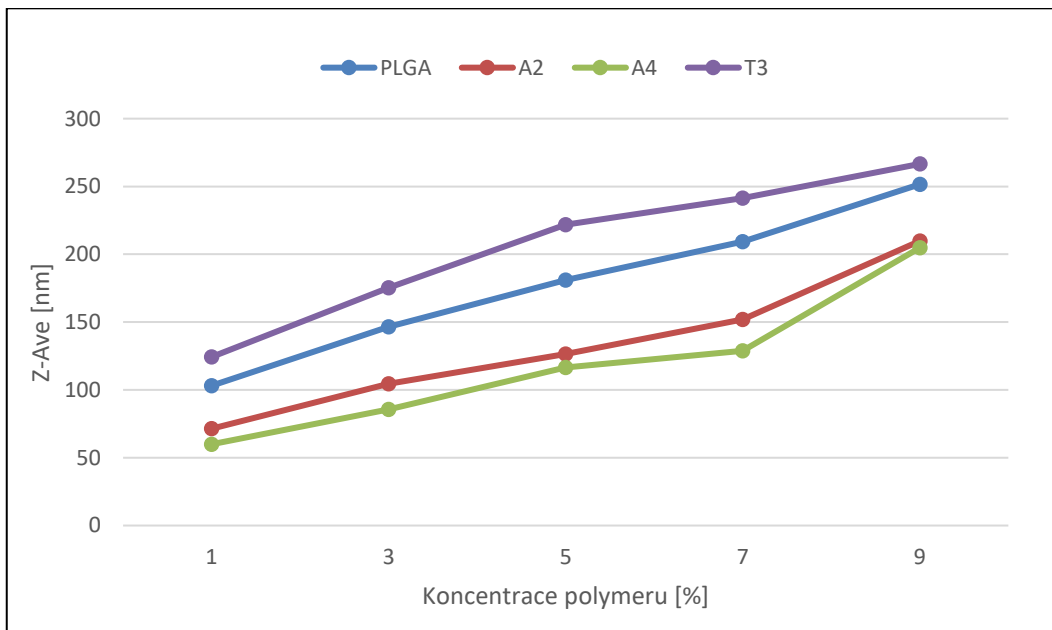
**Obrázek 14** Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 16–20 obsahujících polymer T3



**Obrázek 15** Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 2 (PLGA), 7 (A2), 12 (A4), 17 (T3) obsahujících 3 % polymeru



**Obrázek 16** Vliv typu a koncentrace polymeru na velikost nanočástic





## 6.2 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnější fáze

Tabulka 14 Složení vzorků č. 21–44, u kterých byl cetrimid přidán do vnější fáze<sup>1</sup>

Číslo vzorku	Polymer	Koncentrace polymeru ve vnitřní fázi [%]	Koncentrace cetrimidu v nanodisperzi [%]	Hmotnost cetrimidu [g]
21	A2	1	0,010	0,0050
22			0,025	0,0125
23			0,050	0,0250
24			0,100	0,0500
25			0,200	0,1000
26		3	0,010	0,0050
27			0,025	0,0125
28			0,050	0,0250
29			0,100	0,0500
30			0,200	0,1000
31	A4	1	0,010	0,0050
32			0,025	0,0125
33			0,050	0,0250
34			0,100	0,0500
35			0,200	0,1000
36		3	0,010	0,0050
37			0,025	0,0125
38			0,050	0,0250
39			0,100	0,0500
40			0,200	0,1000
41	PLGA	1	0,100	0,0500
42		3	0,100	0,0500
43	T3	1	0,100	0,0500
44		3	0,100	0,0500

<sup>1</sup> Poznámka k Tab. 14: vzorky, jejichž čísla jsou znázorněna červeně, nebyly měřeny z důvodu vzniku sraženiny během přípravy nanočástic.

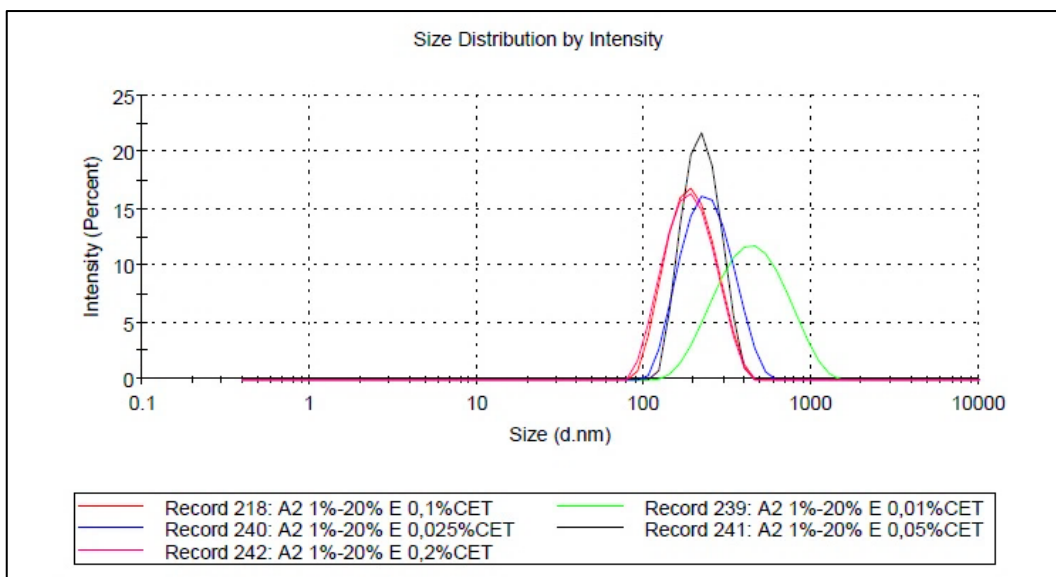
*Tabulka 15 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnější fáze*

Číslo vzorku	Polymer	Z-Ave [nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
21	A2	393,4	0,163	477,9	100
22		224,1	0,093	248,9	100
23		213,1	0,045	255,6	100
24		181,7	0,088	200,3	100
25		176,9	0,086	195,9	100
29		243,9	0,076	262,3	100
30		224,9	0,081	246,9	100
32	A4	253,2	0,069	276,4	100
33		206,0	0,073	225,7	100
34		195,8	0,072	212,8	100
35		165,1	0,129	179,3	100
39		251,1	0,045	267,6	100
40		221,1	0,076	241,5	100
41	PLGA	191,4	0,076	209,1	100
42		244,3	0,109	266,0	100
43	T3	149,8	0,081	163,8	100
44		193,4	0,088	213,2	100
23 (2. den)	A2	202,0	0,073	220,7	100
25 (2. den)		172,3	0,065	188,0	100
33 (2. den)	A4	205,0	0,072	221,9	100
35 (2. den)		165,9	0,096	182,1	100

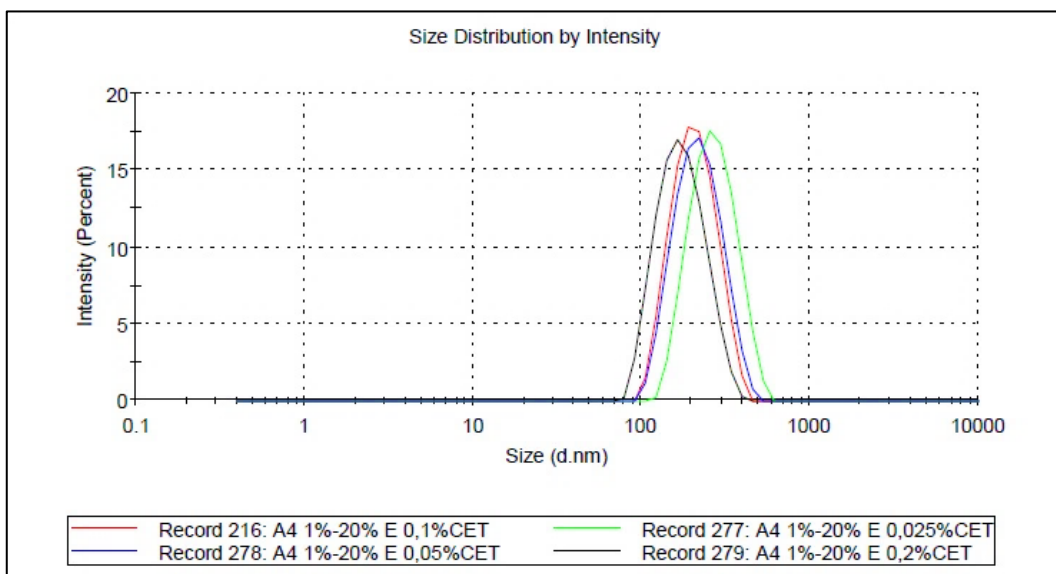
*Tabulka 16 Zeta potenciál nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnější fáze*

Číslo vzorku	Polymer	ZP [mV]
21	A2	13,8
22		26,3
23		30,2
24		39,2
25		38,1
29		46,3
30		42,7
32		A4
33	33,6	
34	37,6	
35	36,0	
39	43,5	
40	45,7	
41	PLGA	
42		41,2
43	T3	35,3
44		36,6
23 (2. den)	A2	35,1
25 (2. den)		39,7
33 (2. den)	A4	31,2
35 (2. den)		39,3

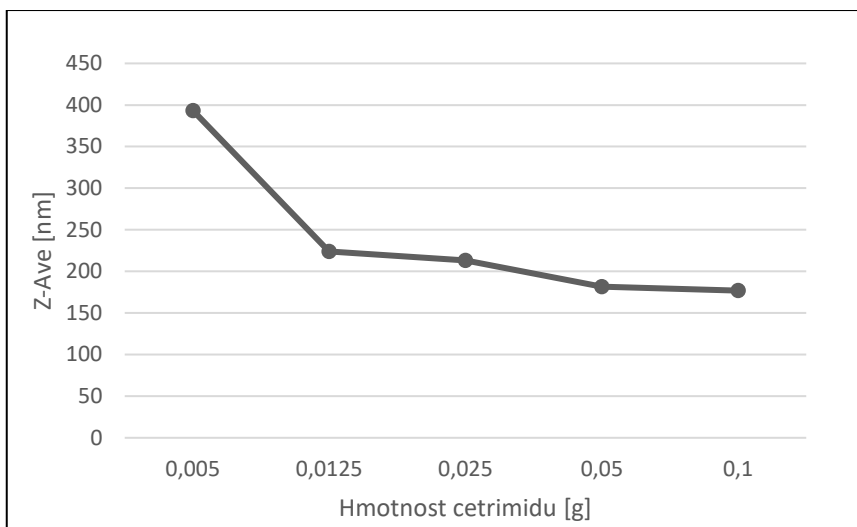
**Obrázek 17** Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 21–25, které obsahují polymer A2 1% a odlišné množství cetrimidu



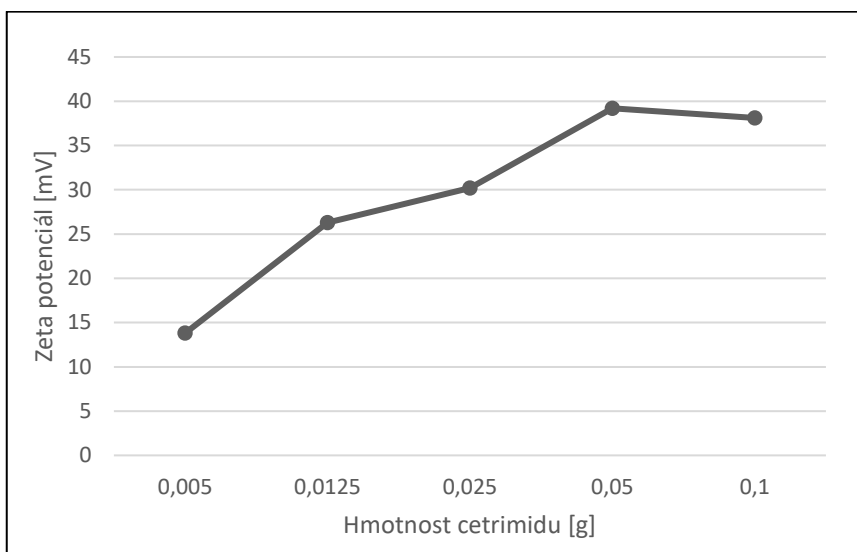
**Obrázek 18** Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 32–35, které obsahují polymer A4 1% a odlišné množství cetrimidu



**Obrázek 19** Ukázkový graf polymeru A2 1% znázorňující tendenci změny velikosti nanočástic v závislosti na množství cetrimidu



**Obrázek 20** Ukázkový graf polymeru A2 1% znázorňující tendenci změny ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu



### 6.3 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do hotové nanodisperze

Tabulka 17 Složení vzorků č. 45–60, u kterých byl cetrimid přidán do hotové nanodisperze<sup>2</sup>

Číslo vzorku	Polymeru	Koncentrace polymeru ve vnitřní fázi [%]	Hmotnost přidaného cetrimidu [g]
45	A2	1	0,0050
46			0,0125
47			0,0250
48			0,0500
49		3	0,0050
50			0,0125
51			0,0250
52			0,0500
53	PLGA	1	0,0050
54			0,0125
55			0,0250
56			0,0500
57		3	0,0050
58			0,0125
59			0,0250
60			0,0500

<sup>2</sup> Poznámka k Tab. 17: vzorky, jejichž čísla jsou znázorněna červeně, nebyly měřené z důvodu vzniku sraženiny během přípravy nanočástic

*Tabulka 18 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do nanodisperze*

Číslo vzorku	Polymer	Z-Ave [nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
47	A2	164,6	0,209	215,6	100
48		155,1	0,241	197,4	100
54	PLGA	166,1	0,208	199,9	100
55		150,3	0,195	176,5	100
56		120,0	0,135	139,7	100

*Tabulka 19 Zeta potenciál nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do nanodisperze*

Číslo vzorku	Polymer	ZP [mV]
47	A2	36,4
48		34,0
54	PLGA	27,2
55		29,4
56		35,5

## 6.4 Velikost a ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze

V této úloze experimentální části diplomové práce se pracovalo pouze s polymerem T3. Vzorky č. 61–66 obsahují všechny polymer T3.

*Tabulka 20 Složení vzorků č. 61–66, u kterých byl cetrimid přidán do vnitřní fáze*

Číslo vzorku	Koncentrace polymeru ve vnitřní fázi [%]	Procenta cetrimidu k hmotnosti polymeru [%]	Hmotnost cetrimidu [g]
61	1	5	0,005
62		10	0,010
63		20	0,020
64	3	5	0,015
65		10	0,030
66		20	0,060

*Tabulka 21 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze*

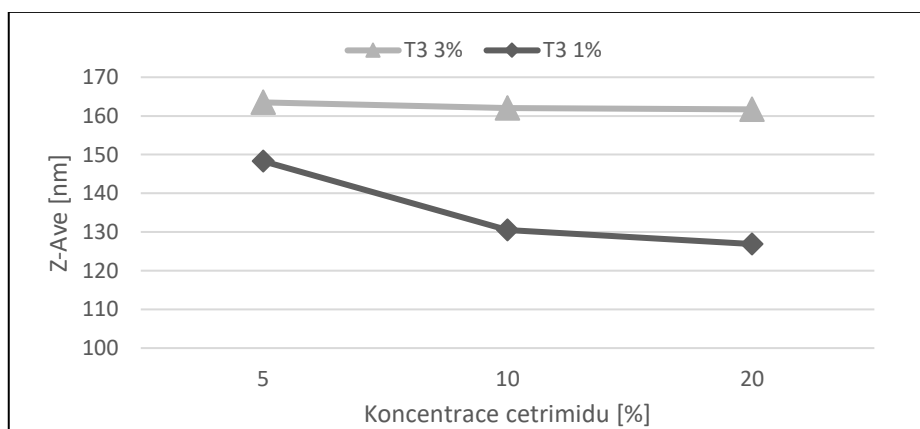
Číslo vzorku	Z-Ave [nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
61	148,3	0,089	163,6	100
62	130,5	0,103	147,0	100
63	126,9	0,091	140,3	100
64	163,5	0,119	187,4	100
65	162,0	0,072	177,2	100
66	161,7	0,108	183,8	100
61 (2. den)	152,7	0,055	164,4	100
63 (2. den)	128,5	0,098	145,1	100
64 (2. den)	170,3	0,122	196,4	100
66 (2. den)	166,2	0,077	182,3	100



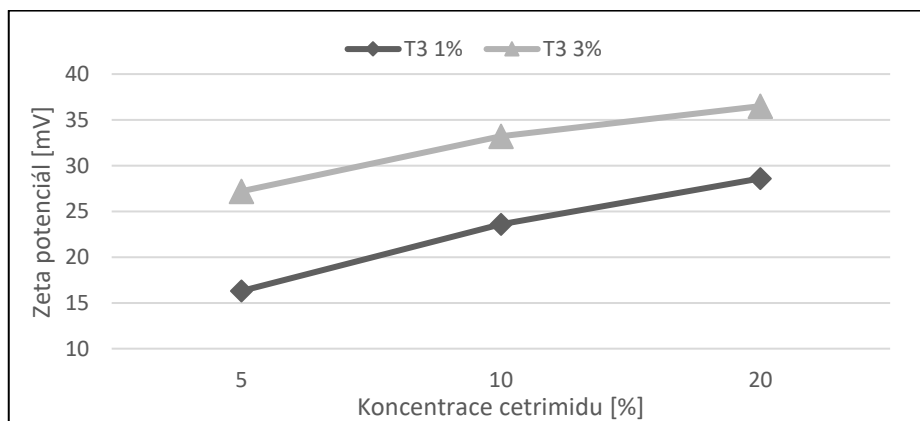
**Tabulka 22 Zeta potenciál nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze**

Číslo vzorku	ZP [mV]
61	16,3
62	23,6
63	28,6
64	27,2
65	33,2
66	36,5
61 (2. den)	16,3
63 (2. den)	29,1
64 (2. den)	27,4
66 (2. den)	35,8

**Obrázek 21 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze**



**Obrázek 22 Zeta potenciál v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze**



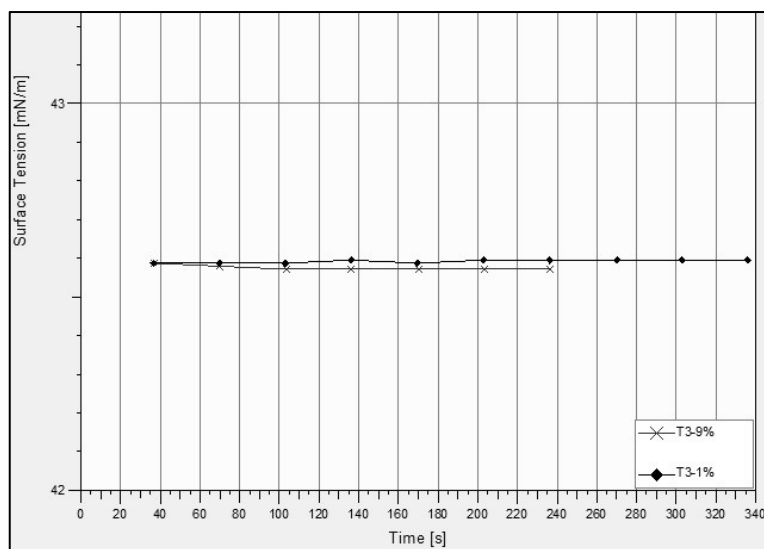
## 6.5 Povrchové napětí roztoků polymerů

Povrchové napětí DMSO: 42,17 mN/m

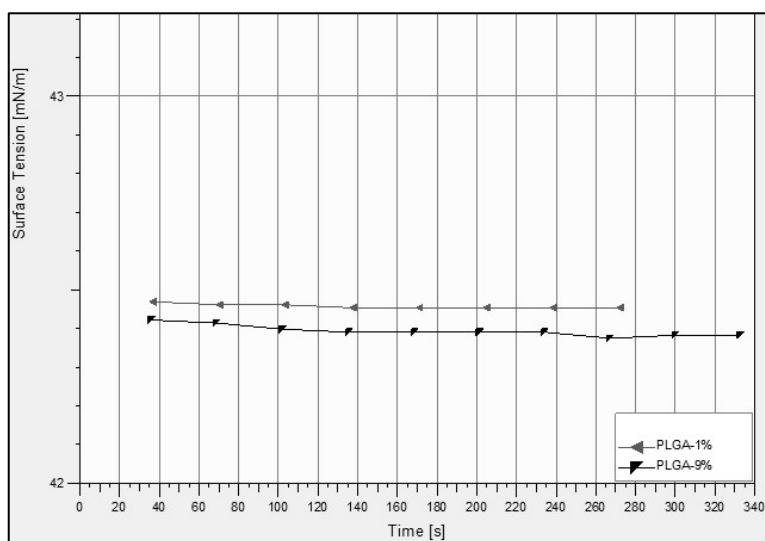
*Tabulka 23 Povrchové napětí roztoků polymerů v DMSO*

Polymer	Koncentrace polymeru [%]	Povrchové napětí [mN/m]
T3	9	42,24
	3	42,68
	1	42,59
PLGA	9	42,38
	3	42,56
	1	42,45
A4	9	42,30
	3	42,54
	1	42,50
A2	9	42,36
	3	42,50
	1	42,49

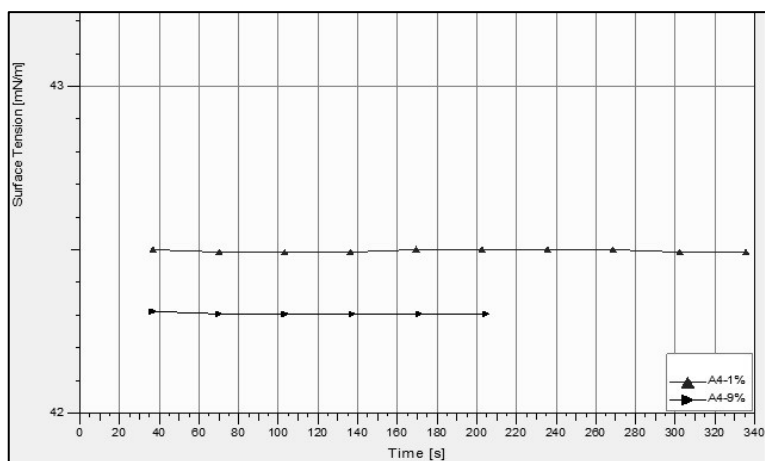
*Obrázek 23 Povrchové napětí roztoků polymeru T3 1 a 9%*



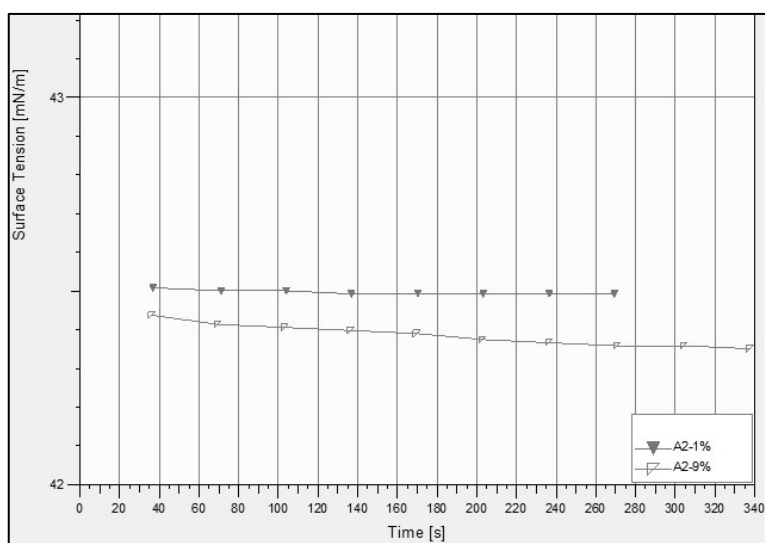
**Obrázek 24** Povrchové napětí roztoků polymeru PLGA 1 a 9%



**Obrázek 25** Povrchové napětí roztoků polymeru A4 1 a 9%



**Obrázek 26** Povrchové napětí roztoků polymeru A2 1 a 9%



## 6.6 Viskozita roztoků polymerů

Viskozita DMSO: 1,103 mPa.s       $R^2 = 0,9988$

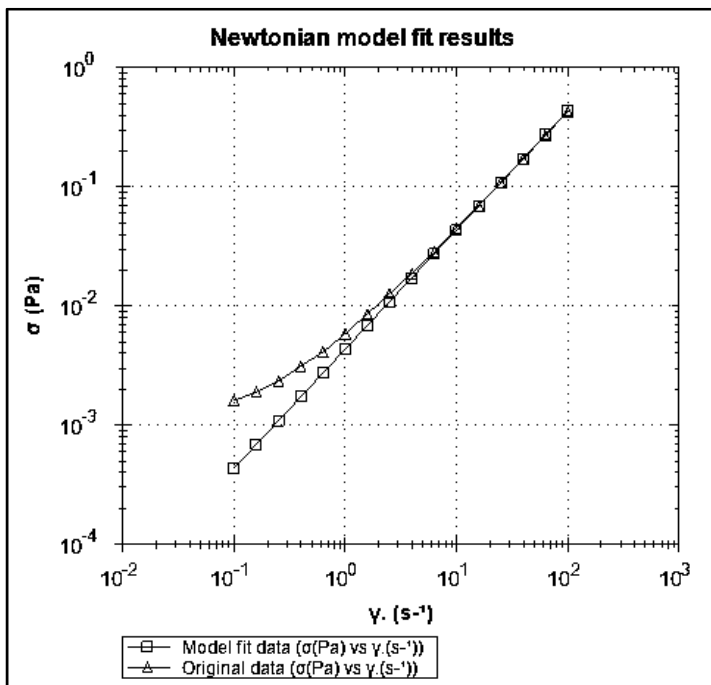
*Tabulka 24 Viskozita roztoků polymerů v DMSO*

<b>Polymer</b>	<b>Koncentrace polymeru [%]</b>	<b>Viskozita [mPa.s]</b>	<b>Koeficient korelace Newtonova vztahu</b>
<b>A2</b>	1	1,273	0,9987
	3	1,640	0,9995
	5	2,345	0,9996
	7	3,396	0,9997
	9	4,535	0,9999
<b>A4</b>	1	1,383	0,9995
	3	1,764	0,9994
	5	2,665	1,000
	7	3,129	0,9992
	9	4,012	1,000
<b>T3</b>	1	1,187	0,9986
	3	1,472	0,9990
	5	1,590	0,9985
	7	1,865	0,9976
	9	4,299	0,9950
<b>PLGA</b>	1	1,021	0,9973
	3	1,331	0,9993
	5	1,931	0,9996
	7	2,078	0,9997
	9	2,793	0,9942

**Obrázek 27** Příklad vyhodnocení tokové křivky dle Newtonova modelu (Newtonian model fit)

Viskozita: 4,340 mPa.s

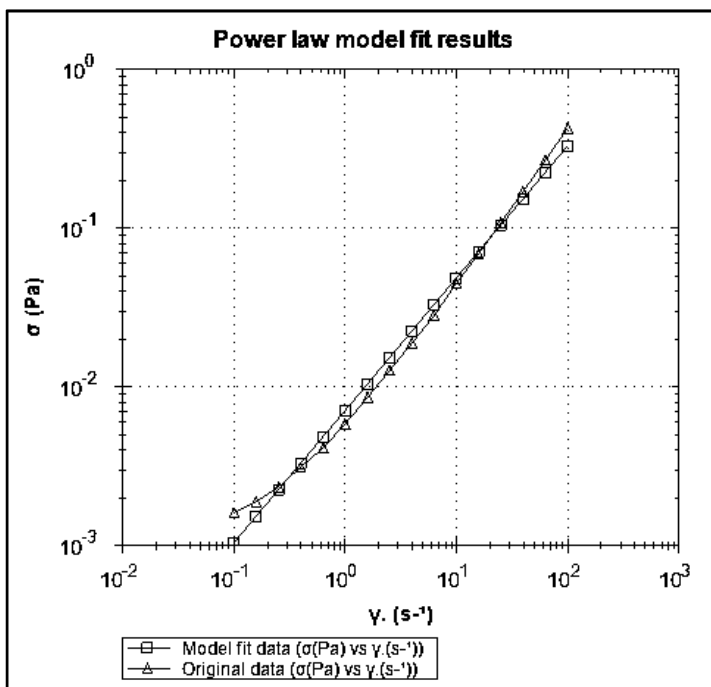
R2 = 1,000



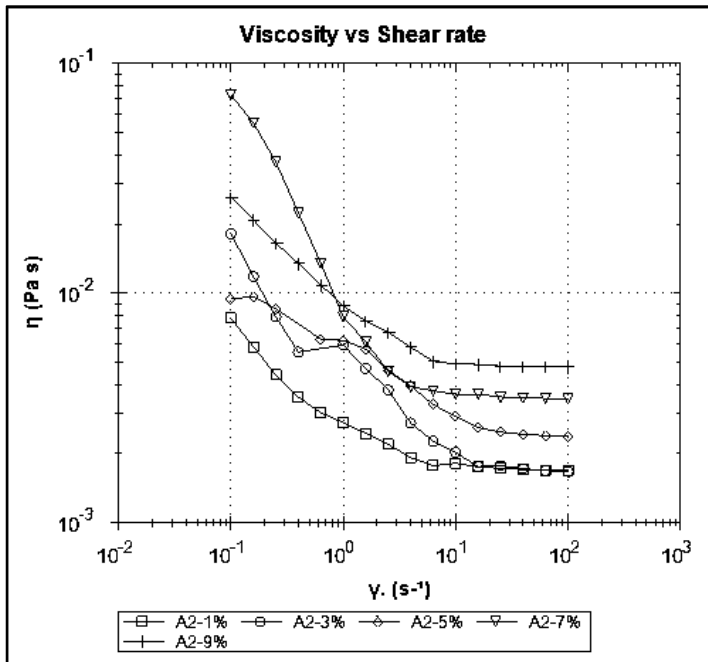
**Obrázek 28** Příklad vyhodnocení tokové křivky dle mocinného vztahu (Power law model fit)

K = 7,108 mPa.s; n = 0,8343; R2 = 0,9946

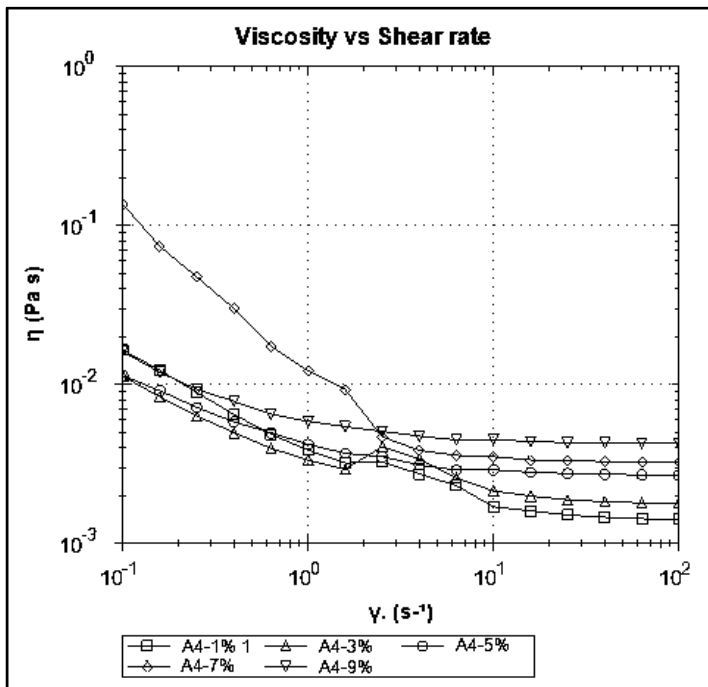
K – koeficient konzistence; n – index tokového chování



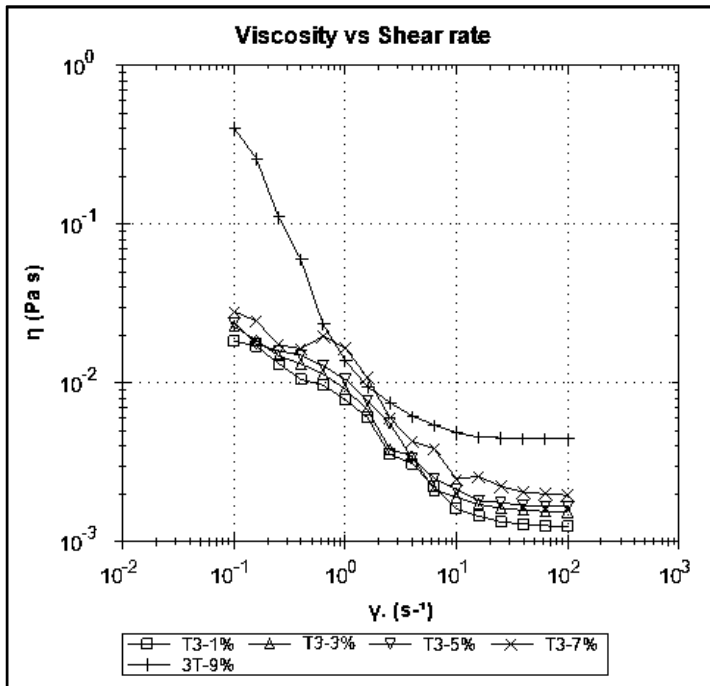
Obrázek 29 Viskozitní křivky roztoků polymeru A2 v DMSO



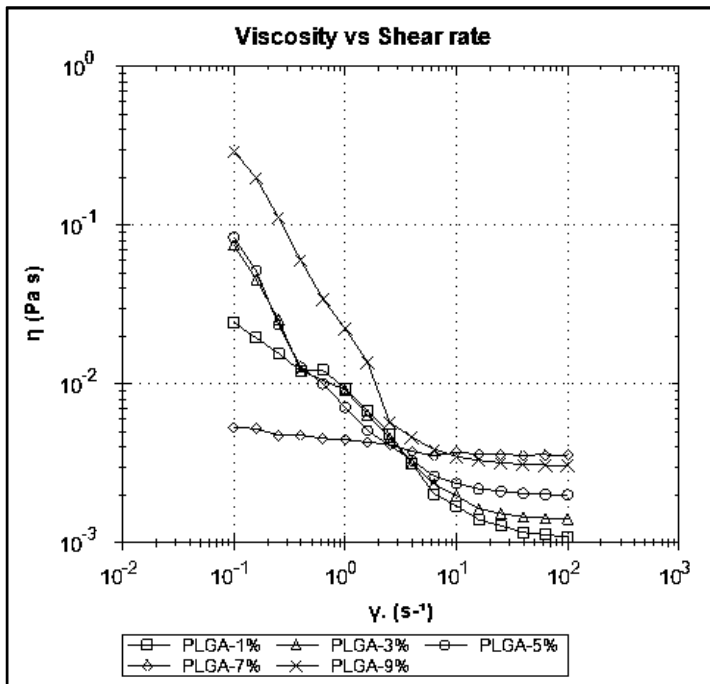
Obrázek 30 Viskozitní křivky roztoků polymeru A4 v DMSO



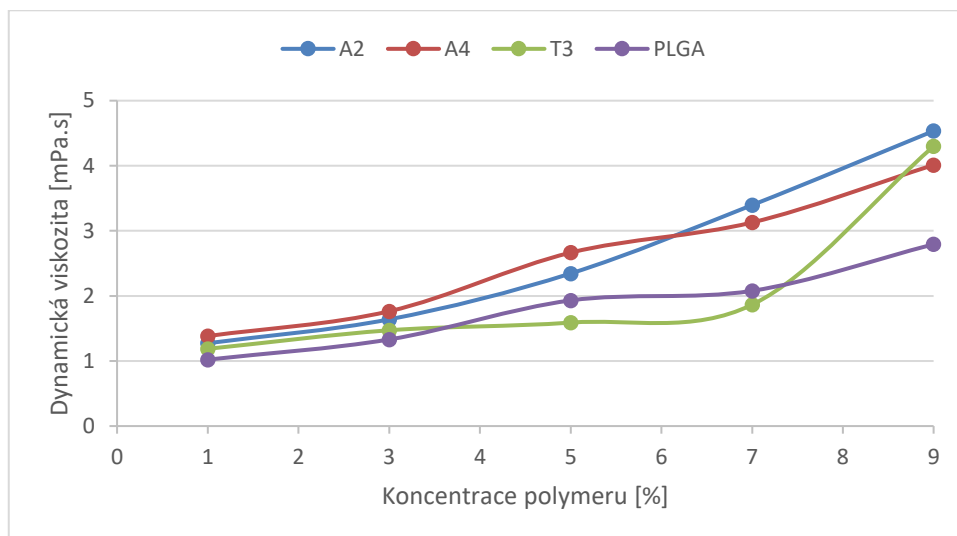
Obrázek 31 Viskozitní křivky roztoků polymeru T3 v DMSO



Obrázek 32 Viskozitní křivky roztoků polymeru PLGA v DMSO



**Obrázek 33** Vliv typu a koncentrace polymeru na viskozitu





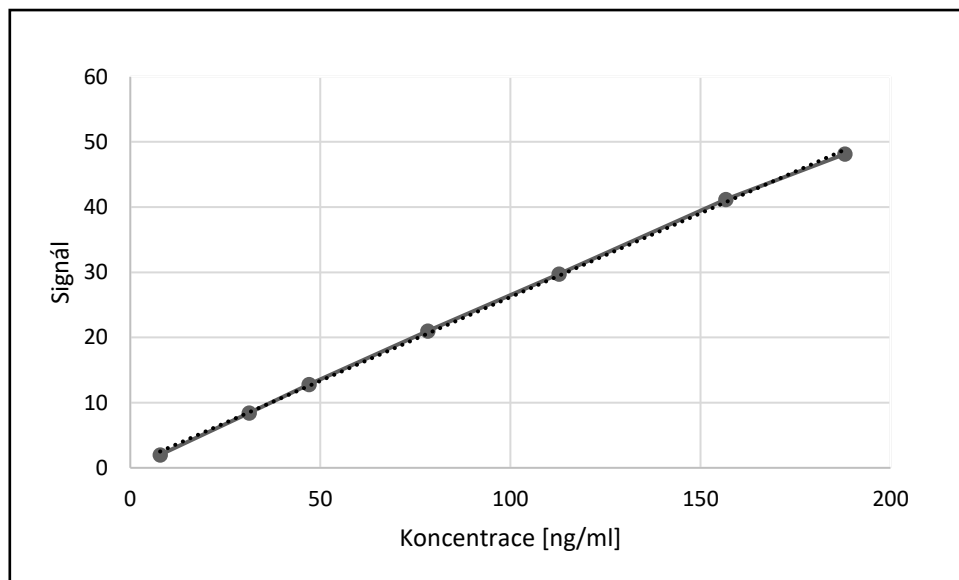
## 6.7 Kalibrační křivka fluoresceinu pro měření enkapsulační účinnosti nanočástic

Tabulka 25 Koncentrace fluoresceinu a hodnoty naměřených signálů použitých pro vytvoření kalibrační křivky

Koncentrace [ng/ml]	Signál
7,83	1,994
31,3	8,44
47,0	12,8
78,3	20,99
112,8	29,74
156,7	41,17
188,0	48,14

Obrázek 34 Kalibrační křivka fluoresceinu v 0,1 M NaOH

$$R^2 = 0,9997$$



## **7 Diskuze**

### **7.1 K tématu diplomové práce**

Zadáno bylo téma, které souvisí s přípravou a hodnocením medikovaných nanočástic použitelných při jejich dalším uplatnění v rámci řešení biologické problematiky na jiném pracovišti farmaceutické fakulty. Cílem bylo vypracovat několik paralelních metod potenciálně vhodných pro minimalizaci rozdělování aktivní látky z nanočásticových systémů vznikajících ve vodném prostředí. Sledovanými parametry byla velikost nanočástic, distribuce jejich velikosti a jejich zeta potenciál. Byly vybrány čtyři nosiče odlišné z hlediska konstituce jejich molekuly. Nosiče byly požity v širokém rozmezí koncentrace od 1 % do 9 %. Jednalo se o PLGA, dále PLGA větvený na tripentaerythritolu a dva nosiče PLGA větvené v různé míře na kyselině polyakrylové. Pro omezení úniku potenciální aktivní látky z nanočástic byl použit cetrimid, který byl na základě permanentního kladného náboje potenciálně vhodný k ovlivnění enkapsulační účinnosti především u anionických látek, jednak interakcí s nimi a také interakcí s nosiči. Hlavním účelem předložené studie bylo prokázat možnosti realizace přípravy nanočásticových systémů difúzní metodou založenou na dispergaci vnitřní fáze v podobě dimethylsufoxidových roztoků nosičů intenzívními turbulentními toky ve vodném prostředí. Podmínky při přípravě se lišily přítomností cetrimidu v různých koncentracích rozpuštěného ve vnější fázi systému před dispergací nebo po dispergaci. Alternativně byly připraveny a testovány vzorky s cetrimidem inkorporovaným ve vnitřní fázi. Pro srovnání s účinkem cetrimidu byly připraveny nanočástice bez cetrimidu. Výstupem byla v případě realizovatelných postupů velikostní charakterizace výsledných nanočástic a hodnota jejich zeta potenciálu.

Měřena byla také viskozita roztoků polymerů o různé koncentraci a jejich povrchové napětí. Mimo zadané téma byla vytvořena a v této práci prezentována kalibrační křivka pro roztoky fluoresceinu. Tato křivka najde uplatnění v další experimentální práci na pracovišti školitele týkající se enkapsulační účinnosti nanočástic.

## 7.2 Nanočástice připravené bez tenzidu

V Tab. 11 a 12 jsou charakteristiky vzorků a jejich velikostní parametry. Jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými nosiči. U lineárního PLGA se výrazně projevily vliv stoupající koncentrace nosičů na velikost nanočástic při nízké polydisperzitě. Po jednom dni uchovávání disperze v lednici se velikost nanočástic připravených ze vzorků s nejnižší koncentrací nezměnila, s nejvyšší koncentrací se zmenšila. Příčinou může být nedokončené rozdělování rozpouštědla. Ještě větší částice byly připraveny z více větveného molekulárního nosiče označeného jako T3. Charakteristika polydisperzity velikosti byla také nízká.

Podstatně menší částice byly připraveny z nosičů větvených na kyselině polyakrylové, zvláště u více hydrofilního produktu s vyšším počtem větvící složky, a tedy s vyšší koncentrací koncových karboxylů. Nejmenší nanočástice měly střední průměr 60 nm, největší ze série připravený z 9% koncentrace polymeru měly charakteristiku průměru 200 nm, tedy velmi příznivou pro zamýšlené účely využití. Nanočástice z takto větvených polymerů měly po dobu jednoho dne stabilní velikost i polydisperzitu.

Na Obr. 11 až 14 jsou autentické záznamy distribuce velikosti částic z jednotlivých nosičů. Rozpětí průměru částic jako velikostního parametru je u nosičů PLGA a T3 prakticky stejné. Zahrnuje částice od 50 nm do 600 nm. V nižší velikostní kategorii jsou nanočástice větvené na kyselině polyakrylové. Z méně větveného nosiče A2 mají velikost od 35 do 550 nm, z více větveného A4 mají hydrodynamický průměr od 15 do 400 nm. Na Obr. 16 je souhrnný graf porovnávající jednotlivé polymery.

Hodnoty zeta potenciálu jsou uvedeny v Tab. 13. Částice z PLGA měly relativně stabilní hodnoty charakteristiky, jejich mobilita byla ovlivněna velikostí. Výraznější vliv velikosti nanočástic na jejich zeta potenciál byl prokázán u větveného nosiče T3. U tohoto nosiče není vyloučena nižší koncentrace karboxylových skupin z frakce lineárních molekul způsobená menší mobilitou molekul při vzniku nanodisperze difúzí dimethylsulfoxidu.

### 7.3 Nanočástice připravené v roztocích tenzidu

Roztoky různých polymerů v dimethylsulfoxidu v koncentraci 1 % a 3 % byly dispergovány ve vodné fázi. V této vnější fázi byl rozpuštěn cetrimid v koncentracích od 0,01 % do 0,2 %. Za důležitý poznatek je možno pokládat tvorbu sraženiny v případě kombinace nejméně koncentrovaných roztoků cetrimidu a vyšší 3% (v šesti případech) a v jednom případě nižší 1% koncentrace polymeru. Vysvětlení tohoto paradoxu v konfrontaci s bezproblémovou přípravou nanočástic v této fázi experimentování nemáme.

V Tab. 15 je přehled parametrů velikosti částic. Celkově je možno zhodnotit jednoznačný vliv cetrimidu na menší částice při nízkých hodnotách polydisperzity. V případě obou polymerních nosičů větvených na kyselině polyakrylové byly nejmenší částice získány v případě nižší koncentrace polymerů a v oblasti vyšších koncentrací cetrimidu (Obr. 19). Tuto skutečnost pokládáme za obvyklou. Po jednodenním uchovávání se velikost nanočástic nezměnila. Nejmenší nanočástice byly v případě nosiče T3. Vysvětlením může být nejslabší interakce tohoto nosiče s nízkou koncentrací karboxylových skupin s cetrimidem. Vliv zvyšující se koncentrace na velikost nanočástic je na Obr. 17 pro polymer A2 a méně výrazný vliv na polymer A4 na Obr. 18. Tento jev je možno vysvětlit vyšší koncentrací koncových karboxylových skupin u nosiče A4.

Postupný růst hodnot zeta potenciálu s růstem koncentrace cetrimidu až do jeho 0,1% koncentrace je jasným důkazem postupné inverze náboje povrchu nanočástic ze záporného do kladného (Tab. 16). Po zvýšení koncentrace cetrimidu z 0,1 % na 0,2 % nebyl zaznamenán žádný efekt (Obr. 20). V případě nejvyšších koncentrací cetrimidu 0,2 % u disperzí připravených z 3% polymeru se také neprojevil efekt zvyšující se koncentrace cetrimidu na hodnotu ZP. Obdobný jev byl prokázán také u polymeru A4 s vyšší koncentrací koncových karboxylů.

Také nanočástice z PLGA a T3 nejevily tendenci ke zvyšování zeta potenciálu po zvýšení koncentrace cetrimidu z 0,1 % na 0,2 %. Po jednodenním uchovávání čtyř vybraných vzorků bylo podle očekávání u tří zjištěno mírné zvýšení zeta potenciálu.

## **7.4 Nanočástice připravené bez tenzidu dekorované cetrimidem**

Termín dekorování znamená následnou úpravu již vzniklých nanočástic obvykle adsorpcí další látky. V Tab. 18 jsou výsledky snahy modifikovat tímto způsobem velikost nanočástic. Z Tab. 17 je patrné, že postup byl realizovatelný pouze v případě částic připravených z 1% roztoků polymerů a pouze při vyšších koncentracích cetrimidu. Jednalo se tedy o menší částice s hodnotou průměru jako charakteristiky velikosti 120 až 166 nm.

V Tab. 19 jsou hodnoty zeta potenciálu, které v případě nosiče A2 prokazují nasycení povrchu s vysokou hustotou karboxylů. U nosiče PLGA nebyl zvrát zeta potenciálu z negativních do pozitivních hodnot tak výrazný. Proto byla funkční i nižší koncentrace cetrimidu a také zvyšování jeho koncentrace vedlo k postupnému sycení povrchu.

## **7.5 Nanočástice připravené inkorporací tenzidu do vnitřní fáze**

Inkorporace tenzidu do vnitřní fáze vede ke kompozitním strukturám, může také při neúplné enkapsulaci modifikovat vnější fázi disperzní soustavy. Pro experimentální práci zaměřenou tímto směrem byl vybrán polymer T3, který se vyznačoval vyšší molekulovou hmotností a nižší koncentrací koncových karboxylových skupin. V Tab. 20 a 21 jsou příslušná data složení vzorků a výsledů měření velikosti.

Se zvyšováním koncentrace cetrimidu došlo především u nanočástic připravených z 1% roztoku polymeru k jejich zmenšování. U částic připravených z 3% roztoků byla tato tendence málo výrazná (Obr. 21). Po jednodenním uchovávání bylo prokázáno mírné zvětšení nanočástic jako výsledek jejich nevýrazného bobtnání.

V Tab. 22 je zeta potenciál nanočástic. Při zvýšení teoretické koncentrace cetrimidu z 5 % na 10 % se hodnota charakteristiky ZP zvýšila u obou typů vzorků

připravených z 1% i 3% roztoku (Obr. 22). Po dalším zvýšení koncentrace tenzidu na 20 % bylo zvýšení zeta potenciálu podstatně menší.

## 7.6 K povrchovému napětí roztoků polymerů

Povrchové napětí bylo měřeno u roztoků polymerů PLGA, A2, A4 a PLGA v DMSO na tenziometru Krüss K 100. Koncentrace polymerů v roztoku byla 1 %, 3 % a 9 %. Hodnoty povrchového napětí jsou uvedeny v Tab. 23. Bylo prokázáno, že v daném souboru vzorků nedochází ke změnám v hodnotě povrchového napětí (Obr. 23–25). Tento parametr se tedy nepodílí na změnách charakteristik nanočástic.

## 7.8 K viskozitě roztoků polymerů

Měřena byla viskozita roztoků polymerů A2, A3, T3 a PLGA v DMSO na rotačním reometru Kinexus Pro<sup>+</sup>. Koncentrace polymerů v roztoku byla 1 %, 3 %, 5 %, 7 % a 9 %. Hodnoty viskozity uvádí Tab. č. 24. Byla provedena korelace tokových křivek podle Newtonova modelu (Obr. 27) a podle mocninného modelu (Obr. 28). Z průběhu viskozitních křivek (Obr. 29–32) vyplývá, že při nízkých hodnotách posuvného napětí ( $0,1-10 \text{ s}^{-1}$ ) viskozita roztoků klesá, od rychlostního spádu  $10 \text{ s}^{-1}$  již k poklesu nedochází. Korelace viskozitních křivek je vyhovující jak dle mocninného vztahu platného pro pseudoplastický tok, tak dle Newtonova vztahu pro ideálně viskózní tok, což dokládají vysoké hodnoty korelačních koeficientů. Toto vyhodnocení je v oblasti nízkých hodnot viskozity, které byly u roztoků polymerů zjištěny, obvyklé. Z polohy a průběhu viskozitních křivek při hodnotách rychlostního spádu vyšších než  $10 \text{ s}^{-1}$  je patrné, že viskozita roztoků je při vyšším namáhání konstantní a roste s koncentrací polymeru v roztoku. Vliv typu a koncentrace polyesteru na viskozitu ukazuje Obr. 33. Při koncentraci polymeru 1 % je viskozita roztoků srovnatelná s DMSO a vodou, při 3 % se viskozita mírně zvýšila, ale u jednotlivých polymerů přibližně stejná. Při koncentraci 5 % se ukáží rozdíly mezi jednotlivými polymery. Koncentrace 7 % a 9 % znamená u všech testovaných polymerů prudké zvýšení viskozity, což může mít vliv na velikost nanočástic.

## **8 Závěr**

- A) Cetrimid je tenzid, který je účinný při modifikaci povrchového náboje nanočástic z polyesterů, jeho aktivita z hlediska ovlivnění velikosti nanočástic není výrazná
- B) Cetrimid je použitelný v experimentech zaměřených na zvyšování účinnosti enkapsulace aktivních látek metodou dekorování povrchů a metodou přípravy kompozitních struktur
- C) Difúzní metoda přípravy nanočástic z polyesterů alifatických hydroxykyselin rozpuštěných v dimethylsulfoxidu je velmi vhodná i pro vodné soustavy bez tenzidu
- D) Pro modifikaci povrchu nanočástic inverzí jejich povrchového náboje v roztocích cetrimidu je nutno použít nadlimitní koncentraci tohoto tenzidu, která vede k rychlé inverzi náboje ze záporných hodnot do hodnot kladných
- E) Z hlediska dosažení vyššího disperzního stupně je vhodný hydrofilizovaný nosič s konstitucí větvených molekul s převažujícím podílem hydroxylových skupin
- F) Metoda dekorování nanočástic je použitelná u polymerů s nižším zeta potenciálem a za použití vyšších koncentrací cetrimidu
- G) Do struktury nanočástic je možno úspěšně inkorporovat až 20 % cetrimidu za vzniku kompozitů

## **9 Seznam tabulek**

Tabulka 1 Příprava 9% zásobního roztoku polymeru.....	30
Tabulka 2 Příprava vnitřní fáze emulze .....	30
Tabulka 3 Souhrnné složení vnitřní a vnější fáze emulze .....	31
Tabulka 4 Příprava 1% zásobního roztoku cetrimidu ve vodě .....	32
Tabulka 5 Příprava a složení vnější fáze emulze s cetrimidem .....	32
Tabulka 6 Příprava a složení roztoku cetrimidu přidávaného do nanodisperze .....	33
Tabulka 7 Příprava 1% zásobního roztoku cetrimidu v DMSO .....	34
Tabulka 8 Příprava a složení vnitřní fáze emulze s cetrimidem .....	34
Tabulka 9 Příprava roztoků polymerů pro měření povrchového napětí .....	36
Tabulka 10 Příprava vzorků fluoresceinu v acetonitrilu pro stanovení kalibrační křivky .....	40
Tabulka 11 Složení vzorků č. 1–20 s obsahem polymerů PLGA, A2, A4 a T3 v koncentraci 1 až 9 % .....	43
Tabulka 12 Velikost nanočástic vzorků č. 1–20 v závislosti na množství polymeru ve vnitřní fázi .....	44
Tabulka 13 Zeta potenciál nanočástic vzorků s 1, 3 a 9% obsahem polymeru ve vnitřní fázi .....	45
Tabulka 14 Složení vzorků č. 21–44, u kterých byl cetrimid přidán do vnější fáze..	49
Tabulka 15 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnější fáze .....	50
Tabulka 16 Zeta potenciál nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnější fáze .....	51



Tabulka 17 Složení vzorků č. 45–60, u kterých byl cetrimid přidán do hotové nanodisperze .....	54
Tabulka 18 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do nanodisperze .....	55
Tabulka 19 Zeta potenciál nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do nanodisperze .....	55
Tabulka 20 Složení vzorků č. 61–66, u kterých byl cetrimid přidán do vnitřní fáze.	56
Tabulka 21 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze .....	56
Tabulka 22 Zeta potenciál nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze .....	57
Tabulka 23 Povrchové napětí roztoků polymerů v DMSO .....	58
Tabulka 24 Viskozita roztoků polymerů v DMSO .....	60
Tabulka 25 Koncentrace fluoresceinu a hodnoty naměřených signálů použitých pro vytvoření kalibrační křivky .....	65

## **10 Seznam obrázků**

Obrázek 1 Struktura nanosféry a nanotobolky .....	12
Obrázek 2 Struktura PLGA.....	14
Obrázek 3 Hydrolýza PLGA.....	15
Obrázek 4 Multifunkční PLGA nanočástice obsahující diagnostické činidlo, protinádorovou látku a ligand pro cílenou distribuci.....	19
Obrázek 5 Sestava pro přípravu nanočástic metodou nanoprecipitace.....	22
Obrázek 6 Rozdíl v rychlosti pohybu malých a velkých částic .....	24
Obrázek 7 Šíření vln světla rozptýleného částicemi .....	24
Obrázek 8 Obraz skvrn vzniklý zachycením rozptýleného světla na detektoru .....	25
Obrázek 9 Záporně nabitá částice ponořená do kapaliny .....	26
Obrázek 10 Hodnoty potenciálu měnící se v závislosti na vzdálenosti od povrchu částice.....	26
Obrázek 11 Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 1–5 obsahujících polymer PLGA .....	46
Obrázek 12 Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 6–10 obsahujících polymer A2 .....	46
Obrázek 13 Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 11–15 obsahujících polymer A4.....	47
Obrázek 14 Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 16–20 obsahujících polymer T3 .....	47
Obrázek 15 Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 2 (PLGA), 7 (A2), 12 (A4), 17 (T3) obsahujících 3 % polymeru .....	48
Obrázek 16 Vliv typu a koncentrace polymeru na velikost nanočástic .....	48

Obrázek 17 Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 21–25, které obsahují polymer A2 1% a odlišné množství cetrimidu .....	52
Obrázek 18 Frekvenční křivka-distribuce velikosti nanočástic vzorků č. 32–35, které obsahují polymer A4 1% a odlišné množství cetrimidu .....	52
Obrázek 19 Ukázkový graf polymeru A2 1% znázorňující tendenci změny velikosti nanočástic v závislosti na množství cetrimidu.....	53
Obrázek 20 Ukázkový graf polymeru A2 1% znázorňující tendenci změny ZP nanočástic v závislosti na množství cetrimidu.....	53
Obrázek 21 Velikost nanočástic v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze .....	57
Obrázek 22 Zeta potenciál v závislosti na množství cetrimidu přidaném do vnitřní fáze.....	57
Obrázek 23 Povrchové napětí roztoků polymeru T3 1 a 9% .....	58
Obrázek 24 Povrchové napětí roztoků polymeru PLGA 1 a 9% .....	59
Obrázek 25 Povrchové napětí roztoků polymeru A4 1 a 9% .....	59
Obrázek 26 Povrchové napětí roztoků polymeru A2 1 a 9% .....	59
Obrázek 27 Příklad vyhodnocení tokové křivky dle Newtonova modelu (Newtonian model fit).....	61
Obrázek 28 Příklad vyhodnocení tokové křivky dle mocninného vztahu (Power law model fit).....	61
Obrázek 29 Viskozitní křivky roztoků polymeru A2 v DMSO .....	62
Obrázek 30 Viskozitní křivky roztoků polymeru A4 v DMSO .....	62
Obrázek 31 Viskozitní křivky roztoků polymeru T3 v DMSO .....	63
Obrázek 32 Viskozitní křivky roztoků polymeru PLGA v DMSO .....	63
Obrázek 33 Vliv typu a koncentrace polymeru na viskozitu.....	64

Obrázek 34 Kalibrační křivka fluoresceinu v 0,1 M NaOH ..... 65

## **11 Seznam použité literatury**

1. **Awan, I. Z. et al.** Wondrous nanotechnology. *J. Chem. Soc. Pak.* 2016, 38, 06, 1026-1055.
2. **Rabišková, M.** Nanočástice pro léčivé formy. *Remedia.* 2007, 17, 5, 495-501.
3. **Quintanar, D. et al.** Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from performed polymers. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998, 24, 12, 1113-1128.
4. **Christoforidis, J.B. et al.** Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. *Mediators Inflamm.* 2012.
5. **Sahoo, S.K., Labhasetwar, V.** Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today.* 2003, 8, 24, 012-1120.
6. **Musyanovych, A., Landfaster, K.** Biodegradable polyester-based nanoparticle formation by miniemulsion technique. *Material Matters.* 2012, 7, 3, 30-34.
7. **Makadia, H.K., Siegel, S.J.** Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers.* 2011, 3, 1377-1397.
8. **Astete, C.E., Sabliov, C.M.** Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci.* 2006, 17, 3, 247-289.
9. **Verger, M.L. et al.** Preparation and characterization of nanoparticles containing on antihypertensive agent. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998, 46, 2, 137-143.
10. **Nair, L.S., Laurencin, C.T.** Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 2007, 32, 762-798.
11. **Li, S., McCarthy, S.P.** Influence of crystallinity and stereochemistry on the enzymatic degradation of poly(lactide)s. *Macromolecules.* 1999, 32, 4454-4456.
12. **Jain, R.A.** The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-coglycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 2000, 21, 23, 2475-2490.

13. **Gadad, A.P. et al.** Study of different properties and applications of poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanotechnology. *Indian Drugs*. 2012, 49, 12, 5-22.
14. **Dunnea, M., Corrigana, O.I., Ramtoola, Z.** Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*. 2000, 21, 16, 1659-1668.
15. **Alexis, F.** Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. *Polym Int*. 2005, 54, 1, 36-46.
16. **Schliecker, G. et al.** Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: Effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. *Int J Pharm*. 2003, 266, 6, 39-49.
17. **Park, T.G.** Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: Effect of molecular weight. *J Control Release*. 1994, 30, 2, 161-173.
18. **Siegel, S.J. et al.** Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006, 64, 287-293.
19. **Eniola, A.O., Hammer, D.A.** Characterization of biodegradable drug delivery vehicles with the adhesive properties of leukocytes II: Effect of degradation on targeting activity. *Biomaterials*. 2005, 26, 6, 661-670.
20. **Zolnik, B.S., Burgess, D.J.** Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J Control Release*. 2007, 122, 3, 338-344.
21. **Saxena, V., Sadoqi, M., Shao, J.** Polymeric nanoparticulate delivery system for indocyanine green: biodistribution in healthy mice. *Int J Pharm*. 2006, 308, 1-2, 200-204.
22. **Farokhzad, O.C., Langer, R.** Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009, 3, 1, 16-20.

23. **Liu, Y., Miyoshi, H., Nakamura, M.** Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int. J. Cancer.* 2007, 120, 12, 2527-2537.
24. **Sarkar, S. et al.** Development and characterization of a porous micropatterned scaffold for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2006, 27, 27 4775-4782.
25. **Lim, H. et al.** A novel technique for loading of paclitaxel-PLGA nanoparticles onto ePTFE vascular grafts. *Biotechnol. Prog.* 2007, 23, 3, 693-697.
26. **Whealtley, M.A. et al.** Comparison of in vitro and in vivo acoustic response of a novel 50:50 PLGA contrast agent. *Ultrasonic.* 2006, 44, 4, 360-367.
27. **Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A.** Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010, 385, 113-142.
28. **Nagavarma, B.V.N. et al.** Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles. *Asian J Pharm Clin Res.* 2012, 5, 3, 16-23.
29. **Galindo-Rodriguez, S. et al.** Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm Res.* 2004, 21, 8, 1428-1439.
30. **Šimek, M., Grünwaldová, V., Kratochvíl, B.** Současné měření velikosti částic farmaceutických látek a jejich omezení. *Chem. Listy.* 2014, 108, 50-55.
31. **Malvern Instruments.** Zetasizer Nano Příručka pro uživatele. 3. 2007.
32. **Xu, R.** Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology.* 2008, 6, 112-115.
33. **Honary, S., Zahir, F.** Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems. *Trop J Pharm Res.* 2013, 12, 2, 265-273.