

Příprava Nanokrystalů Léčiv - [PNL]

(Denisa Lizoňová)

1. Úvod

Nanokrystaly léčiv (z angl. „Drug Nanocrystals“) představují atraktivní lékovou formu pro zlepšení biologické dostupnosti (z angl. „Bioavailability“, BA; podíl látky který se vstřebá do krve) účinných látek se špatnou rozpustností ve vodě [1]. Tato třída léčiv zahrnuje řadu běžně používaných molekul, jako jsou statiny, antihypertenziva či některá antibiotika, jejichž nízká rozpustnost omezuje vstřebávání po perorálním podání. Redukce velikosti částic do nanometrového rozsahu (typicky 150–200 nm) vede ke zvýšení specifického povrchu, což urychluje rychlost rozpouštění podle Noyes-Whitneyho rovnice. Díky tomu lze dosáhnout rychlejšího nástupu účinku, vyšších plazmatických hladin léčiva a potenciálně i snížení požadované dávky.

Jednou z nejpoužívanějších metod přípravy nanokrystalů je mokré mletí (z angl. „Wet Milling“ / „Wet Stirred Media Milling“). Tento proces využívá mechanickou energii přenášenou z mlecích kuliček na pevné částice suspendované ve vodném médiu. Výsledkem je postupné zmenšování velikosti částic až do nanometrového rozsahu; jedná se tedy o tzv. „top-down“ metodu. Aby nedocházelo k opětovnému shlukování částic, je nutná přítomnost stabilizátorů, které se adsorbují na povrch částic a zabraňují jejich aglomeraci.

Tato laboratorní úloha je zaměřena na přípravu suspenze nanokrystalů léčiva pomocí mokrého mletí s využitím modelové látky kurkumin, která je netoxická, svými vlastnostmi dobře napodobuje běžně používaná špatně rozpustná léčiva a má navíc výhodné optické vlastnosti (žlutá barva, fluorescence). Pro přípravu těchto nanokrystalů bude využito běžně dostupné laboratorní vybavení, jako je magnetická míchačka s míchadlem, či zirkoniové mlecí kuličky. Tato úloha zabere jeden laboratorní den (~4 h). V navazující úloze (Analýza Nanokrystalů Léčiv; ANL, následující den, ~4 h) budou suspenze dále analyzovány z hlediska velikosti částic a koloidní stability.

2. Teorie

Nanokrystaly léčiv lze připravit dvěma hlavními způsoby: metodami typu top-down, kdy dochází ke zmenšování velikosti již existujících částic (například mokré mletí), a metodami typu bottom-up, kdy částice vznikají z molekul v roztoku, typicky procesem antisolventního srážení (angl. antisolvent precipitation). V obou případech je cílem získat disperzi s co nejmenší průměrnou velikostí částic a zároveň s nízkou polydisperzitou. Polydisperzita, často kvantifikovaná pomocí polydisperzního indexu (PDI), udává šířku distribuce velikostí částic v systému. Nízká polydisperzita značí homogenní populaci částic a je žádoucí z hlediska reprodukovatelnosti fyzikálně-chemických vlastností, rychlosti rozpouštění a stability suspenze.

Vysoká polydisperzita může vést ke zrychlenému rozpadu systému v důsledku procesu známého jako Ostwaldovo zrání, při kterém se menší částice rychleji rozpouštějí a rozpuštěný materiál následně krystalizuje na povrchu větších částic. Tento děj je termodynamicky výhodný, protože snižuje celkovou povrchovou energii systému, ale zároveň vede k růstu větších částic na úkor menších a tím k dalšímu zvyšování polydisperzity. Pravděpodobnost Ostwaldova zrání klesá s nižší rozpustností účinné látky ve vodě.

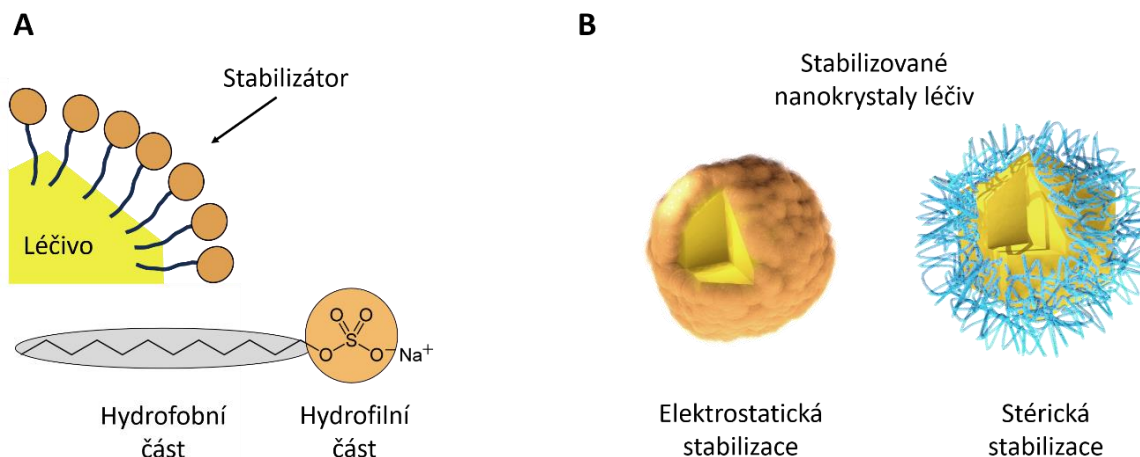
Pro zajištění dlouhodobé stability systému a prevenci aglomerace částic je nezbytné použití vhodných stabilizátorů [2, 3]. Stabilizace nanočástic může být založena na elektrostatickém, stérickém nebo kombinovaném principu. Elektrostatická stabilizace využívá nábojů na povrchu částic – částice se stejným nábojem se vzájemně odpuzují, čímž se brání jejich shlukování. Často se k tomuto účelu používá dodecylsírán sodný (SDS), jehož molekula je amfifilní – tedy obsahuje hydrofobní i hydrofilní část. Hydrofobní úsek molekuly interaguje s povrchem krystalu, zatímco hydrofilní hlavice nesoucí záporný náboj směřuje do okolního vodného prostředí. Tím dochází k tzv. „hydrofilizaci“ povrchu nanokrystalu, což umožňuje jeho rozptýlení ve vodném roztoku.

Tento způsob stabilizace je však velmi citlivý na přítomnost solí v prostředí. Ionty rozpuštěné ve vodném roztoku totiž snižují dosah elektrostatického působení mezi částicemi – jejich náboje jsou částečně „zakryty“ (stíněny) okolními ionty. V důsledku toho se stejně nabitě částice již navzájem tolik neodpuzují, mohou se více přiblížit a snadněji shlukovat. Tento jev je znám jako vysolování (salting-out) a vede ke ztenčení vrstvy, která původně bránila agregaci, což nakonec způsobuje destabilizaci celého systému.

Alternativním přístupem ke stabilizaci nanočástic je stérická stabilizace, která je méně citlivá na změny iontové síly a vhodnější pro některé farmaceutické aplikace. V tomto případě se na povrch částic navazují polymerní řetězce, které svým objemem brání vzájemnému přiblížení částic a jejich agregaci díky sterickému odpuzování. Nejčastěji se k tomuto účelu používají neiontové povrchově aktivní látky, jako jsou polysorbáty, poloxamery nebo polyethylenglykol (PEG).

PEGylace, tedy navázání PEG řetězců na povrch nanočástic, zvyšuje jejich fyzikální stabilitu a zároveň výrazně prodlužuje dobu, po kterou zůstávají v krevním oběhu při intravenózním podání. PEG zabraňuje adsorpci proteinů z okolního prostředí na povrch částic, a tím snižuje jejich rozpoznání a odstranění z těla. Podobný efekt lze dosáhnout i v případě stabilizace s využitím fosfolipidů, látek běžně používaných např. při přípravě lipozomů. Fosfolipidy lze rovněž PEGylovat, čímž se dále zlepšuje fyzikálně-chemická stabilita nanokrystalů a snižuje se riziko jejich rychlého odbourání, například fagocytózou makrofágy – buňkami imunitního systému [2].

V této úloze budou jako stabilizační činidla použity SDS (pro elektrostatickou stabilizaci) a poloxamer 188 (pro sterickou stabilizaci). Obě látky jsou běžně používané ve farmaceutických formulacích, finančně dostupné a zároveň vysoce relevantní pro vývoj reálných léčivých přípravků [4]. **Obrázek 1** graficky znázorňuje orientaci amfifilního stabilizátoru vůči hydrofobnímu povrchu nanokrystalu léčiva a ilustruje dva typy nanokrystalů – stabilizovaných elektrostaticky a stéricky.



Obrázek 1. A: Schématické znázornění orientace molekul SDS na povrchu hydrofobního nanokrystalu léčiva. Hydrofobní část molekuly SDS interaguje s povrchem krystalu, zatímco hydrofilní hlavička (sulfátová skupina) směřuje do okolního vodného prostředí, čímž zajišťuje elektrostatickou stabilizaci. **B:** 3D vizualizace dvou typů stabilizovaných nanokrystalů: vlevo elektrostaticky stabilizovaný systém (např. pomocí SDS), vpravo stéricky stabilizovaný systém (např. pomocí poloxameru 188), jehož polymerní řetězce vytvářejí kolem krystalu ochrannou vrstvu zabráňující agregaci.

3. Cíl práce

Tato laboratorní práce zahrnuje **přípravu dvou vzorků nanokrystalů kurkuminu**: (i) stabilizovaných pomocí SDS (CC_SDS) a (ii) pomocí poloxameru 188 (CC_P188). Nanokrystaly budou připraveny **metodou mokrého mletí** ve vodném prostředí za použití destilované vody, zirkoniových mlecích kuliček, magnetického míchadla a míchačky.

Na tuto práci navazuje laboratorní úloha Analýza nanokrystalů léčiv (ANL), ve které budete připravené vzorky analyzovat metodou dynamického rozptylu světla (DLS) za účelem stanovení velikosti částic, distribuce velikosti a polydisperzity. Dále bude sledována stabilita nanokrystalů v přítomnosti solí, a to kombinací vizuálního pozorování, fotografické dokumentace a měření pomocí DLS.

4. Materiál a přístrojové vybavení

4.1 Chemikálie

- kurkumin (modelové špatně rozpustné léčivo)
- dodecylsírán sodný (SDS)
- poloxamer 188 (P188)
- destilovaná voda

4.2 Pomůcky a vybavení

- navažovací lodičky a lžičky
- analytické váhy
- zirkoniové mlecí kuličky – **asistent určí s jakým typem (velikostí) budete pracovat**

- skleněné vialky
- magnetická míchadla
- magnetické míchačky
- pipety a špičky
- kádinka na destilovanou vodu

5. Postup práce

5.1 Příprava materiálu

Vyjměte lahvičku s kurkuminem z mrazáku a nechte ji zahřát na pokojovou teplotu, abyste předešli kondenzaci vody uvnitř nádoby. Mezitím si připravte ostatní potřebné materiály a chemikálie. Zaznamenávejte si přesné navážky.

5.2 Navažování

Na samostatné navažovací lodičky navažte (do protokolu zapisujte přesné navážky):

- 1× 20 mg SDS
- 1× 20 mg poloxameru 188
- 2× 30 mg kurkuminu (Poznámka: po navážení obalte lahvičku s kurkuminem parafilmem a co nejdříve ji vraťte zpět do mrazáku).

Dále si připravte:

- 2 skleněné vialky
- 2 magnetická míchadla vhodné velikosti
- 2× 2 g zirkoniových mlecích kuliček

5.3 Mokré mletí

Do každé skleněné vialky vložte jedno magnetické míchadlo a nasypťte 2 g mlecích kuliček. Poté přidejte 30 mg kurkuminu, 20 mg SDS do jedné vialky a 20 mg poloxameru 188 do druhé vialky. Nakonec do každé vialky napipetujte 1 mL destilované vody.

Umístěte vialky na magnetické míchačky a nastavte rychlost míchání v rozmezí 800–1400 rpm. Vizuálně zkontrolujte, že se všechny mlecí kuličky pohybují, a do protokolu zaznamenejte použité otáčky. Zapište si také čas zahájení mletí. Proces bude probíhat až do následujícího dne, tedy přibližně 20–22 hodin v závislosti na čase spuštění.

Pravidelně kontrolujte, zda se všechny kuličky ve vialce pohybují. Pokud ne, upravte polohu vialky tak, aby bylo míchání efektivní. V prvních 30 minutách je vhodné vialky několikrát ručně protřepat, aby se uvolnily krystaly, které ulpěly na stěnách.

Pokud vialka na míchačce nedrží, přilepte ji lepicí páskou. Sledujte, zda je míchadlo správně ponořeno mezi mlecími kuličkami – nemělo by vyskakovat nad jejich povrch. Pokud k tomu dochází, zvažte výměnu za míchadlo vhodnější velikosti a bez poškození. Pro vyjmutí míchadla použijte neodymový magnet nebo k tomu určený nástroj.

5.4 Ukončení práce

Před odchodem z laboratoře se ujistěte, že jsou vzorky řádně označeny. Zkontrolujte, že se vialky na míchačkách nehýbou nebo že jsou připevněny. Vzorky ještě jednou protřepejte. Uklidte pracovní plochu a vraťte chemikálie a pomůcky na původní místa.

6. Zpracování dat

Tato část práce není náročná na zpracování dat ani na objem získaných výsledků. Jejím hlavním cílem je pochopení principu mokrého mletí a praktické vyzkoušení přípravy vlastních vzorků. Hlavní část hodnocení proto bude založena na ústním přezkoušení teoretických základů. Do protokolu pouze vyplňte příslušné tabulky – запиšte navážky, pipetované objemy a další parametry procesu podle požadavků jednotlivých tabulek.

7. Bezpečnostní pokyny

Během práce vždy dodržujte platná pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. Noste laboratorní plášť a používejte předepsané ochranné pomůcky. Všechny nádoby s chemikáliemi musí být řádně označeny – na štítku musí být uveden název látky, vaše jméno a datum.

Neponechávejte v laboratoři žádné neoznačené kádinky ani jiné skleněné nádoby. Po použití všechny pomůcky vraťte na své původní místo. Nepoužívejte přístroje, na kterých jste nebyli zaškoleni, a vždy se informujte, s jakými látkami pracují kolegové ve vašem okolí. To je důležité pro správnou reakci v případě nehody, například rozlití chemikálie.

Po ukončení práce řádně uklidte své pracovní místo. Vaše vzorky musí být na noc bezpečně a viditelně označeny. Dbejte také na to, aby bylo jasně uvedeno, do kdy má experiment (např. mletí) probíhat, a předešlo se tak nechtěnému přerušení ze strany jiných osob.

8. Kontrolní otázky

1. Co jsou nanokrystaly léčiv a jaké je jejich využití ve farmacii?
2. Z jakých typů léčiv je možné připravit nanokrystaly?
3. Co znamená stabilizace nanokrystalů, jaké existují typy stabilizace a k čemu slouží?
4. Co je metoda mokrého mletí a jaký je její princip?
5. Jak ovlivňuje přítomnost solí koloidní stabilitu nanočástic?
6. Jaká bezpečnostní opatření je třeba dodržovat při práci v laboratoři? Jak správně označovat vzorky a používané pomůcky?

Literatura

1. Junghanns, J.-U.A. and R.H. Müller, *Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications*. International journal of nanomedicine, 2008. **3**(3): p. 295-310.
2. Lizoňová, D., et al., *Surface stabilization determines macrophage uptake, cytotoxicity, and bioactivity of curcumin nanocrystals*. International Journal of Pharmaceutics, 2022. **626**: p. 122133.
3. Hládek, F., et al., *Systematic Investigation of Wet-Milling Kinetics and Colloidal Stability of Pharmaceutical Nanocrystals*. Crystal Growth & Design, 2022. **22**(12): p. 6928-6940.
4. Lizoňová, D., et al., *Solvatochromic Shift Enables Intracellular Fate Determination of Curcumin Nanocrystals*. Particle & Particle Systems Characterization, 2022: p. 2200115.