

Příprava a charakterizace polymerních materiálů vhodných pro postupné uvolňování biologicky aktivních látek

Bc. Lenka Böhmová

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Böhmová**
Osobní číslo: **T11082**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava a charakterizace polymerních materiálů vhodných pro postupné uvolňování biologicky aktivních látek**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Pokuste se připravit a charakterizovat mikročástice na bázi PLA-PEG.
3. Pokuste se enkapsulovat zvolenou biologicky aktivní látku ve vhodném nosiči.
4. Výsledky přehledně zpracujte do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Články v odborných periodících dostupných v databázích Web of Science, Scopus, případně dalších.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí


Datum zadání diplomové práce:

8. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 8. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně14.5.2013

.....
Böhmová

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezahrnuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Byla zkoumána příprava mikro a submikro částic z biologicky rozložitelného blokového kopolymeru poly(laktid)–poly(ethylen glykol) (PLA-PEG) pomocí metody emulgace s odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku. Taktéž byla studována možnost přípravy částic zmiňovanou metodou bez použití povrchově aktivní látky jako stabilizátoru emulze. V rámci studie byl pozorován vliv procesních a formulačních parametrů na velikost a distribuci velikosti vzniklých částic. V další části práce byl proveden pokus o enkapsulaci vybraných bioaktivních látek s různou polaritou, v tomto případě byla sledována účinnost enkapsulace látky ve zkoumaném procesu.

Klíčová slova: mikročástice, bioaktivní látky, hydrocortison, cortison 21-acetát, progesteron, β -estradiol, poly(laktid)-poly(etylen glykol), enkapsulace

ABSTRACT

The preparation of micro and submicro particles from biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymer by the method of emulsification and solvent evaporation at reduced pressure was investigated. The possibility of particle preparation by the mentioned method without using a surfactant as a stabilizer was also studied. During the study the effect of process and formulation parameters on the particle size and the size distribution were evaluated. In the next section, an attempt to encapsulate selected bioactive substances having different polarity was accomplished. In this experiment the efficiency of the encapsulation process was investigated.

Keywords: microparticles, bioactive substances, hydrocortisone, cortisone 21-acetat, progesterone, β -estradiol, Poly(lactide)-Poly(ethylene glycol), encapsulation

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, panu doc. Mgr. Markovi Koutnému, Ph.D. a také konzultantovi mé práce panu Ing. Petru Stloukalovi, Ph.D., za trpělivost při konzultacích, odborné vedení a pomoc.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	6
I TEORETICKÁ ČÁST.....	7
1 POLYMERNÍ NANOČÁSTICE.....	8
1.1 STRUKTURA ČÁSTIC	8
1.1.1 Nanokapsle	8
1.1.2 Nanosféry	9
1.1.3 Dvojvrstvé polymerní membrány	9
1.1.4 Micely	10
2 VÝROBA POLYMERNÍCH NANOČÁSTIC.....	11
2.1 MATERIÁLY VHODNÉ PRO VÝROBU MIKRO- A NANOČÁSTIC	11
2.1.1 Kyselina polymléčná (PLA).....	11
2.1.2 Poly (etylen glykol) (PEG).....	12
2.2 METODY POUŽÍVANÉ PRO TVORBU NANOČÁSTIC	12
2.2.1 Metoda odpaření rozpouštědla a její modifikace	13
2.2.2 Metoda emulgace s difuzí rozpouštědla.....	15
2.2.3 Metoda emulgace s reverzním vysolováním.....	15
2.2.4 Získávání nanočástic pomocí gelace emulzních kapek.....	16
2.2.5 Mezifázová polykondenzační reakce	16
2.2.6 Nanoprecipitace polymeru	16
2.2.7 Tvorba nanočástic z neutrálních nanogelů	17
2.2.8 Metody založené na iontové gelaci	18
3 KOPOLYMERNÍ NANOČÁSTICE PEG-PLA.....	20
3.1 SPONTÁNNÍ EMULGACE	21
4 VÝROBA PEG-PLA KOPOLYMERU.....	22
4.1 RING-OPENING POLYMERACE PEG A LAKTIDU	22
4.2 ANIONICKÁ RING-OPENING POLYMERACE	22
5 VLASTNOSTI PEG-PLA.....	24
5.1 FORMULAČNÍ PROMĚNNÉ PARAMETRY	24
5.2 PROCESNÍ PROMĚNNÉ PARAMETRY	24
6 MECHANISMUS UVOLŇOVÁNÍ	26
6.1 UVOLŇOVÁNÍ Z KOPOLYMERNÍCH NANOČÁSTIC PEG-PLA	26
6.1.1 Faktory ovlivňující uvolňování z kopolymerních nanočástic PEG-PLA.....	26
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
7 MATERIÁL A METODY	29
7.1 MATERIÁL.....	29
7.1.1 Pro sledování vlivu formulačních a procesních proměnných parametrů přípravy	29
7.1.2 Pro enkapsulaci biologicky aktivních látek.....	29
7.1.3 Pro enkapsulaci biologicky aktivních látek do směsi částic	29
7.1.4 Biologicky aktivní látky použité pro enkapsulaci do připravených submikročástic.....	29

7.2	METODY.....	29
7.2.1	Příprava částic pro sledování vlivu procesních a formulačních parametrů na velikost částic	29
7.2.2	Příprava částic pro zjištění účinnosti enkapsulace v závislosti na polaritě enkapsulované látky.....	30
7.2.3	Příprava směsí částic PEG-PLA s PLA	30
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
8.1	VLIV FORMULAČNÍCH A PROCESNÍCH PARAMETRŮ PŘÍPRAVY NA VELIKOST ČÁSTIC.....	32
8.2	STANOVENÍ ÚČINNOSTI ENKAPSULACE VYBRANÝCH BIOAKTIVNÍCH LÁTEK	35
8.2.1	Enkapsulace steroidních látek do částic PEG-PLA II.....	39
8.2.2	Enkapsulace steroidních látek do směsí částic PLA a PEG-PLA.....	41
	ZÁVĚR	48
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	54
	SEZNAM OBRÁZKŮ	55
	SEZNAM TABULEK.....	57

ÚVOD

Využití polymerních materiálů jako nosičů bioaktivních látek nabývá v posledních letech na významu. Lze je využít v zemědělství, pro kontrolované uvolňování např. pesticidních látek [1], ale stěžejní uplatnění nachází tyto matrice ve farmaceutickém průmyslu a lékařství obecně. Důvodem je možnost přípravy částic mikro-, submikro- a někdy až nano-rozměrů, reverzibilně plněných bioaktivními látkami, které jsou následně, díky polymerní matici, dopraveny na cílové místo účinku, kde následně dojde k jejich postupnému a kontrolovanému uvolnění. Takto připravené systémy mají oproti konvenčním aplikacím řadu výhod. V lékařství můžeme mluvit o cíleném terapeutickém účinku léčiva, čehož je zapotřebí dosáhnout např. při léčbě nádorových onemocnění. V takovém případě můžeme předcházet některým nežádoucím jevům jako je vysoká toxicita léčiv a dále pak prodloužit jejich aktivitu a stabilitu v lidském těle. [2] Obecně lze říci, že použití polymerních materiálů je výhodné, avšak závisí na vlastnostech daného polymeru.

Pro využití v medicíně je důležité, aby použitý polymer nebyl pro organismus toxický, naopak byl biokompatibilní. Biokompatibilita dané látky nebo materiálu popisuje její snášlivost v biologickém prostředí. Další významnou vlastností ať už v lékařství nebo ve výše zmiňovaném zemědělství, je polarita použitého polymeru.

Cílem této práce je zjistit vliv parametrů přípravy mikro- a submikročásteček PEG-PLA na jejich velikost a distribuci velikosti. Dále je zde zdokumentován pokus o enkapsulaci látek různé polaritě do námi vyrobených mikro- a submikročásteček.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERNÍ NANOČÁSTICE

Polymerní nanočástice plněné léčivými mohou být vyrobeny z přírodních nebo syntetických polymerů, které jsou většinou biodegradabilní. [3,4,5,17] Ve farmaceutickém průmyslu jsou nanočástice používány za účelem ochrany biologicky aktivní látky enkapsulované v dané matici před nežádoucími vlivy okolního prostředí a využitím nanočástic je také možné maskovat nepříjemnou chuť dané léčivé látky. [7] Nejvýznamnější vlastností je možnost řízeného uvolňování léčiva. Dosažením řízeného uvolňování dochází ke zvýšení účinnosti léčiva a snižuje se výskyt nežádoucích účinků. Celkově je také snížena dávka léčiva potřebná k léčbě. [8] Léčivo je možné zachytit do dané částice nebo se může adsorbovat na povrch nanočástic. Platí, že křehké molekuly jsou lépe chráněny před biologickou degradací, když jsou zachyceny uvnitř nanočástice. [3]

Pro získání takto ochráněného léčiva by mělo k asociaci léčiva s jeho nosičem dojít již během přípravy nanočástic. Může být také využito adsorpce léčiva na povrch již připravených nanočástic a to v případě, je-li léčivo snadno rozložitelné nebo nedochází-li během tvorby nanočástic ke spojení daného léčiva s nanočásticemi. [3]

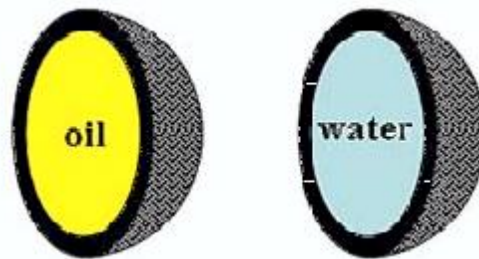
Velikost částic je možné regulovat stejně jako jejich povrchové vlastnosti, navíc částice této struktury mohou být podávány několika způsoby a to perorálně, parenterálně nebo přes sliznici nosní dutiny. [7,8] Vzhledem k velikosti těchto částic je omezeno množství vkládané látky a může docházet k tzv. „burst“ efektu. [8] Při „burst efektu“ enkapsulované léčivo rychle difunduje z částice do rozpouštědla z důvodu slabých vazeb na povrch nanočástic.

1.1 Struktura částic

1.1.1 Nanokapsle

Nejprve byly vyrobeny nanokapsle, jejichž jádro bylo tvořeno olejem, což mělo za následek využití těchto částic jako nosičů pro látky nepochopitelné. Nanokapsle s olejovým jádrem chrání léčivo před degradací *in vivo*, jsou stabilní a mají schopnost pozvolného uvolňování léčiva. [9] V dnešní době lze už připravit i nanokapsle s vodným jádrem, které jsou tedy vhodnými nosiči pro léčiva polárního charakteru. Obsah nanokapslí je určen povahou dispergované fáze. [3,7]

Nanokapsle se zásadně liší od nanosfér v tom, že v podstatě fungují jako zásobárna, kde je požadovaná látka umístěna uvnitř struktury a je obklopena polymerní membránou. Daná látka však může být i adsorbována na povrchu částic tohoto charakteru. [6,7]



Obr. 1 Struktura nanokapslí [3]

1.1.2 Nanosféry

Nanosféry jsou systémy, jejichž celá hmota je v pevném stavu, nerozlišuje se u nich tedy jádro a obal (Obr. 2). [3] Nanočásticové systémy tohoto typu jsou charakterizovány velikostmi v rozmezí několika desítek až několika set nanometrů. Jedná se o částice převážně kulového tvaru, kde může být léčivo absorbováno na sférickém povrchu nebo enkapsulováno do částice. [6] Pro dosažení trvalé dispergace ve vodě je zapotřebí stabilizujících látek jako jsou například amfifilní molekuly nebo prostředky používané na udržení koloidních systémů. [3,7,8]



Obr. 2 Různé struktury nanosfér [3]

1.1.3 Dvojvrstvé polymerní membrány

Pro získání dvojvrstvé polymerní membrány tvořené pomocí PEG-PLA se využívá rehydratace, která probíhá v povrchové vrstvě, kde jsou kopolymery rozpuštěny v těkavých organických rozpouštědlech. K tvorbě membrán dochází během odpařování organického rozpouštědla. [4]

1.1.4 Micely

Možnost přípravy nanomicel z blokového kopolymeru PEG-PLA závisí hlavně na rozpustnosti použitého kopolymeru ve vodě. Nejčastější metodou pro získávání nanomicel je přímá rozpouštěcí metoda, kde jsou materiály tvořící částice rozpuštěny bez použití organického rozpouštědla. Využitím této metody mohou kopolymery tvořit transparentní micelární roztok těsně nad hodnotou své kritické micelární koncentrace. Další z používaných metod je rehydratace probíhající v povrchovém filmu zmiňovaná výše (Kap. 1.1.3). [10]

2 VÝROBA POLYMERNÍCH NANOČÁSTIC

2.1 Materiály vhodné pro výrobu mikro- a nanočástic

Jak bylo již výše zmíněno (Kap. 1), materiál vhodný pro použití jako nosič léčiv může být přírodního i syntetického původu. Obecně lze pro výrobu nanočástic využít celou řadu polymerů (Tab. 1). [3]

Výběr materiálu vhodného jako matrice závisí na metodě použité pro výrobu nanočástic, na jejich požadované konečné velikosti, dále na vlastnostech léčiva (rozpuštnost a stabilita), na povrchovém náboji a permeabilitě, na stupni biodegradability, toxicitě, biokompatibilitě a v neposlední řadě na požadovaném způsobu uvolňování léčiva. [8]

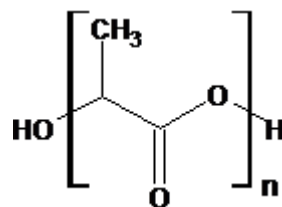
Tab. 1 Nejvíce využívané polymery pro výrobu nanočástic [3,7,11]

Skupina polymerů	Název, zkratka, komerční název
Přírodní polymery	Chitosan
	Alginát
	Gelatin
	Albumin
	PHB
Syntetické homopolymery	PLA
	PLGA
	PCL
	PMMA
	PICBA
	PIHCA
	PBCA
Kopolymery	PLA-PEG
	PLGA-PEG
	PCL-PEG

2.1.1 Kyselina polyléččná (PLA)

Kyselina polyléččná (PLA) je biodegradabilní látka, podléhající v lidském těle hydrolyze na netoxickou kyselinu mléčnou, která je následně metabolizována pomocí citrátového cyklu na vodu a oxid uhličitý. [2,4,9,12-14] Jedná se o lineární alifatický termoplastický polyester, jehož základní monomerní jednotkou je kyselina mléčná (Obr. 3).

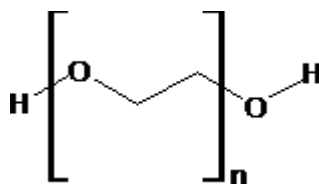
Kyselina polymléčná může být vyrobena polykondenzací kyseliny mléčné, nebo pomocí ring-opening polymerace z laktidu. Pro získání nízkomolekulární PLA je vhodná metoda polykondenzace laktidu, pro vysokomolekulární PLA pak ring-opening polymerace.



Obr. 3 Chemická struktura kyseliny polymléčné

2.1.2 Poly (etylen glykol) (PEG)

PEG je polymerní látka tvořená jednotkami ze dvou uhlíků spojených etherovými vazbami. Jde o látku netoxickou, rozpustnou ve vodě i v organických rozpouštědlech, která je chemicky inertní. Je využíván zejména ve farmacii např. jako laxativum. Na rozdíl od PLA není imunogenní, je tedy schopen chránit látky v sobě uzavřené před předčasným vychytáváním imunitním systémem.



Obr. 4 Chemická struktura poly (etylen glykolu)

2.2 Metody používané pro tvorbu nanočástic

Většina způsobů přípravy nanočástic zahrnuje dva hlavní kroky. Prvním krokem bývá příprava emulgovaného systému. [15] Během druhého kroku dochází ke tvorbě nanočástic buď srážením, gelací polymeru nebo polymerací monomerů. Existuje několik metod, kde dochází ke tvorbě nanočástic již během prvního kroku procesu. Byly popsány také metody, kde není vyžadována příprava emulze před získáním nanočástic. Tyto postupy jsou založeny například na srážkách polymeru ve spontánně vzniklém disperzním systému (Tab. 1). [3]

Mezi syntetické polymery využívané při nanoprecipitacích polymeru patří např.: PLA, PLGA, PCL, PEG-PCL-PEG a PEG-PLA (Kap. 2.2.6). Tyto látky lze použít jako nosiče pro celou řadu léčiv, např. insulinu, dexamethasonu, ketoprofenu, vitamínu K a dalších.

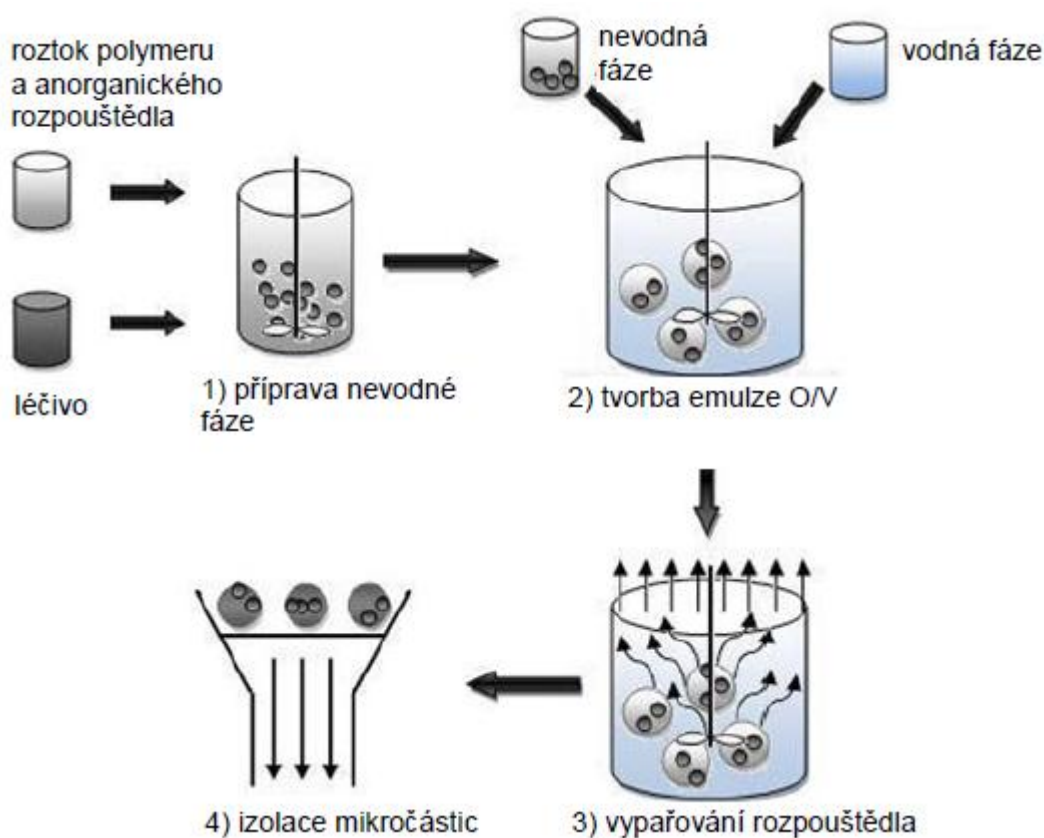
Dalšími vhodnými materiály pro tento způsob tvorby nanočástic jsou amfifilní cyklodextriny, malé nepolární molekuly a z přírodních materiálů bílkoviny. [3]

Při metodě emulgace s difuzí rozpouštědla se využívají matricové systémy složené z PLA, PLGA případně PCL nebo [3]

Pro přípravu nanokapslí, pomocí mezifázové kondenzace s využitím spontánní emulgace, je využíváno kromě jiných také polyamidů a polyuretanů. [3]

2.2.1 Metoda odpaření rozpouštědla a její modifikace

Metoda odpaření rozpouštědla je velmi oblíbená a široce využívaná převážně v medicíně. Jedná se o přístrojově nenáročnou metodu, která v dnešní době nachází své uplatnění i v zemědělství pro přípravu biologicky rozložitelných nosičů např. herbicidních látek. [1] Jde o první metodu přípravy nanočástic z předem připraveného polymeru. [3] Je to metoda založená na fyzikálně-mechanických přeměnách a jejím produktem jsou mikrosféry. Tímto způsobem lze enkapsulovat řadu polárních i nepolárních léčiv a to v závislosti na použité modifikaci této metody. [7]



Obr. 5 Schéma přípravy nanočástic metodou odpaření rozpouštědla. [7]

Tvorby mikročastic je v tomto případě dosaženo odpařením části emulze, která obsahuje dispergované léčivo a rozpuštěný polymer. Během odpařování dochází ke tvorbě pevné struktury polymeru, která do sebe uzavírá léčivo či jinou látku určenou k enkapsulaci. [7,8] Nevýhodou použití této metody může být přítomnost zbytkového množství organického rozpouštědla. Naopak její výhodou je možnost přípravy polymerních mikročastic za laboratorní teploty. [7]

Systém O/V

Tento způsob emulgace je vhodný především pro látky s nízkou polaritou. Dochází zde nejprve k rozpuštění obou účastníků se složek, léčiva i biodegradabilního polymeru v rozpouštědle. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je metylen chlorid, ale v závislosti na rozpustnosti látek určených k enkapsulaci lze použít např. i etyl acetát nebo metyl (etyl) keton.[12] Tato modifikace metody s odpařením rozpouštědla není vhodná pro polární látky a to vzhledem k polaritě kontinuální fáze, kterou je voda. [7] Vzniklá organická olejová fáze se emulguje v roztoku, který nerozpouští léčivo (voda, voda s vhodným emulgátorem). Přítomné těkavé organické rozpouštědlo je následně odstraněno většinou odpařením, ale někdy také extrakcí [7,13]

Systém O/O

Tato modifikace je využívána u látek, které přesto, že jsou klasifikovány jako nepochární, vykazují značnou rozpustnost ve vodě (např. hydrocortison). U látek tohoto charakteru je při použití systému O/V dosahováno nízké účinnosti enkapsulace. Důvodem je proudění aktivní látky během procesu enkapsulace z dispergované do kontinuální fáze. V systému O/O je kontinuální fáze nahrazena netěkavými kapalinami lipofilní nebo organické povahy, kam se řadí minerální a rostlinné oleje nebo netěkavá organická rozpouštědla. Jako vnitřní fázi lze použít např. acetonitril. Obě fáze jsou vzájemně nemísitelné. Využitím tohoto systému je možné připravit mikročastice s třífázovým uvolňováním, kdy nejprve dochází k rychlému uvolnění léčiva („burst“ efekt) z povrchu mikročastic, poté následuje pozvolné uvolňování a ve třetí fázi dochází opět k rychlému uvolňování, tentokrát z důvodu eroze a rozpadu částice. [7,13]

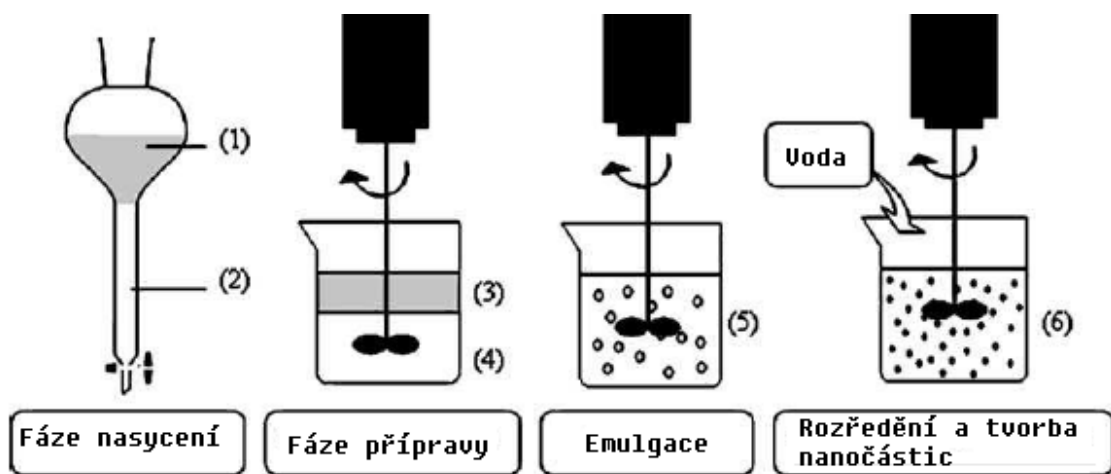
Systém V/O/V

Jedná se o méně rozšířenou modifikaci metody odpaření rozpouštědla, která ve svém principu využívá násobné emulze. Metoda je dobře využitelná pro malá množství látek, které

vykazují velmi dobrou rozpustnost ve vodě. Existuje také opačná varianta této modifikace a tou je systém O/V/O. [7]

2.2.2 Metoda emulgace s difuzí rozpouštědla

Jde o metodu, kde dochází k tvorbě submikročásteček čistě difuzním mechanismem. Opět jde o vytvoření jednoduché emulze, kde olejovou fází tvoří voda nasycená rozpouštědlem, a kontinuální fáze je složena z olejové fáze nasycené vodou. Rozpouštědlo použité při této metodě přípravy musí být částečně mísitelné s vodou. [15]



Obr. 6 Schéma postupu přípravy nanočástic metodou emulgace s difuzí rozpouštědla (1)Vodou částečně mísitelné rozpouštědlo nasycené vodou, (2)Voda nasycená rozpouštědlem, (3)Organická fáze, (4)Vodná fáze, (5)Emulgace,(6)Rozředění ve větším objemu vody. [3]

Tímto postupem lze připravit částice o rozměrech kolem 150 nm a je možné snižovat velikost emulzních kapek extrakcí rozpouštědla. Na rozdíl od metody emulgace s odpařením rozpouštědla dochází v této metodě k extrakci Organického rozpouštědla z emulzních kapek v rámci milisekund.[15] Velikost připravených částic klesá s rostoucí mísitelností použitého rozpouštědla s vodou, ale také např. množstvím použitého stabilizátoru. [3]

2.2.3 Metoda emulgace s reverzním vysolováním

Tato metoda je svým principem podobná metodě emulgace s difuzí rozpouštědla. Hlavním rozdílem oproti výše uvedenému způsobu získávání submikročásteček je složení emulze. Kdy

je na rozdíl od předchozí metody použito rozpouštědlo polymeru, které je mísitelné s vodou. [3,18]

2.2.4 Získávání nanočástic pomocí gelace emulzních kapek

Tento postup získávání nanočástic je možné použít v případě polymerů vykazující jev gelace. Způsob vlastní gelace je závislý na způsobu tvorby gelů jednotlivých polymerů. [3]

Ke gelaci může dojít např. snížením teploty. Nanočástice jsou v tomto případě tvořeny během ochlazení emulze, kdy dochází ke gelovatění emulzních kapek. U jiných typů polymerů mohou být gely tvořeny přidavkem další složky do systému nebo změnou pH roztoku polymeru.

V případě použití hydrofilních polymerů dochází ke vzniku nanočástic hydrogelu, které jsou vhodné pro enkapsulaci hydrofilních látek. [18]

2.2.5 Mezifázová polykondenzační reakce

Principiálně zde dochází ke vzniku polymerního filmu na rozhraní dvou vzájemně nemísitelných fází a to reakcí dvou monomerů, kdy každý z monomerů je rozpuštěn v jiné fázi. Pro získání požadovaných nanokapslí je nutné, aby reakce probíhala na rozhraní kapek olejové fáze dispergovaných ve vodné fázi emulze, která vznikla spontánní emulgací.

Vlastnosti vzniklého polymerního obalu jsou ovlivňovány charakterem výchozích monomerů, zatímco koncentrace a molekulová hmotnost monomerů ovlivňuje porozitu a tloušťku stěny připravovaných nanokapslí.[19,20] Tímto způsobem připravené nanokapsle jsou vhodné pro enkapsulaci lipofilních látek, kde je dosahováno vysokého procenta enkapsulace. [3]

2.2.6 Nanoprecipitace polymeru

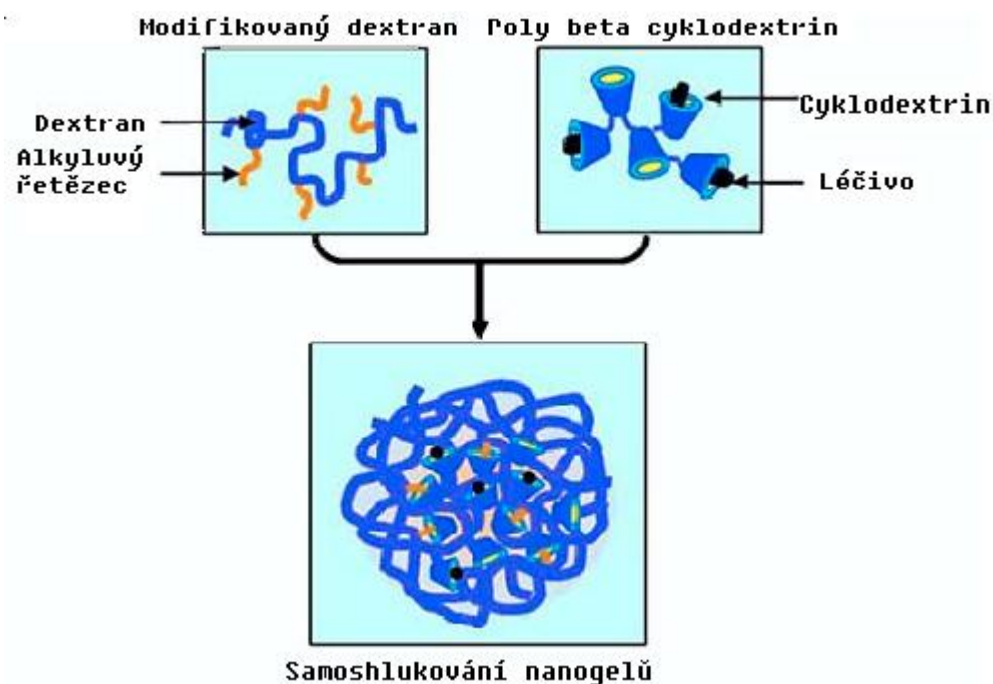
Jedná se o jeden z nejjednodušších postupů přípravy nanosfér, bez použití povrchově aktivní látky jako stabilizátoru, který byl objeven Fessi et al. [21] Jde o metodu jednoduchou, ekonomickou a snadno reprodukovatelnou, která využívá předem připravených polymerů.

Základním principem metody je použití 3 základních složek: polymeru, rozpouštědla polymeru a látky, která polymer nerozpouští. Rozpouštědlo polymeru by mělo být mísitelné s vodou a zároveň by mělo být snadno odstranitelné ze systému odpařováním (např. aceton). [22]

Pro získání nanosfér je rozpouštědlo přidáno k látce polymer nerozpouštějící. K tvorbě samotných nanočástic dochází okamžitě a to během rychlé difuze roztoku polymeru do roztoku látky, která polymer nerozpouští. Velikost připravených částic se pohybuje kolem 200 nm s úzkou distribucí jejich velikosti.

2.2.7 Tvorba nanočástic z neutrálních nanogelů

Výchozími polymery v této metodě je dextran s roubovanými alkylovými řetězci různých délek a poly (beta cyklodextriny). Ke tvorbě shluků dochází ihned po smíchání roztoků těchto polymerů, hydrofobní dutiny poly (beta cyklodextrinu) jsou totiž vhodným hostitelem pro alkylové řetězce roubované na dextranu. Soudržnost celého systému je založena na principu „zámek-klíč“. [3]



Obr. 7 Schéma tvorby nanočástic samoshlukováním nanogelů [3]

Proveditelnost a stabilita vzniklých systému je ovlivněna množstvím substituovaných jednotek glukosy alkylovými řetězci, počtem uhlíku v těchto řetězcích, koncentrací jednotlivých polymerů, molekulovou hmotností poly (beta cyklodextrinu) a poměrem polymerů. [23] S využitím nanočástic připravených tímto způsobem je možné u některých léčiv dosahovat enkapsulace v množství větším než 90%.

2.2.8 Metody založené na iontové gelaci

Jde o jedny z mála metod, které nevyužívají organického rozpouštědla. Iontové nanogely mohou být získány z vodných roztoků nabitých polysacharidů, které podléhají gelaci v přítomnosti malých iontů s opačnými náboji. Jako výchozí látky lze použít chitosan nebo alginát. Velikost připravených nanočástic je závislá na koncentraci alginátu a také na molekulové hmotnosti polylysinu, který se používá pro stabilizaci nanočástic. [3]

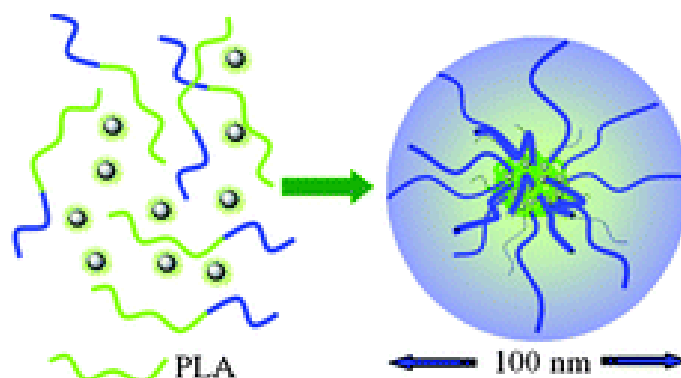
Tab. 2 Hlavní výhody a nevýhody metod přípravy nanočástic [1].

Metoda	Výhody	Nevýhody	Reference
Nanočástice získané pomocí koloidního mlýnu	Produkce dobře charakterizovaných emulzí, jednotná velikost částic	Velká energie pro proces emulgace	3
Emulgace s odpařením rozpouštědla	Možnost enkapsulace hydrofobních i hydrofilních léčiv	Možnost "srůstání" nanokapek během procesu odpařování	3, 7, 13
Emulgace s difuzí rozpouštědla	Možnost kontroly velikosti připravovaných částic	Potřeba odstranit velké množství vody	16,17
		Únik ve vodě rozpustného léčiva do vnější nasycené vodné fáze	
Emulgace s reverzním vysolováním	Minimalizace namáhání křehkých léčiv, vysoká účinnost vkládání léčiva	Možnost inkompatibility mezi solemi a léčivy Potřeba čištění pro odstranění elektrolytů	3
Získání nanočástic gelací emulzních kapek	Možnost použití přírodních makromolekul, hydrofilní a biokompatibilní	Omezená enkapsulace hydrofilních léčiv	3, 18
Mezifázové polykondenzační reakce	Nízké koncentrace surfaktantů	Omezena enkapsulace hydrofobních léčiv	3, 19, 20
	Modulace tloušťky nanokapsle změnou koncentrace monomeru	Je potřeba čištění	
Nanoprecipitace polymeru	Velká jednoduchost, rychlost a reprodukovatelnost	Nízká koncentrace polymeru v organické fázi	3, 21,22
	Není nutné použití povrchově aktivní látky		
Tvorba nanočástic z neutrálních nanogelů	Metoda bez použití organického rozpouštědla	Zatím není používána pro hydrofilní léčiva	23
	Kontrolované uvolňování léčiv		
Metody založené na iontové gelaci	Metoda bez použití organického rozpouštědla	Možnost částečné desintegrace vzhledem ke slabým iontovým interakcím	3
	Možnost kontroly uvolňování léčiva enkapsulovaného v nanočásticích na hodnotu pH nebo změny koncentrace iontů		

3 KOPOLYMERNÍ NANOČÁSTICE PEG-PLA

PLA a její kopolymery jsou biokompatibilní látky, vykazující schopnost vysokého procenta enkapsulace hydrofobních léčiv. [2,4,7,13,24] Závažný problém ovšem představuje vychytávání nechráněných nanočástic retikuloendoteliálním systémem po intravaskulárním podání a to v souvislosti s působením daného léčiva na konkrétních místech v těle. [4,5,24,25]

Multiblokový kopolymer sestávající z PLA a PEG je značně zajímavý jako nosný systém pro léčiva, kde řetězec PLA může zajistit tuhost, zatímco segmenty řetězce PEG, vytlačeny na povrch mikročástic udávají těmto částicím požadovaný maskovaný charakter a zvyšují polaritu nosiče. Díky biokompatibilitě PEG částice získají schopnost dlouhodobé cirkulace v těle bez rozpoznání imunitním systémem, což má za následek prodloužení jejich efektivní životnosti. [2,9,12,24-33]



Obr. 8 Struktura blokového kopolymeru PEG-PLA [34]

Wang et.al. se domnívá, že PLA roubovaná PEG je více biokompatibilní látkou než samotná PLA. [31]

PEG a jeho kopolymery tvoří biokompatibilní nanosféry s hydrofobním jádrem, které je stejně jako hydrofilní povrch biologicky rozložitelné. Lepších vlastností může být docíleno použitím rozvětvených polymerů, ve kterých je velký počet PEG bloků větven od hlavního řetězce PLA, čímž se docílí minimálního zabudování PEG bloků do jádra částice, které tvoří PLA. Multiblokové kopolymery a lineární blokové kopolymery byly původně vyvinuty jako nový nanosférový systém, který nabízí rozmanité možnosti při výběru polymerního jádra k usnadnění řízeného zachycení, rozkladu a uvolňování různých biologicky aktivních látek. [25]

Rozpustnost PEG-PLA ve vodě se zvyšuje s rostoucí délkou řetězce PEG. Vzhledem k tomuto faktu lze pro přípravu micel PEG-PLA použít přímou rozpouštěcí metodu, která nevyužívá organického rozpouštědla. [30]

Podle Martinho et. al. (2011) byly mikročástice PEG-PLA využity pro enkapsulaci některých peptidů, anestetik, antivirotik, léčiv na hypertenzi, [5] nízkomolekulárních látek (papaverin) a dalších. [31]

3.1 Spontánní emulgace

Jde v podstatě o modifikaci metody odpařování rozpouštědla, ale ke spontánní emulgaci může docházet i při využití metody vysolování. [8,25] Stejně jako řízeně vyrobené nanočástice mají micely vzniklé samoshlukováním mnoho výhod, např. snížení vedlejších účinků léčiv a jejich delší doba cirkulace v krvi. [30]

Tato technika zahrnuje použití vodou mísitelného rozpouštědla jako olejové fáze. Mezi dvěma fázemi dochází vzhledem ke spontánní difuzi nemísitelného rozpouštědla ke vzniku malých částecek. Zmenšení velikosti částic může být dosaženo zvýšením koncentrace vodou mísitelného rozpouštědla. [8]

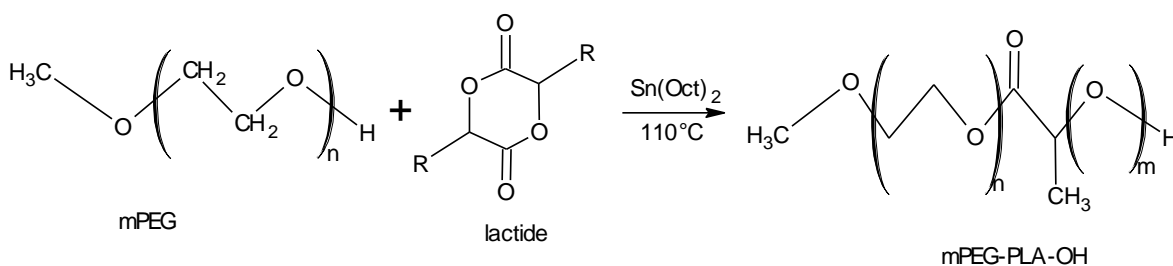
Bylo prokázáno, že k vytvoření nanočástic může docházet samovolně ve vodném roztoku a to v případě použití kopolymeru PEG-PLA, který obsahuje volné aminokyseliny a karboxylové skupiny, které vzájemně ve vodném roztoku interagují. PEG struktura je v roztoku flexibilní. Následkem probíhajících interakcí je vlastní proces samoshlukování do formy nanočástic, které jsou schopny již při samotné tvorbě nanočástic pojmout látky polárního i nepolárního charakteru. Nanočástice vzniklé samoshlukováním jsou také schopny řízeného uvolňování takovýchto látek. [31]

Další příčinou spontánní tvorby nanočástic jsou rozdílné vlastnosti hydrofilního PEG a hydrofobních materiálů tvořících jádro nanostruktury (PLA). Během tvorby nanomicel dochází ke shlukování hydrofobních bloků v jádro, které je schopno enkapsulovat nepolární látky a hydrofilní obal (skořápka) je tvořena polárními částmi polymerního řetězce. [11,30]

4 VÝROBA PEG-PLA KOPOLYMERU

4.1 Ring-opening polymerace PEG a laktidu

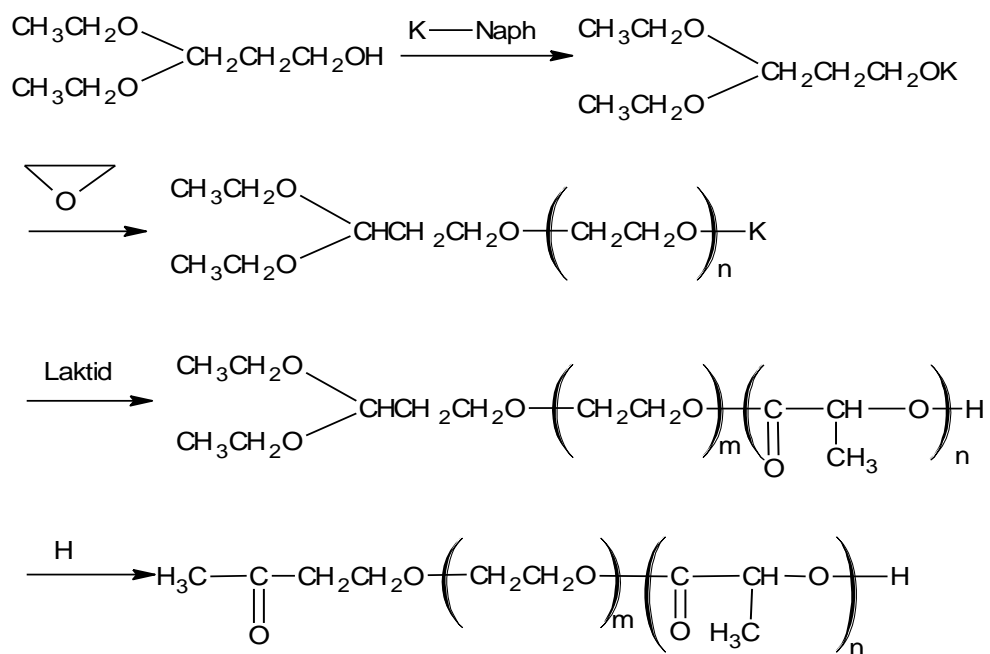
Jde o nejčastější způsob přípravy takovýchto kopolymerů. Mohou být připravovány pomocí ring-opening polymerace poly (etylen glykolu) (PEG), nebo derivátů jeho koncových skupin, a laktidu. Mezi koncové deriváty PEG patří například metoxy poly (etylen glykol) (mPEG) (Obr. 9). Mezi běžně používané katalyzátory patří soli cínu, zvláště soli cínaté, které vykazují silný katalytický účinek. Lze také použít laktát zinku. [29] Vzhledem k toxicitě sloučenin tohoto těžkého kovu se používá jako iniciátor bismutitá sůl kyseliny octové. Délka polymerního řetězce v tomto systému kopolymerace může být regulována změnou poměru monomeru a iniciátoru. Kopolymery pak mohou mít odlišnou molekulární strukturu – diblok PEG-PLA, triblokový kopolymer PEG-PLA-PEG, multiblokový kopolymer nebo síťový kopolymer. [2,4,9,35]



Obr. 9 Schéma syntézy mPEG-PLA [4]

4.2 Anionická ring-opening polymerace

Při tomto druhu polymerace se běžně jako katalyzátory využívají alkoxid draselný, sodný a butyllithium. Iniciátorem syntézy blokového kopolymeru α -acetal-PEG-PLA je 3,3-diethoxy-propanol draselný. Reaktanty této reakce jsou etylenoxid a kyselina mléčná (Obr. 2). [4]



Obr. 10 Schéma syntézy kopolymerů acetalu PEG-PLA [4]

5 VLASTNOSTI PEG-PLA

Kyselina polymlečná (PLA) je biodegradabilní [30] syntetický materiál. Je však málo rozpustná ve vodě, její doba rozkladu je příliš dlouhá a vykazuje nízkou schopnost pojmout polární léčiva. Díky svým mechanickým vlastnostem a dobré biorozložitelnosti ve vodě byla schválena pro aplikaci v tkáňovém inženýrství. [4,7]

Polyetylen glykol (PEG) je biodegradabilní a biokompatibilní látka, odolná vůči imunologické detekci a je především dobře rozpustný ve vodě. Kopolymerací těchto dvou látek dochází tedy ke zlepšení vlastností PLA. Výsledný kopolymer je pak vhodný pro použití např. ve farmaceutickém průmyslu jako nosič léčiv. Tento kopolymer je v nízkých koncentracích netoxický a nekumuluje se v organismu. [4]

Obecně se stabilizace nanočástic pomocí řetězce PEG ukázala jako nejúspěšnější strategie pro rozpoznání makrofágy a také pro prodloužení doby cirkulace koloidních částic v těle. [2,9,12,24-33]

Výslednou charakteristiku kopolymerních nanočástic PEG-PLA lze ovlivnit parametry jejich přípravy. Obecně lze tyto parametry rozdělit do dvou skupin a to na formulační a procesní proměnné parametry.

5.1 Formulační proměnné parametry

Obecně jsou do této skupiny proměnných řazeny ty, které se vztahují k látkám, které byly při přípravě částic použity. Řadí se sem např.: koncentrace a typ polymeru, objemy fází, typ emulgátoru, objem kontinuální a vnitřní fáze, přídavek anorganické soli. Např. koncentrace polymeru je jedním z významných faktorů ovlivňujících proces přípravy částic. Zvýšením koncentrace polymeru se dosahuje vyššího procenta enkapsulace a také je obvykle zvětšován průměr připravovaných částic. Nižší koncentrace polymeru v systému má za následek vznik částic s pórovitou strukturou, která umožňuje rychlé uvolnění enkapsulované látky. [7]

5.2 Procesní proměnné parametry

Mezi procesní proměnné jsou řazeny podmínky během procesu přípravy, jako jsou: teplota, intenzita míchání, tlak apod.

Vlivem teploty může docházet ke změně velikosti částic, rychleji se odpařuje rozpouštědlo, což urychluje celý proces přípravy mikročástic. Tento krok může být považován za nežádoucí. Zvýšením teploty během přípravného procesu lze docílit snížení pórovitosti připravovaných částic. Další procesní proměnnou je tlak, jehož snížením je snížena teplota varu rozpouštědla a tím dochází k jeho rychlejšímu odpaření. Celým tímto procesem se také urychlí tvorba mikročástic. Je možné, že změna tlaku ovlivňuje i povrchové vlastnosti mikročástic, ale tento fakt není prokazatelný, protože jde o souhru všech formulačních a procesních proměnných. Další významnou částí procesu přípravy mikročástic je míchání. Byl prokázán vliv rychlosti míchání na velikost mikročástic. Se zvyšujícím se počtem otáček dochází ke vzniku jemnější emulze a tím vznikají menší částice. Negativně však počet otáček míchadla působí na výtěžnost procesu. Také typ použitého míchadla má vliv na charakter připravených částic. [7]

6 MECHANISMUS UVOLŇOVÁNÍ

Obvyklé mechanismy uvolňování zahrnují tři typy. Prvním z nich je tzv. burst efekt, druhým je pomalé difuzní uvolňování a třetím je rozklad nanostruktury zkrácováním polymerních řetězců. Nejvýznamnější složkou uvolňování je difuze léčiva póry, která je závislá na pórovitosti matrice. Dalšími procesy, které mohou být při uvolňování látek z polymerní matrice využity, jsou: difuze hydratovaným polymerem, která není závislá na pórovitosti matrice, difuze póry vyplněnými vodou, eroze polymeru nebo působení osmotického tlaku a degradace částic. Obecně jsou rozlišovány dva způsoby degradace matrice. V případě, kdy dochází k nasycení celého objemu matrice vodou, mluvíme o homogenním rozkladu, zatímco k heterogenní degradaci dochází pouze na povrchu částic. V tomto případě dochází k uvolňování enkapsulovaného léčiva v optimálním množství nezávisle na jeho koncentraci v podávané lékové formě. [7]

Fáze kontrolovaného uvolňování závisí na systému podávání léků vzhledem k nerovnoměrné distribuci léčiva uvnitř nanočástic. Uvolňování léčiv závisí hlavně na desorpci léčiv absorbovaných na povrchu nebo uvnitř částic, na procesu difúze nanostrukturou a na difúzi stěnou kopolymeru, dále také na rozpustnosti matrice a na rozpuštění nebo difúzi vázaných sloučenin. Proces uvolňování léčiva lze tedy sledovat kontrolou degradace částic nebo difúze léčiva. [4]

6.1 Uvolňování z kopolymerních nanočástic PEG-PLA

Uvolňování léčiv může být vyvoláno také fyzikálními nebo chemickými metodami. Ke kontrole uvolňování léčiva z kopolymerních nanočástic lze použít i světlo, teplotu, pH, magnetické pole nebo ultrazvuk. Studium mechanismu uvolňování all-trans retinové kyseliny z nanomicel bylo zjištěno, že zajištěním integrity nanočástic použitím fosfátového pufru o pH 7,4 a etanolu jako uvolňovacího média, došlo k „burst efektu“ nanočástic v prvních 15 hodinách pokusu a poté docházelo ke kontrolovanému uvolňování. Přes 80% léčiva bylo uvolněno během prvních pěti dnů pokusu. [4]

6.1.1 Faktory ovlivňující uvolňování z kopolymerních nanočástic PEG-PLA

PEG-PLA je amfifilní blokový kopolymer, který je v organismu stabilní. Díky dobré biokompatibilitě může hydrofilní vrstva PEG zvyšovat rozpustnost nerozpustných léčiv. Může také zabránit absorpci bílkovin na povrch nanočástice a skrýt nanočástice před retikuloen-

doteliálním systémem. Existuje mnoho faktorů, které mohou ovlivnit uvolňování léčiva z nanočástic PEG-PLA. [4]

Jedním z takovýchto faktorů může být molekulová váha, délka jednotlivých polymerních řetězců a poměr PEG/PLA v polymeru. Bylo zjištěno, že delší řetězec PLA způsobí, že bude větší průměr micel a také obsah enkapsulovaného léčiva. Test uvolňování léčiva do organismu ukázal, že delší řetězec PLA způsobuje lepší interakci mezi řetězcem PLA a hydrofobním léčivem a pomalejší uvolňování léčiva z micel. V případě nízké molekulové hmotnosti PEG dochází, vzhledem k malému molekulovému řetězci a nízké flexibilitě, snadněji k deformaci. Při větší molekulové hmotnosti PEG, bude delší molekulový řetězec PEG a stabilnější struktura. Zvýšení molekulové hmotnosti bloku PLA v kopolymeru bude výrazně snižovat stabilitu nanočástic. Uvolňování léčiv z nanočástic může být potenciálně kontrolováno změnou obsahu PEG, molekulovou hmotností PEG a celkovou molekulovou hmotností kopolymeru. [4]

Uvolňování léčiva z nanočástic závisí také na způsobu přípravy nanočástic. Použitím různých metod přípravy lze ovlivnit krystalovou strukturu polymeru, jeho stabilitu jako nosiče pro bioaktivní látky, morfologii povrchu a také velikost částic. Velikost částic je jedna z dalších možností jak se dá ovlivnit uvolňování z nanočástic. Jak již bylo řečeno, velikost je ovlivnitelná délkou řetězců použitého polymeru. [4]

Je prokázáno, že obsah vkládaného léčiva do polymerní matrice mění micelární hydrofobně-hydrofilní rovnováhu a stabilitu micel. Můžeme proto říci, že s rostoucím obsahem enkapsulované bioaktivní látky bude stabilita částic klesat. [4]

Kromě těchto blíže definovaných faktorů mohou uvolňování ovlivňovat i koncentrace polymeru, charakter použitého rozpouštědla a další. [4]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Materiál

7.1.1 Pro sledování vlivu formulačních a procesních proměnných parametrů přípravy

PLA-PEG I. ($M_w = 26300$; PDI = 3,6) vyroben přímou polykondenzací taveniny PLA a PEG v laboratoři Centra polymerních materiálů (CPM) ve Zlíně.

7.1.2 Pro enkapsulaci biologicky aktivních látek

PLA-PEG II. ($M_w = 9000$; PDI = 1,49) vyroben přímou polykondenzací taveniny PLA a PEG v laboratoři CPM ve Zlíně.

7.1.3 Pro enkapsulaci biologicky aktivních látek do směsi částic

PLA-PEG II. ($M_w = 9000$; PDI = 1,49), PLA ($M_w = 4700$; PDI = 2,88) vyrobeny přímou polykondenzací taveniny PLA a PEG v laboratoři CPM ve Zlíně.

7.1.4 Biologicky aktivní látky použité pro enkapsulaci do připravených submikročástic

Hydrocortison (Sigma-Aldrich®), Cortison 21-acetát (Sigma-Aldrich®), Progesteron (Sigma-Aldrich®) a β -Estradiol (Sigma-Aldrich®)

7.2 Metody

7.2.1 Příprava částic pro sledování vlivu procesních a formulačních parametrů na velikost částic

Dané množství kopolymeru PLA-PEG I. bylo rozpuštěno v různých objemových množstvích chloroformu ($V = 50, 100, 150$ nebo $200 \mu\text{l}$) tak, aby bylo dosaženo roztoků o různých koncentracích ($c = 100, 200, 400, 600$ a $800 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Takto připravené roztoky byly vždy jednotlivě dávkovány do 10 ml destilované vody. Tato směs byla poté nepřetržitě míchána vysokorychlostním homogenizátorem (homogenizer DI 18 basic, Yellow Line by IKA, Belgium) po dobu 15 minut při otáčkách 24 000/min, aby došlo k vytvoření mikroemulze. Poté následovala ultrasonikace (Hielscher UP 400S, Germany), kdy byly měněny procesní parametry ($t = 0, 2,5, 5, 10 \text{ min}$; amplituda = 50, 75, 100 %), aby bylo dosaženo

ještě menších velikostí částic. Takto připravovaná směs byla po celou dobu chlazena ledem, aby nedošlo k předčasnému odpaření chloroformu vlivem zahřívání. Na závěr bylo z roztoku za sníženého tlaku odpařeno organické rozpouštědlo (chloroform).

Velikost částic a index polydisperzity (PDI) byl měřen pomocí Z-sizeru (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, USA).

7.2.2 Příprava částic pro zjištění účinnosti enkapsulace v závislosti na polaritě enkapsulované látky

Částice PEG-PLA pro tuto část práce byly připraveny metodou emulgace s odpařením rozpouštědla bez použití stabilizátoru, kdy byla jako organické rozpouštědlo použita směs dichlormetanu s metanolem (9:1). V této směsi bylo rozpuštěno dané množství biologicky aktivní látky (20mg) a poté 200 mg předem připraveného blokového kopolymeru PEG-PLA II. Vnesením této organické fáze do destilované vody (10 ml) vznikla emulze, která byla podrobena míchání po dobu 15 minut vysokorychlostním míchadlem (homogenizer DI 18 basic, Yellow Line by IKA, Belgium) a následovala ultrasonikace po dobu 5 minut (Hielscher UP 400S, Germany). Z emulze bylo následně odstraněno za sníženého tlaku organické rozpouštědlo a vzorky byly promyty 2x 20 ml destilované vody. Následovala lyofilizace vzorků a měření na UV/VIS spektrofotometru (UNICAM UV 500, Thermo-Spectronic, USA) při dané vlnové délce (Tab. 3), za účelem zjištění množství enkapsulované látky.

7.2.3 Příprava směsí částic PEG-PLA s PLA

Při přípravě směsí částic PEG-PLA II. s PLA byla využita opět metoda emulgace s odpařením rozpouštědla, ale tentokrát s využitím polyvinylalkoholu (PVA) jako stabilizátoru emulze. V daném množství organického rozpouštědla (1 ml CHCl_3) bylo rozpuštěno 20 mg biologicky aktivní látky a celkem 0,1 g směsi polymeru, s různým obsahem PLA (25%, 50%, 75% a 100%). Celý objem vzniklé organické fáze byl vnesen do 10 ml 0,5% roztoku PVA. Následovalo nepřetržité míchání pomocí homogenizéru (homogenizer DI 18 basic, Yellow Line by IKA, Belgium) po dobu 5 minut a poté ultrasonikace po dobu 5 minut (Hielscher UP 400S, Germany). Poté bylo za sníženého tlaku odstraněno organické rozpouštědlo a byla změřena velikost a distribuce velikosti připravených částic pomocí Z-sizeru (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, USA). Změřené částice byly promyty, aby došlo k odstranění přebytečné biologicky aktivní látky, kterou se nepodařilo uzavřít do

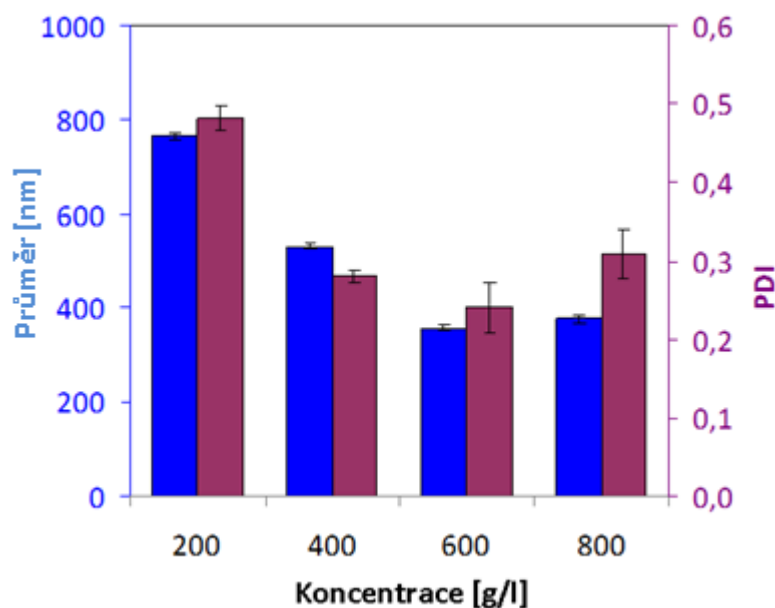
připravených částic. Takto upravené vzorky byly vymrazeny. Pro zjištění množství enkapsulované bioaktivní látky byla u vzorků měřena absorbance při vlnové délce odpovídající λ_{\max} pro každou bioaktivní látku (Tab. 3) a to takto: 2,5 mg vymraženého vzorku bylo rozpuštěno v 5 ml CHCl_3 a poté byla měřena absorbance (UNICAM UV 500, Thermo-Spectronic, USA) proti roztoku směsi polymeru použité pro přípravu částic.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Vliv formulačních a procesních parametrů přípravy na velikost částic

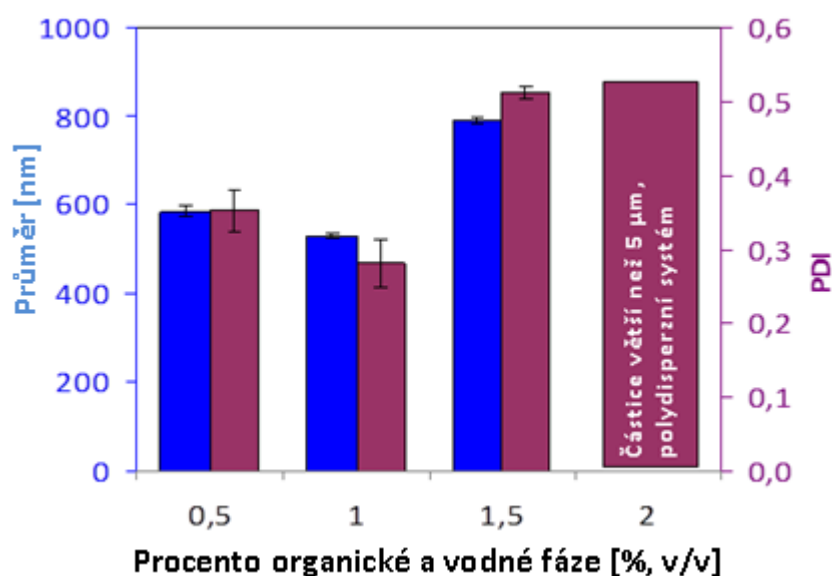
Pomocí změn jednotlivých procesních parametrů byl testován vliv podmínek přípravy částic na jejich velikost.

V prvním případě byl sledován vliv koncentrace kopolymeru na velikost částic (Obr. 11). Vzorky sloužící jako zdroj dat pro sledování tohoto procesního parametru měli následující charakteristiku: 100 μl organické fáze, 15 minut míchání, 5 minut sonifikace, při amplitudě 100%. Jak je možno vidět při vyšších koncentracích kopolymeru bylo dosaženo tvorby menších částic s relativně úzkou distribucí velikosti. Naopak, při nižších koncentracích než je 200 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ docházelo ke srážení kopolymeru během procesu a částic nebylo dosaženo vůbec. Toto mohlo být pravděpodobně způsobeno nedostatečným množstvím kopolymeru, který zároveň slouží v procesu jako stabilizátor emulze. V případě jeho nedostatečného množství není možné vytvořit dostatečně jemnou nebo stabilní emulzi což se projevuje vytvořením větších částic respektive dokonce jejich vysrážením do velkých shluků.



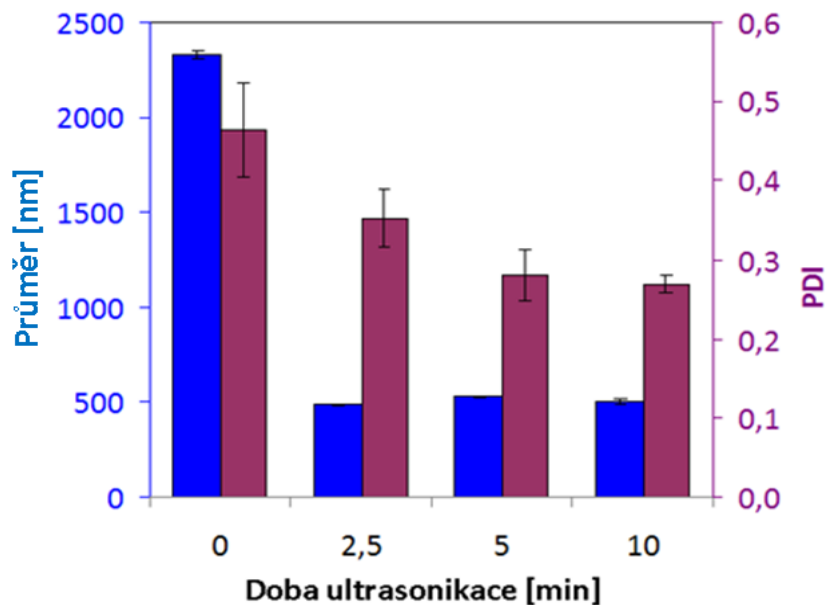
Obr. 11 Vliv koncentrace polymeru na velikost a distribuci částic

Dále byl testován vliv poměru organické a vodné fáze (Obr. 12) na velikost částic pro vzorky $400 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLA-PEG I, 15 min. míchání, 5 min. ultrasonikace s amplitudou 100 %. V případě nižšího poměru bylo rovněž dosaženo částic menších rozměrů s úzkou distribucí velikosti. V případě vzorku obsahujícího 2 % organické fáze došlo ke vzniku vysoce polydisperzního systému a velikostí částic větší než $5 \mu\text{m}$. Tento jev může souviset s nedostatečnou energií dodanou do systému mícháním a ultrasonikací v případě většího množství organické fáze a tedy i kopolymeru, aby došlo k tvorbě dostatečně jemné emulze a tím ke získání dostatečně malých částic.

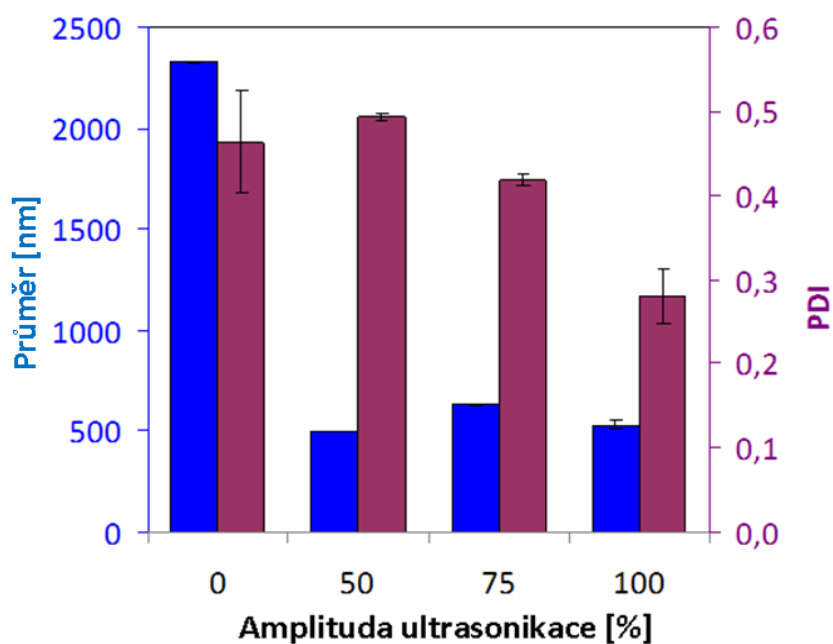


Obr. 12 Vliv poměru organická fáze/voda na velikost a distribuci částic

Nakonec byl studován vliv doby (Obr. 13) a amplitudy ultrazvuku (Obr. 14) na velikost připravovaných částic. Vzorky $400 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PLA-PEG I, $100 \mu\text{l}$ organické fáze, 15 min. míchání ukázaly, že použitím ultrazvuku dochází k významnému snížení velikosti částic, a proto je právě ultrasonikace vysoce významným procesním parametrem přípravy částic. S prodlužující se dobou ultrasonikace se velikost částic již dále významně neměnila.



Obr. 13 Vliv doby ultrasonikace na velikost a distribuci velikosti částic



Obr. 14 Vliv velikosti amplitudy ultrasonikace na velikost a distribuci velikosti částic

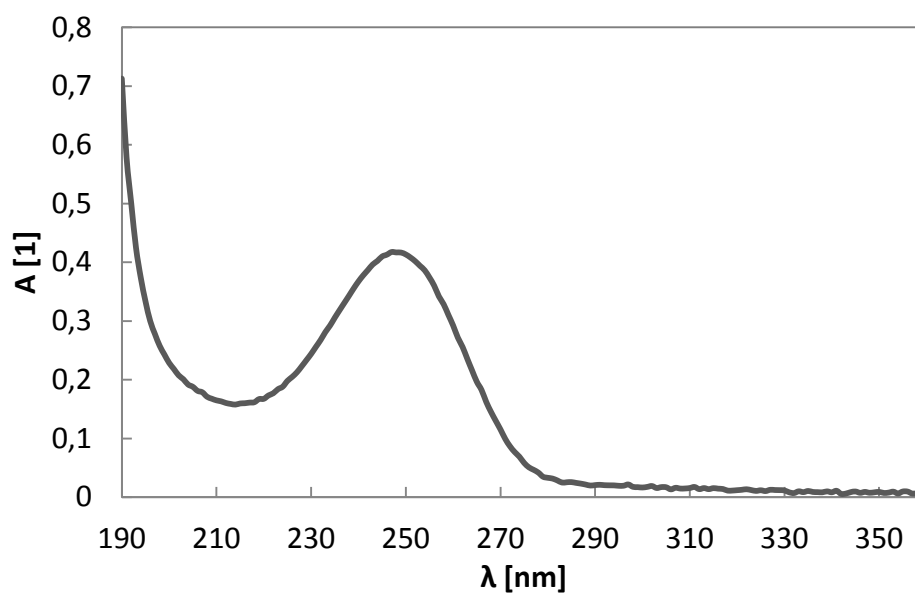
Na základě získaných výsledků můžeme říci, že částice z kopolymerního PLA-PEG je možné připravit bez použití povrchově aktivní látky jako stabilizátoru emulzního systému. Touto metodou přípravy lze získat částice dostatečně malých rozměrů pro použití v medicíně. Vyšší koncentrací polymeru byly získány menší částice s úzkou distribucí velikosti. Menší rozměry připravených částic byly pozorovány také při použití nižšího pomě-

ru organické a vodné fáze. Ukázalo se, že použití ultrasonikace při výrobě částic je v případě potřeby částic menších rozměrů neodmyslitelnou součástí procesu, která významně ovlivňuje právě výslednou velikost připravovaných částic.

8.2 Stanovení účinnosti enkapsulace vybraných bioaktivních látek

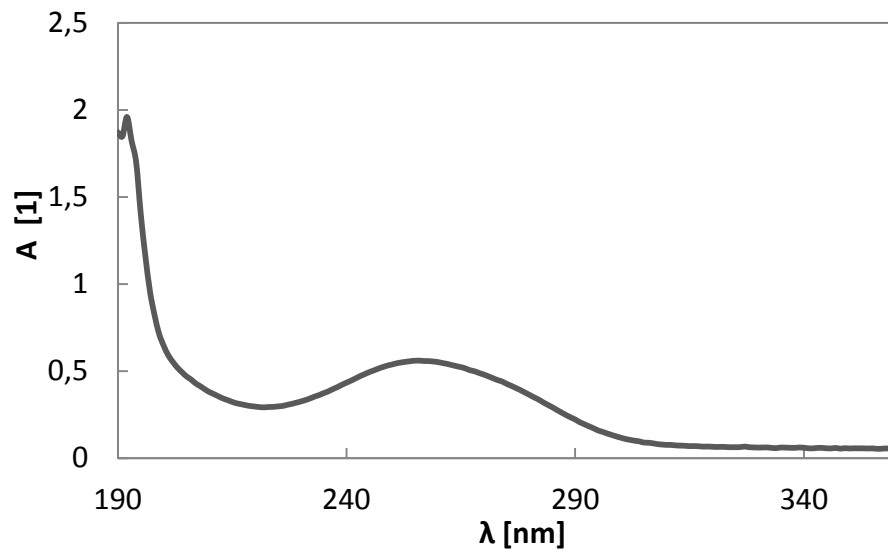
Při stanovení účinnosti enkapsulace bylo využito biologicky aktivních látek steroidního charakteru s různou polaritou (Tab. 3) a byl sledován vliv polarity enkapsulované látky na účinnost její enkapsulace.

Pro zjištění enkapsulovaného množství jednotlivých biologicky aktivních látek v přípravných částicích pomocí UV/VIS spektrofotometru bylo nutné zjistit maxima absorbance jednotlivých látek. Za tímto účelem byla proměřena UV spektra jednotlivých látek rozpuštěných ve vodě.



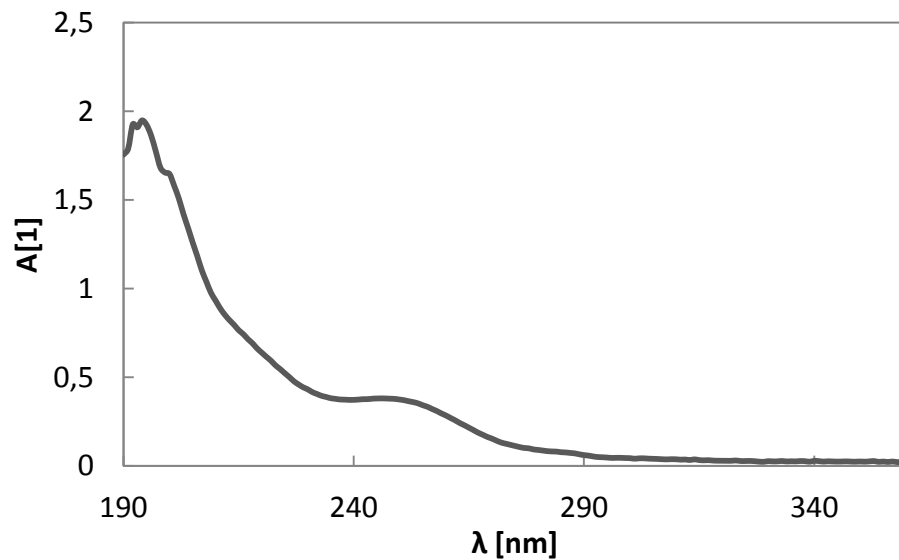
Obr. 15 Absorbční spektrum pro roztok hydrocortisonu ve vodě

V případě hydrocortisonu bylo měřeno spektrum roztoku této látky ve vodě. Koncentrace měřeného roztoku byla 7,2 mg/ml. Tento roztok vykazoval absorpční maximum při vlnové délce 250 nm. Proti hodnotě, kterou uvádí výrobce této biologicky aktivní látky, se hodnota maxima absorbance liší od 8 nm, což mohlo být způsobeno použitím jiného rozpouštědla.



Obr. 16 Absorbční spektrum cortisonu 21-acetát ve vodě

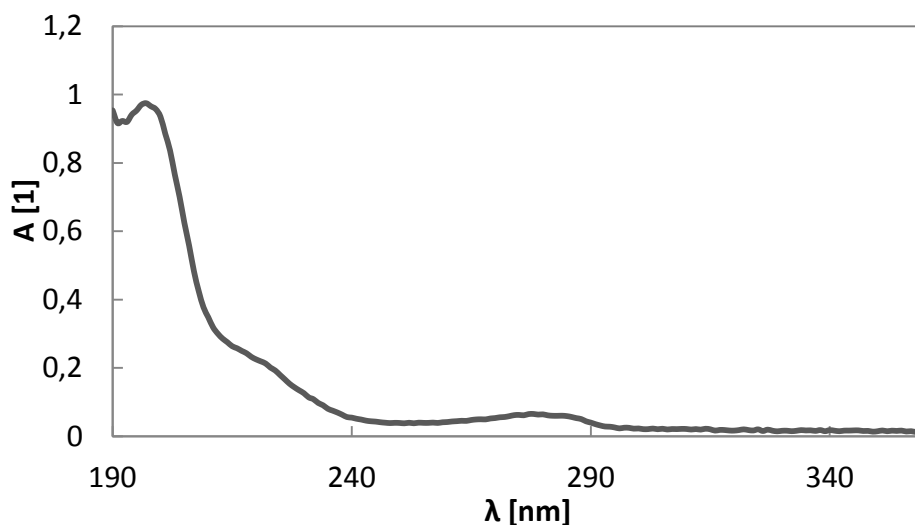
Druhou použitou biologicky aktivní látkou byl cortison 21-acetát. Koncentrace cortisonu 21-acetát v měřeném vzorku byla 7,2 mg/ml. Na základě naměřených hodnot bylo sestrojeno absorbční spektrum (Obr. 17), které vykazovalo maximum při vlnové délce 260 nm (λ_{\max}).



Obr. 17 Absorbční spektrum pro roztok progesteronu ve vodě

U progesteronu bylo měřeno absorbční spektrum roztoku ve vodě o koncentraci 7,2 mg/ml. Výrobce látky uvádí absorbční maximum této látky při vlnové délce 240 nm, podle Obr. 17

je námi naměřené maximum posunuto o zhruba 8 nm oproti tomuto údaji. Také v tomto případě mohla být odchylka způsobena použitím jiného rozpouštědla.



Obr. 18 Absorbční spektrum roztoku β -estradiolu ve vodě

Během měření absorbčního spektra β -estradiolu byla jeho koncentrace v měřeném roztoku 7,2 mg/ml, stejně jako u předchozích látek. Jak můžeme vidět na Obr. 18, maximum, které není příliš výrazné, se nachází při 280 nm vlnové délky. Tato hodnota se shoduje s hodnotou uváděnou výrobcem. Nízká hodnota absorbance při této vlnové délce může být ovlivněna nízkou rozpustností estradiolu ve vodě.

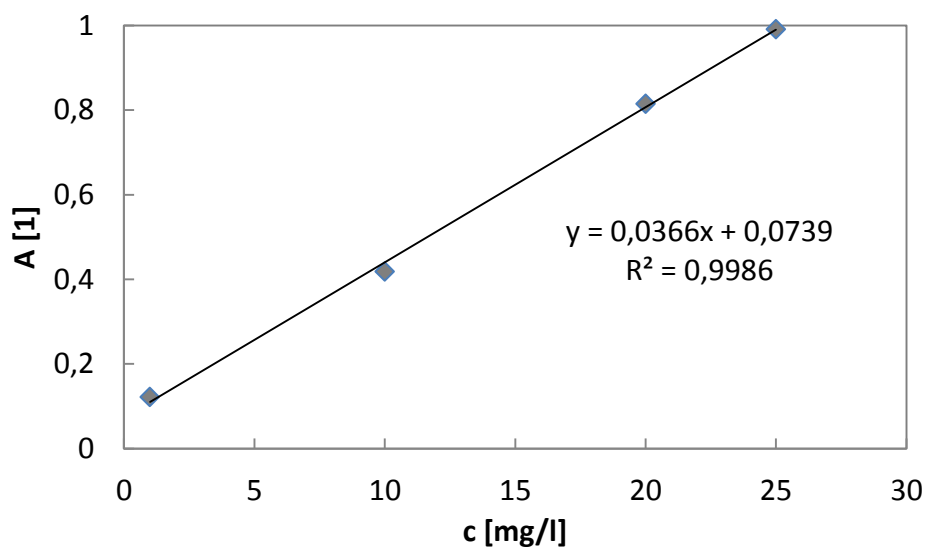
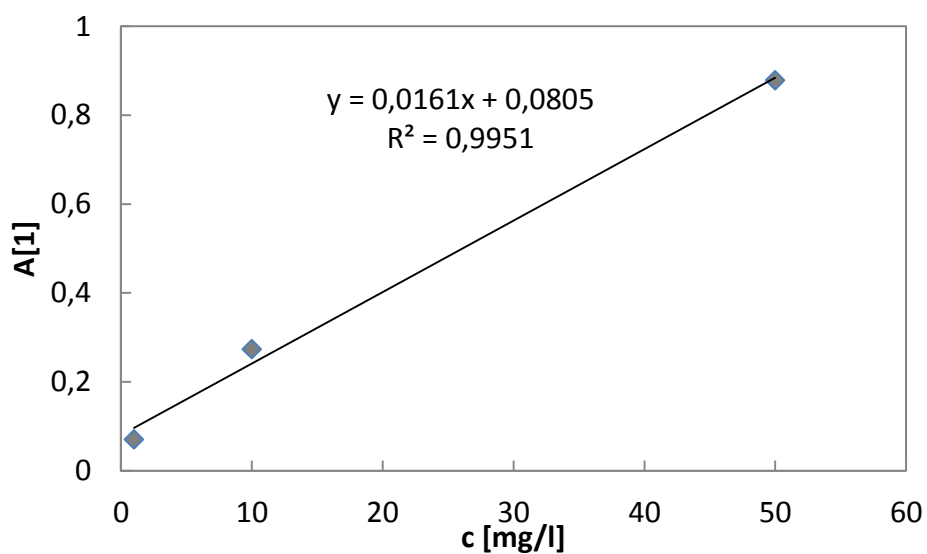
Tab. 3 Hodnoty rozpustností ve vodě a absorbční maxima použitých bioaktivních látek udávané výrobcem

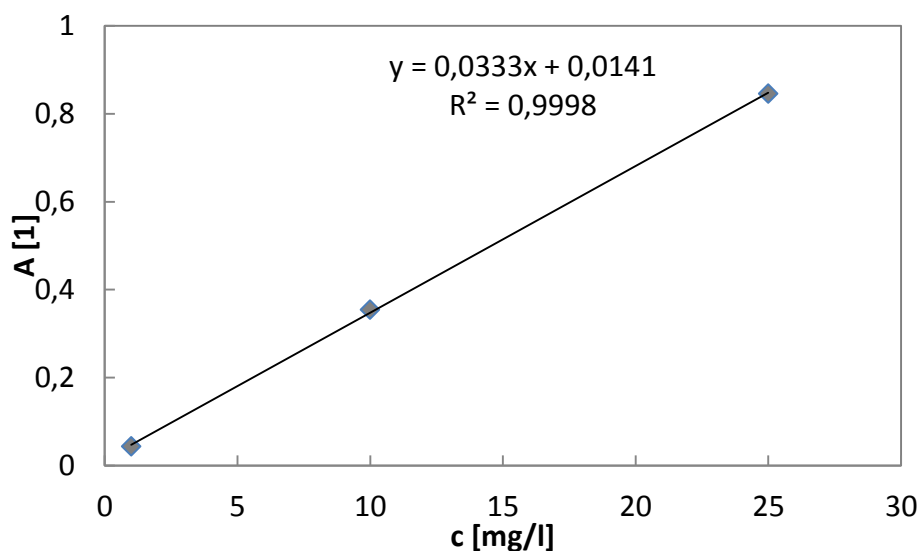
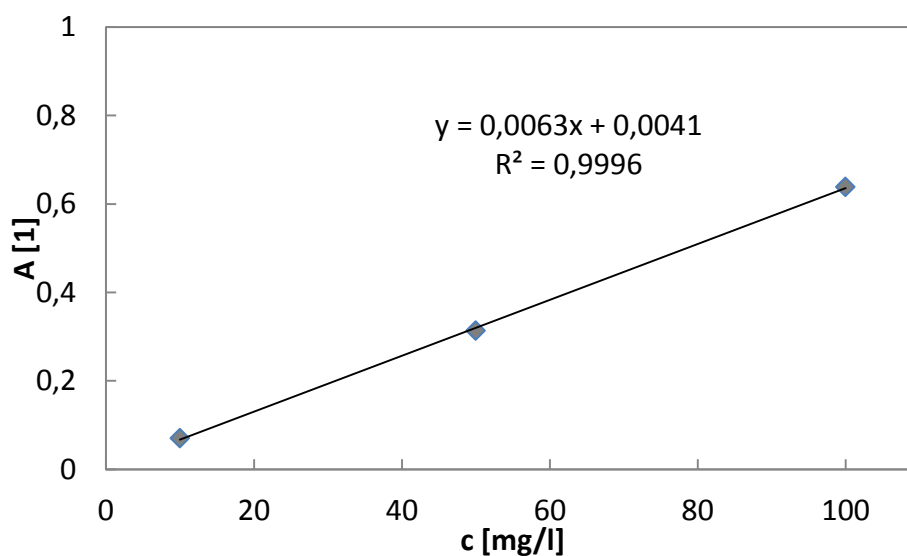
Bioaktivní látka	Rozpustnost v H ₂ O [mg/l]	λ_{\max} [nm]
Hydrocortison	320 (při 25°C)	242
Cortison 21-acetát	27,8 (při 25°C)	240
Progesteron	8,81 (při 25°C)	240
Estradiol	3,9 (při 27°C)	280

Ke stanovení koncentrace příslušné biologicky aktivní látky bylo zapotřebí sestavit kalibrační závislosti roztoků těchto látek. Pro sestavení požadovaných kalibračních přímků byly připraveny kalibrační roztoky biologicky aktivní látky v organickém rozpouštědle, které bylo použito při přípravě částic, aby nedocházelo ke zkreslení výsledných údajů o enkapsulovaném množství dané látky v částicích.

Tab. 4 Absorbance jednotlivých kalibračních roztoků použitých bioaktivních látek

Hydrocortison		Cortison 21-acetát		Progesteron		β- Estradiol	
c [mg/ml]	A [1]	c [mg/ml]	A [1]	c [mg/ml]	A [1]	c [mg/ml]	A [1]
1	0,1221	1	0,0704	1	0,0434	10	0,0707
10	0,4188	10	0,2733	10	0,3539	50	0,3136
20	0,815	50	0,8783	25	0,8451	100	0,6383
25	0,9909						

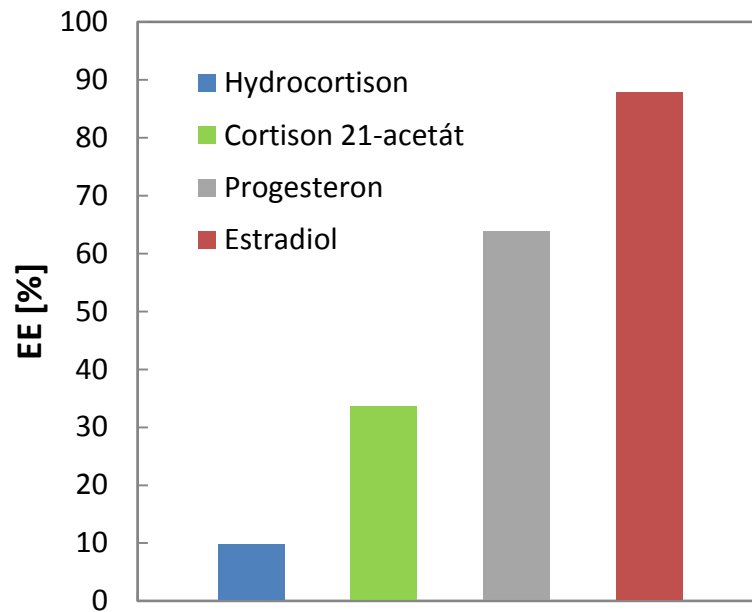
Obr. 19 Kalibrační závislost pro hydrocortison ($\lambda_{\max} = 242 \text{ nm}$)Obr. 20 Kalibrační závislost cortisonu 21-acetát ($\lambda_{\max} = 240 \text{ nm}$)

Obr. 21 Kalibrační závislost pro progesteron ($\lambda_{max} = 240 \text{ nm}$)Obr. 22 Kalibrační závislost pro estradiol ($\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$)

8.2.1 Enkapsulace steroidních látek do částic PEG-PLA II

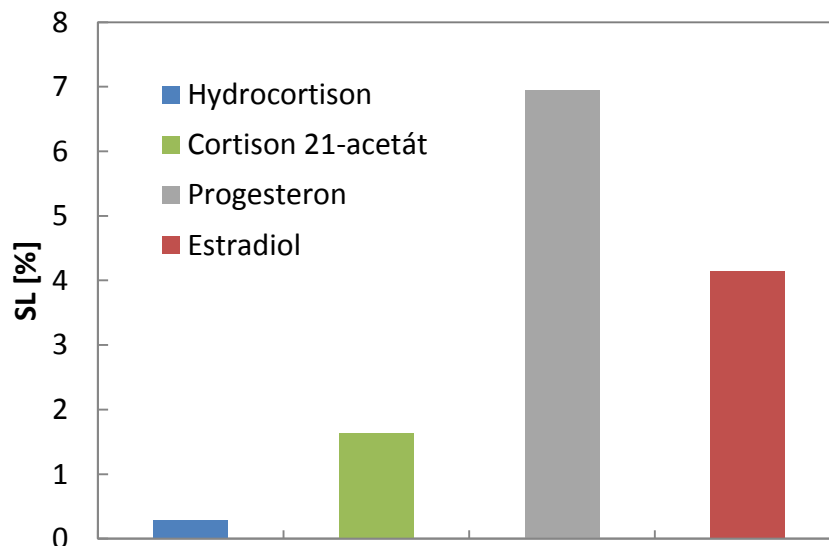
Nejprve byl sledován vliv polaritý daných bioaktivních látek na jejich účinnost enkapsulace do částic PEG-PLA II (Obr. 23). Částice použité pro enkapsulaci byly v tomto případě připraveny bez použití stabilizátoru emulze. Obsah biologicky aktivní látky ve vzorku byl následně vypočten z příslušné kalibrační křivky (Obr. 19 -Obr. 22). Na základě naměřených dat můžeme, vzhledem k polaritám látek uváděných výrobcem (Tab. 3), říci, že

s klesající hodnotou rozpustnosti daných látek ve vodě roste účinnost jejich enkapsulace (Obr. 23).



Obr. 23 Graf závislosti účinnosti enkapsulace na polaritě enkapsulované látky

Skutečné enkapsulované množství jednotlivých látek však bylo malé, jak znázorňuje Obr. 24, což mohlo být ovlivněno právě způsobem přípravy částic.



Obr. 24 Množství enkapsulované látky (SL) v částicích PEG-PLA I.

Částice PEG-PLA připravené bez použití stabilizátoru jsou podle výsledků této části práce schopny enkapsulovat látky steroidní povahy s různou polaritou, avšak enkapsulované množství látky je malé (Obr. 24).

8.2.2 Enkapsulace steroidních látek do směsí částic PLA a PEG-PLA

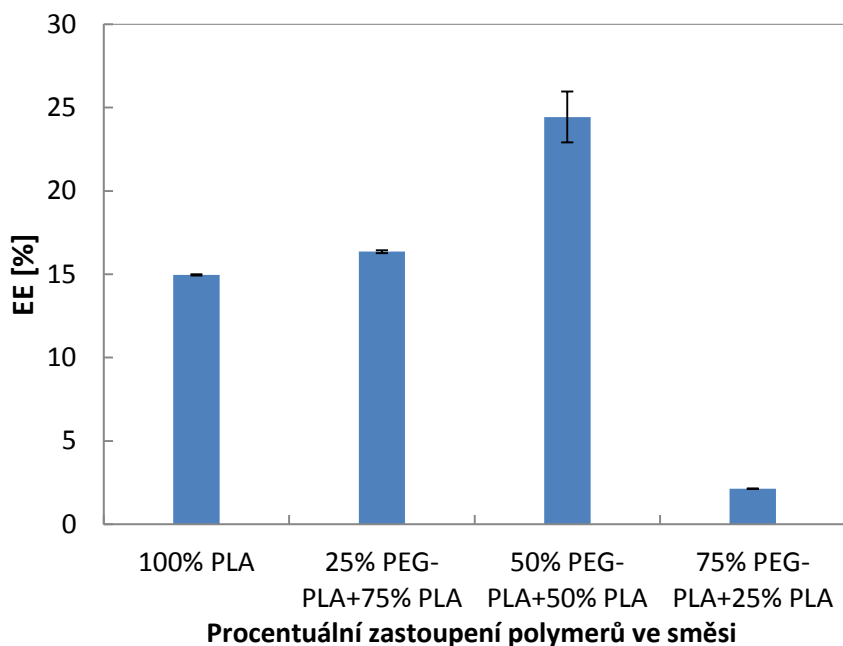
Pro možnost případného testování kontrolovaného uvolňování enkapsulovaných látek z částic je potřeba dosáhnout vyššího obsahu daných látek enkapsulovaných v částicích. Bioaktivní látky byly tedy enkapsulovány do směsi částic z PLA a PEG-PLA II s použitím 0,5% roztoku PVA jako stabilizátoru emulze. Obsah PLA ve směsích byl 25, 50, 75 a 100%.

Tab. 5 Hodnoty velikostí částic a distribuce velikosti pro částice ze směsí polymerů, měřeno pomocí Z-sizeru

	Hydrocortison		Cortison 21-acetát		Progesteron		Estradiol	
	d (nm)	PDI	d (nm)	PDI	d (nm)	PDI	d (nm)	PDI
100% PLA	623,7	0,407	1005,0	0,810	606,2	0,430	569,0	0,465
	642,6	0,425	942,1	0,648	578,7	0,468	576,7	0,554
	673,8	0,423	896,1	0,795	604,1	0,428	585,5	0,453
75% PLA + 25% PEG-PLA	624,4	0,410	1419,0	0,581	525,0	0,527	451,6	0,486
	626,8	0,450	1136,0	0,707	484,4	0,604	444,6	0,462
	645,9	0,423	1113,0	0,825	518,2	0,437	435,4	0,458
50% PLA + 50% PEG-PLA	594,2	0,699	826,5	0,903	578,1	0,498	700,7	0,774
	564,7	0,634	818,1	0,890	560,2	0,672	800,1	0,548
	584,5	0,734	729,0	0,789	578,8	0,709	795,2	0,534
25% PLA+75% PEG-PLA	739,6	0,764	819,7	0,770	688,1	0,548	700,3	0,689
	806,6	0,561	1040,0	0,747	695,4	0,574	680,5	0,586
	731,6	0,754	824,8	0,808	656,3	0,778	707,9	0,577

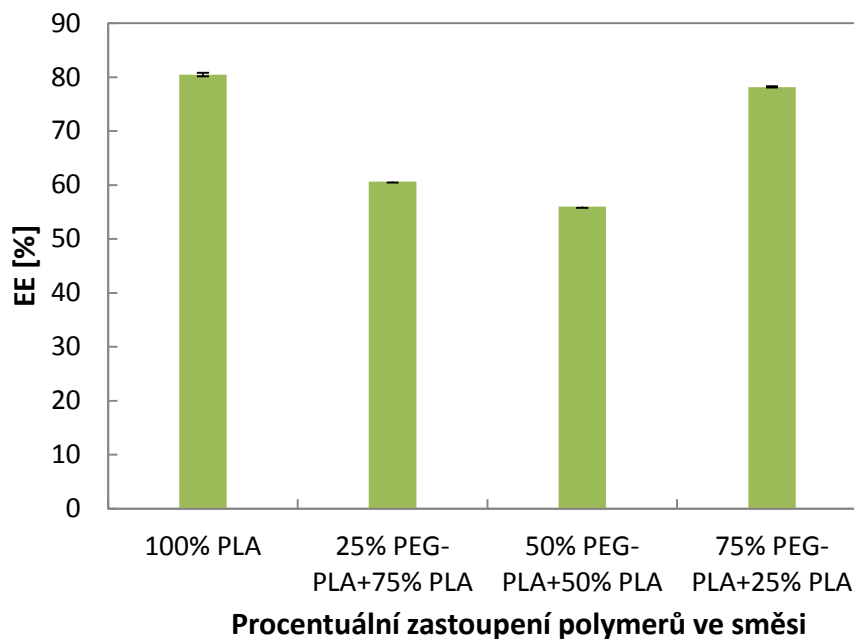
První z řady enkapsulovaných biologicky aktivních látek byl hydrocortison. Vzhledem k jeho dobré rozpustnosti ve vodě (viz. Tab. 3) byly vzorky obsahující tuto steroidní látku promývány před vymražením pouze 2x 20 ml destilované vody. Toto stačilo pro odstranění přebytečného hydrocortisonu, který se neenkapsuloval do připravených částic. Účinnost enkapsulace pro jednotlivé procentuální obsahy polymerů znázorňuje Obr. 25. Můžeme vidět, že vzhledem k nepolárnímu charakteru PLA nabývá účinnost enkapsulace poměrně nízkých hodnot. Se zvyšujícím se obsahem PEG-PLA II ve směsi účinnost enkapsulace roste, ovšem v případě, kdy ve směsi převažují částice PEG-PLA II účinnost enkapsulace

klesla po 5%. Příčina tohoto poklesu účinnosti enkapsulace (EE) nám není známa a mohla by být předmětem dalšího studia.



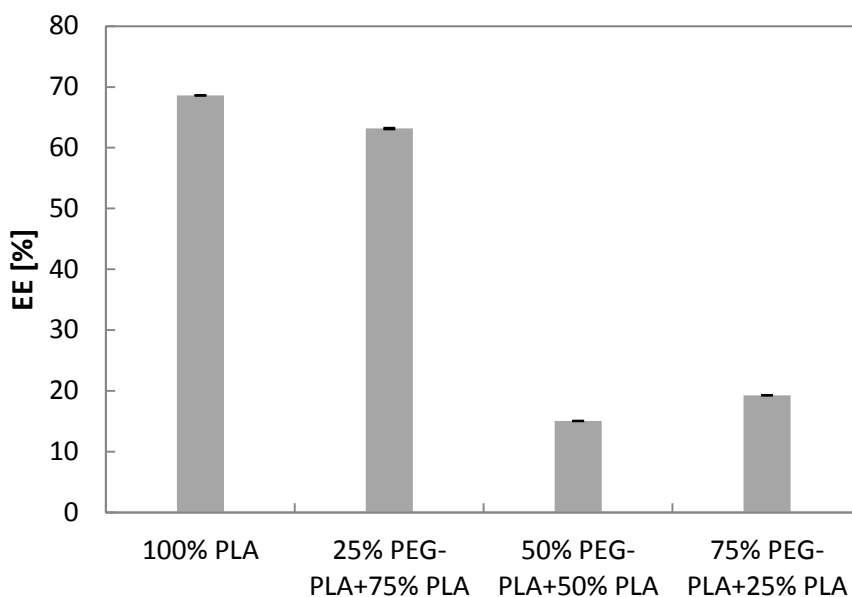
Obr. 25 Závislost účinnosti enkapsulace hydrocortisonu na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi

V případě druhém, byl enkapsulovanou látkou cortison 21-acetát. V tomto případě bylo dosaženo podstatně vyšších hodnot EE (Obr. 26), ale je potřeba upozornit na to, že připravené částice byly větších rozměrů a připravené systémy byly vysoce polydisperzního charakteru (Tab. 5). Bylo by tedy vhodné důkladněji prostudovat vlastnosti této biologicky aktivní látky, jestli nevykazuje například povrchovou aktivitu a zjistit tak, proč se nepodařilo připravit částice požadovaných alespoň submikro-rozměrů.



Obr. 26 Závislost účinnosti enkapsulace cortisonu 21-acetát na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi

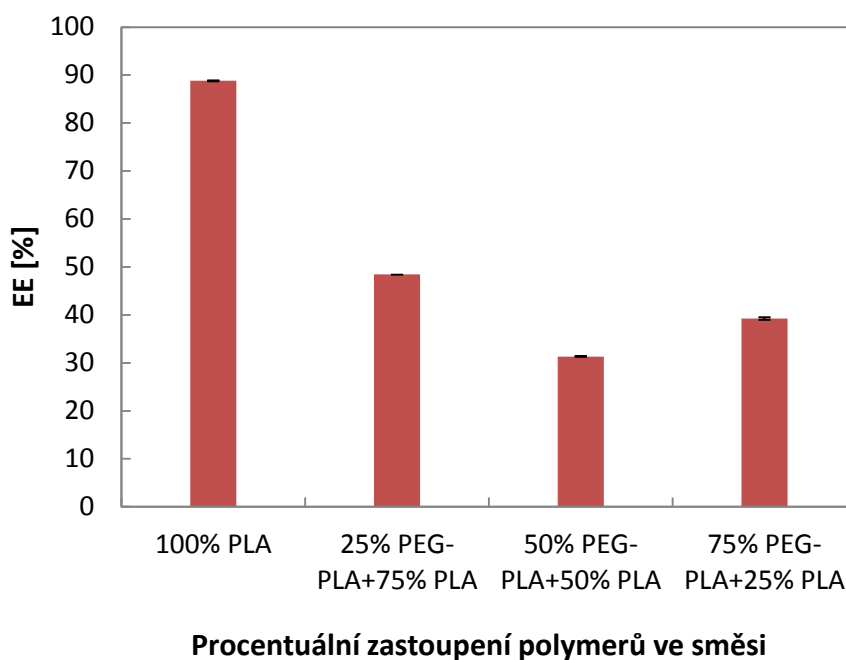
Třetí látkou použitou k enkapsulaci do připravených částic ze směsí polymerů PLA s PEG-PLA II byl progesteron. Velikost připravených částic se pohybovala kolem 600 nm a index polydisperzity (PDI) kolem hodnoty 0,5 (Tab. 5). Příčinou poklesu EE s rostoucím obsahem PEG-PLA II ve směsi může být polárnější charakter PEG-PLA oproti částicím PLA, které jsou nepolární a jsou tedy vhodnější pro enkapsulaci méně polárních látek (Obr. 27).



Procentuální zastoupení polymerů ve směsi

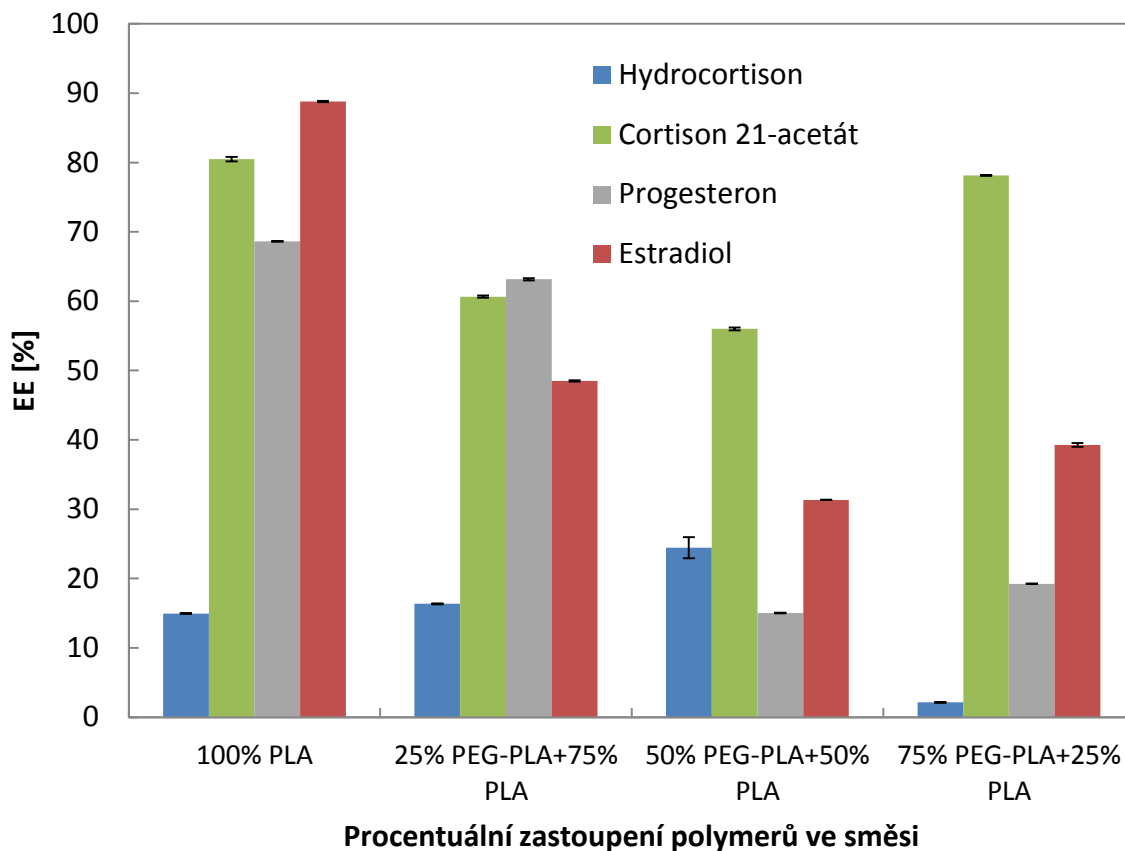
Obr. 27 Závislost účinnosti enkapsulace progesteronu na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi

Nejméně polární látkou použitou pro enkapsulaci v této práci byl β -estradiol (Estradiol). Postup přípravy částic byl totožný s předchozími biologicky aktivními látkami uvedenými v této práci. Suspenze částic před vymražením byla promyta 2x 20 ml destilované vody a následně pak ještě 2x 30 ml 30% CH_3OH , aby došlo k rozpuštění a vymytí neenkapsulované látky. S rostoucím obsahem PEG-PLA II ve směsi klesala účinnost enkapsulace této látky (Obr. 28), což bylo opět způsobeno vlivem polaritě enkapsulované látky a také polymerní matrice.



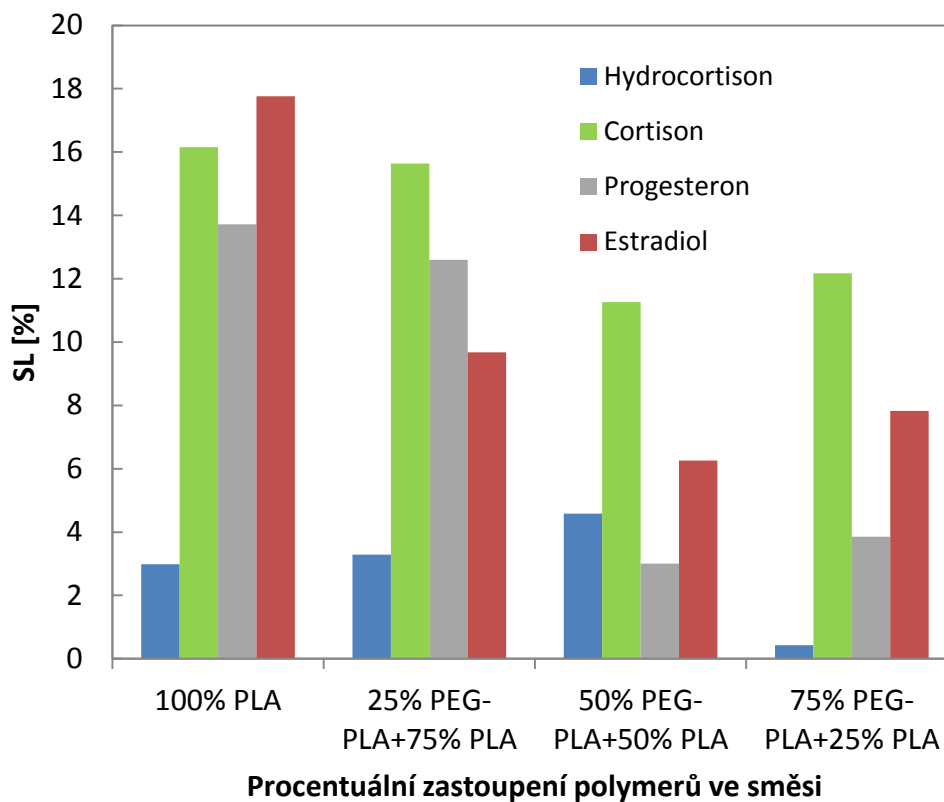
Obr. 28 Závislost účinnosti enkapsulace estradiolu na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi

Srovnáme-li účinnost enkapsulace všech čtyř látek (Obr. 29), můžeme říci, že s klesajícím obsahem PLA ve směsi klesá účinnost enkapsulace, výjimkou je enkapsulace Hydrocortisonu, tedy nejvíce polární látky použité pro enkapsulaci, kdy dochází ke zvyšování účinnosti enkapsulace s klesajícím obsahem částic PLA ve směsi. Anomální hodnoty v této řadě látek s různou polaritou vykazuje cortison 21-acetát u kterého se nám nepodařilo připravit částice s úzkou distribucí velikosti, ani částice dostatečně malých rozměrů.



Obr. 29 Souhrnný graf závislosti EE na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi

Na základě výsledných hodnot znázorněných graficky na Obr. 29 můžeme říci, že částice PLA jsou vhodnější pro enkapsulaci méně polárních látek a zároveň tedy můžeme potvrdit polární charakter PEG řetězce, který zabudováním do kopolymeru s PLA zvyšuje možnost enkapsulace látek s vyšší polaritou.



Obr. 30 Závislost množství enkapsulované látky (SL) na poměru polymerů ve směsi

Zaměříme-li se na množství látek uzavřené v částicích, vidíme (Obr. 30) že použitím stabilizátoru emulze, kterým byl roztok PVA, došlo ke zvýšení enkapsulovaného množství v porovnání s částicemi, které byly připraveny bez použití stabilizátoru (Obr. 24), což je vhodné pro případné další studium, například kontrolovaného uvolňování biologicky aktivních látek z takovýchto částic.

ZÁVĚR

Existuje celá řada polymerních materiálů, které jsou vhodné pro využití ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče léčiv. Námi studované polymerní částice PEG-PLA jsou obecně vhodnými matricovými systémy a to vzhledem k amfifilní povaze blokového kopolymery PEG-PLA. Díky PEG přítomnému v tomto kopolymery se částice PEG-PLA stávají odolnými proti detekci imunitním systémem a může tedy docházet k tzv. cílenému terapeutickému účinku léčiva obsaženého v těchto matricových systémech. Tímto je snižována dávka léčiva potřebná k dosažení požadovaného účinku a mohou být také omezeny nežádoucí účinky aktivní složky léku. Částice tohoto charakteru jsou schopny kontrolovaného uvolňování látek v nich obsažených, což má také velký význam, ať už ve farmaceutickém průmyslu, pokud jsou enkapsulovány léčivé látky, nebo třeba v zemědělství, kde díky této vlastnosti může docházet k dlouhodobějšímu účinku např. herbicidních látek.

Stejně jako je celá řada materiálů vhodných pro toto využití, existují taktéž rozmanité způsoby přípravy těchto matricových systémů, které jsou krátce rozebrány v teoretické části této práce.

Praktická část se v prvním kroku věnuje přípravě částic PEG-PLA metodou emulgace s odpařením rozpouštědla bez použití stabilizátoru emulze a optimalizaci přípravného procesu sledováním vlivu změn procesních a formulačních parametrů na velikost připravených částic a distribuci jejich velikosti. Na základě získaných výsledků můžeme říci, že částice z kopolymerního materiálu PEG-PLA I. je možné připravit bez použití povrchově aktivní látky jako stabilizátoru emulzního systému. Touto metodou přípravy lze získat částice dostatečně malých rozměrů pro použití v medicíně. Zvýšením koncentrace polymeru byly získány menší částice s úzkou distribucí velikosti. Menší rozměry připravených částic byly pozorovány také při použití nižšího poměru organické a vodné fáze. Ukázalo se, že významným krokem přípravného procesu metodou emulgace s odpařením rozpouštědla je použití ultrasonikace, která významně ovlivňuje výslednou velikost připravovaných částic.

Dále byla studována schopnost enkapsulace vybraných biologicky aktivních látek s různou polaritou (hydrocortison, cortison 21-acetát, progesteron a β -estradiol) právě do připravených submikro-částic bez použití stabilizátoru emulze, kde jsme na základě naměřených dat dospěli k závěru, že účinnost enkapsulace dané bioaktivní látky se zvyšuje s klesající polaritou této enkapsulované látky. V tomto případě však bylo skutečné enkapsulované

množství v částicích velmi malé, což by nebylo vyhovující pro případné sledování kontrolovaného uvolňování biologicky aktivních látek z těchto kopolymerních částic.

Za účelem zvýšení množství enkapsulované látky bylo v poslední části práce využito k přípravě částic směsí PLA a PEG-PLA II s předpokladem, že obsah PLA v systému by měl zvýšit množství enkapsulované látky. Tento předpoklad byl splněn pro progesteron a β -estradiol, které jsou ve vodě málo rozpustné. U hydrocortisonu došlo k opačnému ovlivnění, tzn., že s rostoucím obsahem částic PLA ve směsi klesala účinnost jeho enkapsulace, což je v souladu s vyšší hydrofilitou této látky. Cortison 21-acetát vykazoval z neznámých důvodů ve všech krocích přípravy anomální chování. Nepodařilo se připravit částice dostatečně malých rozměrů a připravené systémy částic byly vysoce polydisperzního charakteru.

Při přípravě částic pomocí metody emulgace s odpařením rozpouštědla s použitím surfaktantu jako stabilizátoru emulze se podařilo dosáhnout vyššího enkapsulovaného množství daných biologicky aktivních látek. S rostoucím obsahem PLA částic ve směsi ve většině případů vzrůstala i účinnost enkapsulace steroidních látek s výjimkou hydrocortisonu jakožto nejvíce polární látky použité pro enkapsulaci do částic PEG-PLA v rámci této práce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] STLOUKAL, P. et al. Low Molecular Weight Poly(lactid acid) Microparticles for Controlled Release of Herbicide Metazachlor: Preparation, Morphology, and Release Kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, vol. 60, no.16, s. 4111 – 4119. ISSN: 0021-8561
- [2] LI, Y. et al. PEG-PLA Diblock Copolymer Micelle-like Nanoparticles as All-trans-retinoic Acid Carrier: InA Vitro and InA Vivo Characterizations. *Nanotechnology*. 2009, vol. 20, no. 555106. ISSN:0957-4484
- [3] VAUTHIER, Ch., BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 2009, vol. 26, no. 5 s. 1025-1058. ISSN:0724-8741
- [4] XIAO, R. et al. Recent Advances in PEG-PLA Block Copolymer Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2010, Vol. 5, s. 1057-1065 . ISSN:1176-9114
- [5] MARTINHO, N.; DAMGÉ, Ch.; REIS, C. P. Recent Advances in Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2011, vol. 2 s. 510-526. ISSN:2158-7027
- [6] PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2006, vol. 2, no. 1, s. 8-21. ISSN:1549-9634
- [7] VYSLOUŽIL, J. et al. Příprava léčivých mikročastic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*, 2013, vol. 107, no. 1, s. 16-23. ISSN: 0009-2770
- [8] AMRITKAR, A. S. et al. Nanotechnology for Biomedical Application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2011, vol. 8, no. 2, s. 45-53. ISSN:0976-044X
- [9] de FARIA, T. J.; de CAMPOS, A. M.; SENNA, E. L. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide) (PLA) and poly(D,L-lactide)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) nanocapsules containing antitumoral agent methotrexate. *Macromolecular symposia*. 2005, vol. 229, no.1, s. 228-233. ISSN:1022-1360

- [10] ZHANG, H. et al. High Intensity Focused Ultrasound-responsive Release Behavior of PLA-b-PEG Copolymer Micelles. *Journal of Controlled Release*. 2009, vol. 139, no. 1 s. 31-39. ISSN:0168-3659
- [11] TAMBOLI, V.; MISHRA, G. P.; MITRA, A. K. Novel Pentablock Copolymer (PLA-PCL-PEG-PCL-PLA)-based Nanoparticles for Controlled Drug Delivery: Effect of Copolymer Composition on the Crystallinity of Copolymers and in Vitro Drug Release Profile from Nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*. 2012, s. 1-11. ISSN:0303-402X
- [12] ZOU, W. et al. Preparation and Characterization of Cationic PLA-PEG Nanoparticles for Delivery of Plasmid DNA. *Nanoscale Research Letters*. 2009, vol. 4, no. 9 s. 982-992. ISSN:1931-7573
- [13] WISCHKE, CH., SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, vol. 364, no. 2, s. 298-327. ISSN: 0378-5173
- [14] ADAMI, R. et al. PLA-PEG Copolymers Micronization by Supercritical Assisted Atomization. *Journal of Supercritical Fluids*. 2012, vol. 72, s. 15-21. ISSN:0896-8446.
- [15] PARK, S.-J.; KIM, S.-H. Preparation and Characterization of Biodegradable Poly(l-lactide)/poly(ethylene Glycol) Microcapsules Containing Erythromycin by Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, vol. 271, no. 2, s. 336-341. ISSN:0021-9797
- [16] QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. A Mechanistic Study of the Formation of Polymer Nanoparticles by the Emulsification-diffusion Technique. *Colloid and Polymer Science*. 1997, vol. 275, no. 7, s. 640-647. ISSN:0303-402X
- [17] MOINARD-CHÉCOT, D. et al. Mechanism of Nanocapsules Formation by the Emulsion-diffusion Process. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008, vol. 317, no. 2, s. 458-468. ISSN:0021-9797
- [18] PINTO REIS, C. et al. Polyelectrolyte Biomaterial Interactions Provide Nanoparticulate Carrier for Oral Insulin Delivery. *Drug Delivery, Informa Healthcare*. 2008, vol. 15, no. 2, s. 127-139. ISSN:1521-0464

- [19] BOUCHEMAL, K. et al. Polyamides Nanocapsules: Modeling and Wall Thickness Estimation. *AIChE Journal*. 2006, vol. 52, no. 6, s. 2161-2171. ISSN:0001-1541
- [20] BOUCHEMAL, K et al. Simultaneous Emulsification and Interfacial Polycondensation for the Preparation of Colloidal Suspensions of Nanocapsules.(Report). *Materials Science & Engineering C*. 2006, vol. 26, no. 2,3, s. 472-480. ISSN:0928-4931
- [21] FESSI, H.et. al Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989, vol. 55, no. 1.ISSN:0378-5173
- [22] LEGRAND, P. et al. Influence of Polymer Behaviour in Organic Solution on the Production of Polylactide Nanoparticles by Nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, vol. 344, no. 1-2 s. 33-43. ISSN:0378-5173
- [23] GREF, R. et al. New Self-assembled Nanogels Based on Host-guest Interactions: Characterization and Drug Loading. *Journal of Controlled Release*. 2006, vol. 111, no. 3 s. 316-324. ISSN:0168-3659
- [24] ESSA, S.; RABANEL, Jean M.; HILDGEN, P. Effect of Polyethylene Glycol (PEG) Chain Organization on the Physicochemical Properties of Poly(D, L-lactide) (PLA) Based Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*. 2010, vol. 75, no. 2, s. 96-106. ISSN:0939-6411
- [25] BEN-SHABAT, S.; KUMAR, N.; DOMB, A. J. PEG-PLA Block Copolymer as Potential Drug Carrier: Preparation and Characterization. *Macromolecular Bioscience* 2006, vol. 6, no. 12 s. 1019-1025. ISSN:1616-5187
- [26] DORATI, R. et al. Polyethylenglycol-co-poly-D,L-lactide Copolymer Based Microspheres: Preparation, Characterization and Delivery of a Model Protein. *Journal of Microencapsulation*. 2008, vol. 25, no. 5 s. 330-338. ISSN:0265-2048
- [27] SANT, S.; POULIN, S.; HILDGEN, P. Effect of Polymer Architecture on Surface Properties, Plasma Protein Adsorption, and Cellular Interactions of Pegylated Nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2008, vol. 87, no. 4, s. 885-895. ISSN:1552-4965

- [28] CHANDY, T. et al. Development of Polylactide Microspheres for Protein Encapsulation and Delivery. *Journal of Applied Polymer Science*. 2002, vol. 86, no. 5, s. 1285-1295. ISSN:0021-8995
- [29] YANG, Z. L. et al. Amphotericin B-loaded Poly(ethylene Glycol)-poly(lactide) Micelles: Preparation, Freeze-drying, and in Vitro Release. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2008, vol. 85A, no. 2 s. 539-546. ISSN:1549-3296
- [30] YANG, L. W. et al. Novel Biodegradable Polylactide/poly(ethylene Glycol) Micelles Prepared by Direct Dissolution Method for Controlled Delivery of Anticancer Drugs. *Pharmaceutical Research*. 2009, vol. 26, no. 10, s. 2332-2342. ISSN:0724-8741
- [31] WANG, B. et al. Novel PEG-graft-PLA Nanoparticles with the Potential for Encapsulation and Controlled Release of Hydrophobic and Hydrophilic Medications in Aqueous Medium. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, vol. 6 s. 1443-1451. ISSN:1176-9114
- [32] PEREZ QUINONES, J. et al. N-O6- partially Acetylated Chitosan Nanoparticles Hydrophobically-modified for Controlled Release of Steroids and Vitamin E. (Report). *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 91, no. 1143. ISSN:0144-8617
- [33] ZHANG. H. Y. et al. Synthesis and characterization of microparticles made of carboxymethylsuccinic-acid-modified PLA-PEG co-polymer. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*. 2008, vol. 19, no. 1, s. 99-111. ISSN: 0920-5063
- [34] BAKANDRITSOS, A. et al. Preparation, Stability and Cytocompatibility of Magnetic/PLA-PEG Hybrids. *Nanoscale*. 2010, vol. 2, no. 4, s. 564-572. ISSN:2040-3372
- [35] REN, J. et al. Preparation and Characterization of Fenofibrate-loaded PLA--PEG Microspheres.(Author Abstract). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online] August, 2007, vol. 18, no. 81481. ISSN:0957-4530

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EE	Účinnost enkapsulace
PCL	Polykaprolakton
PCL-PEG	Kopolymer polykaprolaktonu s poly(ethylen glykolem)
PEG	Poly(ethylen glykol)
PEG-PLA	Kopolymer kyseliny polymléčné s poly(ethylen glykolem)
PHB	Polyhydroxybutyrát
PICBA	Poly(isobutylkyanoakrylát)
PIHCA	Poly(isohexylkyanoakrylát)
PLA	Kyselina polymléčná
PLGA	Poly(laktid-glykolová kyselina)
PLGA-PEG	Kopolymer kyseliny poly-laktid glykolové s poly(ethylen glykolem)
PMMA	Polymethyl metakrylát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura nanokapslí [3].....	9
Obr. 2 Různé struktury nanosfér [3]	9
Obr. 3 Chemická struktura kyseliny polymléčné.....	12
Obr. 4 Chemická struktura poly (etylen glykolu)	12
Obr. 5 Schéma přípravy nanočástic metodou odpaření rozpouštědla. [7]	13
Obr. 6 Schéma postupu přípravy nanočástic metodou emulgace s difuzí rozpouštědla (1)Vodou částečně mísitelné rozpouštědlo nasycené vodou, (2)Voda nasycená rozpouštědlem, (3)Organická fáze, (4)Vodná fáze, (5)Emulgace,(6)Rozředění ve větším objemu vody. [3].....	15
Obr. 7 Schéma tvorby nanočástic samoshlukováním nanogelů [3].....	17
Obr. 8 Struktura blokového kopolymeru PEG-PLA [34]	20
Obr. 9 Schéma syntézy mPEG-PLA [4]	22
Obr. 10 Schéma syntézy kopolymerů acetalu PEG-PLA[4].....	23
Obr. 11 Vliv koncentrace polymeru na velikost a distribuci částic	32
Obr. 12 Vliv poměru organická fáze/voda na velikost a distribuci částic	33
Obr. 13 Vliv doby ultrasonikace na velikost a distribuci velikosti částic.....	34
Obr. 14 Vliv velikosti amplitudy ultrasonikace na velikost a distribuci velikosti částic.....	34
Obr. 15 Absorbční spektrum pro roztok hydrocortisonu ve vodě	35
Obr. 16 Absorbční spektrum cortisonu 21-acetát ve vodě.....	36
Obr. 17 Absorbční spektrum pro roztok progesteronu ve vodě.....	36
Obr. 18 Absorbční spektrum roztoku β -estradiolu ve vodě.....	37
Obr. 19 Kalibrační závislost pro hydrocortison ($\lambda_{\max} = 242$ nm)	38
Obr. 20 Kalibrační závislost cortisonu 21-acetát ($\lambda_{\max} = 240$ nm)	38
Obr. 21 Kalibrační závislost pro progesteron ($\lambda_{\max} = 240$ nm).....	39
Obr. 22 Kalibrační závislost pro estradiol ($\lambda_{\max} = 280$ nm).....	39
Obr. 23 Graf závislosti účinnosti enkapsulace na polaritě enkapsulované látky.....	40
Obr. 24 Množství enkapsulované látky (SL) v částicích PEG-PLA I.	40
Obr. 25 Závislost účinnosti enkapsulace hydrocortisonu na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi.....	42
Obr. 26 Závislost účinnosti enkapsulace cortisonu 21-acetát na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi.....	43

Obr. 27 Závislost účinnosti enkapsulace progesteronu na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi.....	44
Obr. 28 Závislost účinnosti enkapsulace estradiolu na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi.....	45
Obr. 29 Souhrnný graf závislosti EE na procentuálním zastoupení polymerů ve směsi	46
Obr. 30 Závislost množství enkapsulované látky (SL) na poměru polymerů ve směsi.....	47

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Nejvíce využívané polymery pro výrobu nanočástic [3,7,11]	11
Tab. 2 Hlavní výhody a nevýhody metod přípravy nanočástic [1].....	19
Tab. 3 Hodnoty rozpustností ve vodě a absorpční maxima použitých bioaktivních látek udávané výrobcem.....	37
Tab. 4 Absorbance jednotlivých kalibračních roztoků použitých bioaktivních látek.....	38
Tab. 5 Hodnoty velikostí částic a distribuce velikosti pro částice ze směsí polymerů, měřeno pomocí Z-sizeru.....	41