

**Univerzita Karlova**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technológie



**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Formulácia a testovanie nanočastíc  
z vetvených polyesterov s rifampicínom**

*Vedúci diplomovej práce: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.*

Hradec Králové 2018

Andrea Balciarová

## ***Pod'akovanie***

*Týmto by som chcela vyjadriť vďaku svojmu vedúcemu diplomovej práce doc. RNDr. Milanovi Dittrichovi, CSc. a Mgr. Jurajovi Martiškovi za ich čas, pomoc, trpezlivosť a odborné vedenie pri tvorbe tejto práce.*

*Zároveň by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľovi za ich podporu, ktorú mi prejavovali počas celého štúdia.*

*„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri písaní tejto práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“*

V Hradci Králové

.....

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Školiteľ: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Študent: Andrea Balciarová

Názov diplomovej práce: Formulácia a testovanie nanočastíc z vetvených polyesterov s rifampicínom

V teoretickej časti prezentovanej práce je hlavná pozornosť venovaná pojednaniu o nanočasticách určených pre ciele distribúciu, ich typoch, štruktúre a nosičoch používaných pre ich prípravu. Ďalej je v tejto časti uvedený prehľad fyzikálne-chemických vlastností a metód prípravy polymérnych nanočastíc využiteľných pri formulácii farmaceutických produktov. Experimentálna časť práce je zameraná na štúdium vplyvu koncentrácie biodegradabilných polymérov, prítomnosti kationických tenzidov a rifampicínu ako modelovej liečivej látky na veľkosť a zeta-potenciál nanočastíc. Hlavná pozornosť je venovaná dekorovaniu nanočastíc anionickými biopolymérmi, kyselinou hyaluronovou a xanthanovou klovatinou. Bola vyskúšaná a otestovaná v rôznych súvislostiach jednoduchá metóda prípravy, využiteľná pre formuláciu nanosystémov ovplyvňujúcich cielene biologické funkcie.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Student: Andrea Balciarová

Title of Thesis: Formulation and testing of rifampicin-loaded branched polyesters nanoparticles

In presented thesis, the main attention in theoretical part is focused on nanoparticles for targeted drug delivery, their types, structure and carriers used for their preparation. Moreover, in this part there is an overview of physicochemical characteristics and preparation methods of polymeric nanoparticles applicable in formulation of pharmaceutical products. The experimental part is concerned on studying the influence of the concentration of biodegradable polymers, the presence of cationic surfactants and rifampicin as model drug substance on nanoparticles' size and zeta-potential. The main attention is given to nanoparticles decoration with anionic biopolymers, hyaluronic acid and xanthan gum. The simple method of preparation which is usable in nanosystems formulation that influence biological functions purposefully was tried and tested in different contexts.

## Obsah

Zadanie práce.....	10
Zoznam použitých skratiek.....	11
1. Úvod – nanotechnológia vo farmácii a medicíne.....	13
2. Nanočastice (NPs) pre ciele biodistribúciu.....	14
2.1 Polymérne nanočastice (PNPs).....	14
2.1.1 Nanosféry a nanokapsule.....	15
2.2 Ďalšie typy nanočastíc.....	16
3. Materiály používané na prípravu NPs.....	17
3.1 Vplyv fyzikálne-chemických vlastností polymérov na PNPs.....	18
3.1.1 Molekulová hmotnosť (Mw).....	18
3.1.2 Hydrofobicita, hydrofilita.....	19
3.1.3 Povrchový náboj.....	20
3.1.4 Teplota sklovitého prechodu (T <sub>g</sub> ).....	20
3.1.5 Stupeň kryštalinity.....	20
4. Metódy prípravy PNPs.....	21
4.1 Polymerizačné metódy.....	22
4.2 Metódy prípravy NPs z predom pripravených polymérov.....	22
4.2.1 Dvojkrokové metódy prípravy.....	22
4.2.1.1 Emulzne-odparovacia metóda.....	23
4.2.1.2 Emulzne-difúzna metóda.....	24
4.2.1.3 Emulzne-reverzná vysoľovacia metóda.....	25
4.2.2 Jednokrokové metódy prípravy.....	25
4.2.2.1 Metóda využívajúca princíp dialýzy.....	26
4.2.2.2 Metóda sprejového sušenia.....	26
4.2.2.3 Technológia superkritických kvapalín.....	27

4.2.2.4 Nanoprecipitačná metóda.....	27
5. Dôležité charakteristiky NPs ovplyvňujúce ich účinok.....	28
5.1 Veľkosť NPs.....	28
5.2 Index polydisperzity (pDI).....	29
5.3 Zeta-potenciál (ZP) – elektrokinetický potenciál.....	29
6. Meranie veľkosti a ZP NPs.....	31
6.1 Meranie veľkosti NPs.....	31
6.1.1 DLS – dynamický rozptyl svetla.....	31
6.2 Meranie ZP NPs.....	32
6.2.1 ELS – elektroforetický rozptyl svetla.....	32
7. Povrchová úprava NPs.....	33
8. Cílená biodistribúcia.....	34
8.1 Pasívny „targeting“.....	34
8.2 Aktívny „targeting“.....	35
9. Experimentálna časť.....	36
9.1 Zoznam použitej laboratórnej techniky.....	37
9.2 Zoznam použitých chemikálií a ich skratky.....	38
9.3 Charakteristika použitých polymérov.....	39
9.4 Rifampicín.....	41
9.5 Postup prípravy.....	42
9.5.1 Samotný postup prevedenia prípravy a testovania NPs.....	42
9.5.2 Príprava zásobných roztokov polymérov použitých na prípravu NPs.....	42
9.5.3 Príprava zásobných roztokov polymérov použitých na dekoráciu NPs.....	42
9.5.4 Príprava vonkajšej fázy.....	44

9.5.5	Príprava vnútornej fázy.....	44
9.5.6	Dekorácia NPs.....	44
9.5.7	Meranie veľkosti a ZP NPs.....	44
9.5.8	Centrifugácia .....	45
9.5.9	Spektrofotometria a určenie enkapsulačnej účinnosti (EE).....	45
10.	Výsledky a ich diskusie.....	46
10.1	Nedekorované NPs.....	46
10.1.1	Modelové NPs – Voľba typu polyméru a podmienok pre prípravu NPs...46	
10.1.2	Sledovanie vplyvu fosfát-citrátovej fázy s pH 3,5 na parametre NPs pri rôznom obsahu liečiva a T3.....	47
10.1.3	Anionické NPs bez emulgátoru – sledovanie vplyvu škály pH fosfát-citrátového roztoku na parametre NPs pri zvyšujúcom sa obsahu liečiva a T3.....	48
10.1.4	Anionické NPs s emulgátorom – vplyv prítomnosti emulgátora na parametre NPs vo fosfát-citrátovom roztoku v pH škále 5,2-4,8.....	50
10.2	Dekorované NPs.....	52
10.2.1	Vplyv dekorovania s HA a prítomnosť emulgátoru na parametre NPs v prostredí vody.....	52
10.2.2	NPs dekorované s HA „drop-wise“ metódou pri pH škále fosfát-citrátového roztoku 5,2-6,4 a vplyv na ich parametre.....	53
10.2.3	Vplyv spôsobu dekorovania s HA a koncentrácie T3 na parametre NPs.....	55
10.2.4	Vplyv koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva HA použitej na dekorovanie na parametre NPs a ich stabilitu po 20 hodinách.....	58
	vzoriek po 20 hodinách	
10.2.5	Vplyv postupného zvyšovania množstva HA použitej na dekorovanie na parametre NPs.....	62
10.2.6	Sledovanie vplyvu zmeny objemu fáz na parametre NPs dekorovaných a nedekorovaných analogických vzoriek.....	63



10.2.7 Vplyv metódy zmiešania vonkajšej a vnútornej fázy na parametre dekorovaných a nedekorovaných NPs pri zmene objemu fáz.....	66
10.2.8 Vplyv dekorovania vodným roztokom XK na parametre NPs.....	70
10.2.9 Vplyv prítomnosti dekorovania termicky degradovanou XK na parametre NPs.....	71
11. Závery .....	74
Príloha: tabuľka riedenia fosfát-citrátového pufru.....	76
Zoznam tabuliek.....	77
Zoznam obrázkov.....	79
Zoznam použitej literatúry.....	81

## Zadanie práce

Cieľom práce bola príprava nanočastíc z alifatického polyesteru PLGA a alifatického vetveného polyesteru T3 s rifampicínom rôznymi modifikáciami parametrov nanoprecipitačnej metódy prípravy nanočastíc a vyhodnotiť aký je vplyv týchto modifikácií na základné charakteristiky nanočastíc ako sú veľkosť, zeta-potenciál, polydisperzita, stabilita a enkapsulačná účinnosť. Ako zmienené modifikácie boli prevedené zmeny koncentrácie polyméru použitého na tvorbu NPs, množstvo liečiva, pridanie emulgátoru do vonkajšej fázy, typ vonkajšej fázy, rôzne pomery vonkajšej a vnútornej fázy, pH vonkajšej fázy, rôzne metódy zmiešania vonkajšej a vnútornej fázy a rôzne metódy dekorovania NPs s dvomi polymérmi - HA a XK.

## Zoznam použitých skratiek

<b>AP</b>	- čistená voda
<b>API</b>	- aktívna farmaceutická substancia
<b>BAV</b>	- biodostupnosť
<b>CET</b>	- cetrimid (N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid)
<b>CPP</b>	- cell-penetrating peptides – peptidy umožňujúce penetráciu do bunky
<b>DLS</b>	- dynamic light scattering - dynamický rozptyl svetla
<b>DMAB</b>	- didodecyldimethylammoniumbromid
<b>DMSO</b>	- dimethylsulfoxid
<b>ELS</b>	- electrophoretic light scattering - elektroforetický rozptyl svetla
<b>EMA</b>	- European Medicines Agency - Európska Lieková Agentúra
<b>EPR</b>	- efekt zvýšenej penetrácie a retencie
<b>FC-roztok</b>	- vodný fosfát-citrátový roztok
<b>FDA</b>	- Food and Drug Administration - Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
<b>HA</b>	- kyselina hyalurónová
<b>HMw polyméry</b>	- polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou
<b>LMw polyméry</b>	- polyméry s nízkou molekulovou hmotnosťou
<b>NPs</b>	- nanočastice
<b>PCL</b>	- poly-ε-kaprolakton
<b>pDI</b>	- index polydisperzity
<b>PEG</b>	- poly-ethylénglykol
<b>PLA</b>	- kyselina poly-mliečna
<b>PGA</b>	- kyselina poly-glykolová
<b>PLGA</b>	- kopolymér kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej

<b>PNPs</b>	- polymérne nanočastice
<b>PVP</b>	- poly-vinylpyrrolidon
<b>Pk Area Int</b>	- plocha píku
<b>Pk Mean Int</b>	- výška píku
<b>RES</b>	- retikuloendoteliálny systém
<b>RIFA</b>	- rifampicín
<b>T3</b>	- vysoko vetvený terpolymér kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej vetvený na 3% tripentaerythritole
<b>XK</b>	- xanthánová klovatina
<b>Z-Ave</b>	- stredná hodnota veľkosti častíc, meraná ako ich priemer
<b>ZP</b>	- zeta-potenciál

## 1. Úvod - nanotechnológia vo farmácii a medicíne

Slovo „nano“ je odvodené od latinského slova, ktoré v preklade znamená trpaslík. Nanomedicína je nádejným a rozvíjajúcim sa odborom 21. storočia využívajúca aplikáciu nanotechnológie k zlepšeniu terapie a diagnostiky celej rady doposiaľ problematcky liečiteľných ochorení, na molekulárnej úrovni, vďaka malej veľkosti a vhodným vlastnostiam používaných nanočastíc.[1, 2]

Mnoho konvenčných terapeutik (liečivé látky a ich liekové formy), čelí rade problémov, pre ktoré je ich použitie obmedzené, alebo sa negatívnym spôsobom podpisuje na terapii. Hlavnými problémami sú toxicita liečiva, nízka špecifita pre ciele postihnuté tkanivo a s ním spojená nedostatočná dostupná dávka liečiva v tomto tkanive. Čo sa odzrkadlí negatívnym vplyvom na zdravé tkanivo a vzniku rade vedľajších nežiadúcich účinkov.[3]

Nanotechnológia predstavuje i príležitosť pre farmaceutické firmy, ako uplatniť v terapii i mnoho doposiaľ vynájdenných, avšak v praxi nepoužitelných látok, kvôli ich nevyhovujúcim vlastnostiam, a tiež predĺžovaní platnosti patentov doposiaľ známych liečiv ich novým spracovaním do nanoformulácií. Liečivá vo formulácii, ktorá sa nachádza veľkosťou v nano-oblasti predstavujú potenciál pre zlepšenie terapeutického účinku mnohých konvenčných liekových foriem a konvenčných liečivých látok – podieľajú sa na zlepšení rozpustnosti vo vode zle rozpustných látok, zvýšení biodostupnosti, znížení toxicity danej látky, môžu poskytnúť riadené a ciele uvoľňovanie liečivej látky, čím sa môže znížiť i dávkovanie a fluktuácia koncentrácie podávanej medikácie a znížia sa vedľajšie účinky na necieľové tkanivá.[1] Vhodnou formuláciou týchto nanoštruktúr sa dosahuje cieleho terapeutického účinku.

Niektorí autori avšak uvádzajú aj možné riziká spojené s užívaním NPs ako liekových foriem, je to dané ich veľkosťou na subcelulárnej úrovni a veľkým povrchom, kde dochádza k rozsiahlemu kontaktu s rôznymi tkanivovými štruktúrami, a to i napriek tomu, že sú pripravované zväčša z biokompatibilných materiálov.[4]

## 2. Nanočastice pre cieleú biodistribúciu

Patria do skupiny časticových liekových foriem, kde viac častíc predstavuje jednotkovú dávku. Nanočastice sa radia do koloidných systémov pre cieleú biodistribúciu a sú definované ako častice väčšie než 1nm a zároveň menšie než 1000 nm, táto veľkosť sa vzťahuje buď k priemeru guľatých častíc, alebo k približnému priemeru častíc s nepravidelným tvarom. Sú tvorené z anorganického alebo organického materiálu a v závislosti na type tohto materiálu rozlišujeme rôzne štruktúrne typy nanočastíc, ktoré budú zhrnuté v tejto kapitole, podrobnejšie však bude pozornosť venovaná polymérnym nanočasticiam, na ktoré je táto práca zameraná. Nanoštruktúry sú založené na jedinečnom združovaní syntetických, prírodných a biologických komponentov ako sú: polyméry, ióny kovov, lipidy. [2, 5]

Dôležité je ešte spomenúť, že nanočastice predstavujú liekovú formu, ktorá umožní podávanie terapeutik spôsobmi, ktoré doposiaľ pre určité typy liečiv neboli vhodné (kvôli senzibilite ich molekuly na okolité podmienky alebo ich fyzikálne-chemické vlastnosti nedovoľovali určitý spôsob aplikácie – napr. p.o. podanie vakcín). NPs môžu byť teda aplikované napríklad p.o., nasálne, parenterálne, intraokulárne.

NPs aj napriek mnohým výhodám vykazujú aj určité limitácie, ktoré sú zapríčinené ich malou veľkosťou a veľkým povrchom, a to sú agregácia častíc (a tým sťažená manipulácia s nimi), limitovaný „drug-loading“ a „burst release“ a taktiež možná toxicita, o ktorej ešte neexistuje mnoho podložených informácií. [6]

### 2.1 Polymérne nanočastice (PNPs)

Polymérne nanočastice sú koloidné nosiče liečiv s veľkosťou pohybujúcou sa v rozmedzí od 10nm do 1000nm.[1] Sú tvorené prírodnými alebo syntetickými polymérmi. Prírodzene vyskytujúce sa polyméry vo všeobecnosti podliehajú enzymatickej hydrolýze, zatiaľ čo syntetické polyméry môžu byť navrhované tak, aby ich degradácia (hydrolytická alebo enzymatická) bola kontrolovaná.[7] Tieto polyméry využívané pre nanoformuláciu liečiv majú základnú požiadavku, aby boli

**biokompatibilné**, čo znamená, aby nevykazovali toxický vplyv na biologické systémy. Je však dôležité poznamenať, že biokompatibilita nevylučuje nebiodegradabilitu.[5] PNP s pútajú posledné roky pozornosť vďaka svojim jedinečným vlastnostiam a správaniu, vychádzajúcich z ich malej veľkosti a ich stavebných kameňov- polymérov. Tieto polyméry im prepožičiavajú rôzne zaujímavé a využiteľné vlastnosti. Výhody PNP zahŕňajú ich biokompatibilitu, možnú biodegradabilitu, poskytnutie riadeného uvoľňovania liečiv, väčšiu ochranu liečiva pred okolitými podmienkami, využitie aj pre biodistribúciu nielen konvenčných liečiv s malou molekulou, diagnostik, ale aj pre biodistribúciu génov a proteínov (aj prostredníctvom perorálneho podania a iných), ktoré sú obzvlášť citlivé na okolité podmienky a manipuláciu. Sú považované za bezpečnejšie a stabilnejšie formy, než ďalšie typy nanonosičov pre cieľnú biodistribúciu, a to práve kvôli vyššie zmieneným vlastnostiam.[2, 8, 9] Sú odlišné od nanosuspenzií tvorených časticami pozostávajúcimi len zo samotného liečiva, ktoré sú stabilizované povrchovo aktívnymi látkami – surfaktantmi.[10]

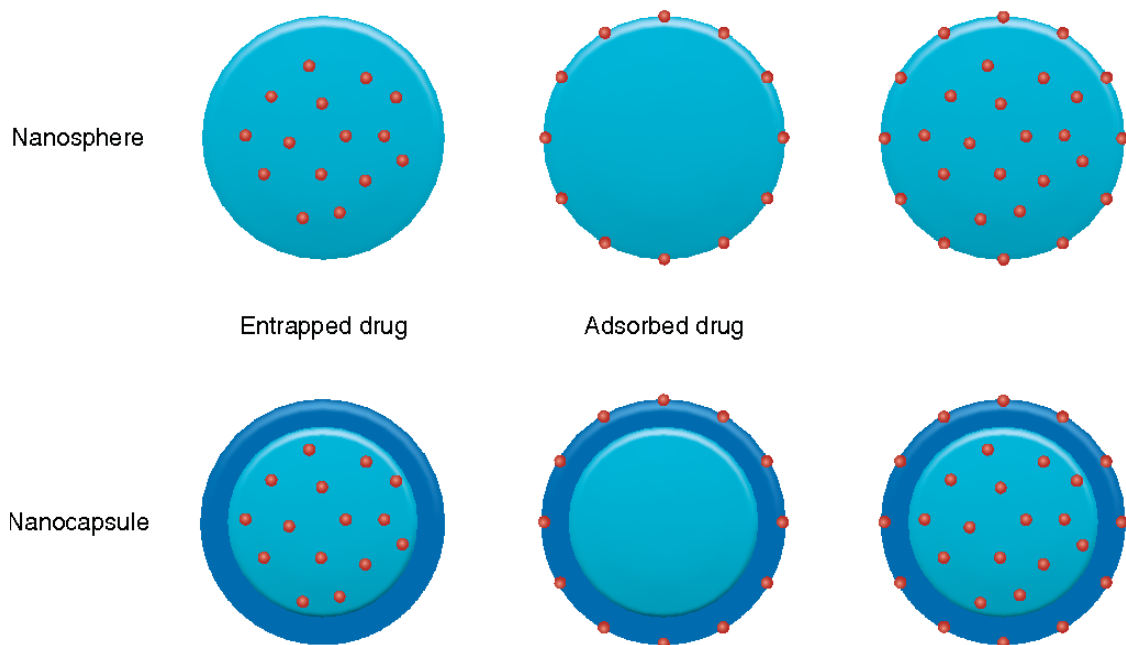
V závislosti na metóde prípravy a zložení použitej organickej fázy rozlišujeme 2 hlavné štruktúrne typy PNP – **nanosféry** a **nanokapsule** (nanotobolky).[8]

### 2.1.1 Nanosféry a nanokapsule

**Nanosféry** sú tvorené polymérnou matrix, v ktorej je liečivo buď zachytené, alebo je adsorbované na povrchu hmoty – liečivo a polymér sú rovnomerne dispergované. Sú jednoduchšie lyofilizovateľné než nanokapsule, ktoré sa pri tomto procese rýchlejšie poškodia, čo je zrejme z ich štruktúrneho usporiadania.

**Nanokapsule** sú tvorené tekutým jadrom, ktoré je obklopené spevnenou polymérnou membránou. Jadro predstavuje dutinu, ktorá obsahuje vodné alebo lipidové prostredie, v ktorom je zachytené liečivo. Ak toto jadro obsahuje vodné prostredie – hovoríme o polymerozómoch, ktoré inkorporujú hydrofilné liečivá. Nanokapsule sa teda v podstate správajú ako rezervoáre liečiva. Liečivo však môže byť aj adsorbované zvonku na polymérnej membránovej časti. Narozdiel od nanosfér sú nanokapsule svojimi rozmermi väčšie, majú vyšší „drug-loading“ a znížený obsah polyméru, čo je zvlášť výhodné, ak pri formulácii používame nebiodegradabilné polyméry, ktoré by sa mohli

v tele kumulovať.[2, 5, 8, 11] Meraniami membránovej viskozity a laterálnej difuzivity bolo dokázané, že membránová fluidita sa znižuje so zvyšujúcou sa Mw a dĺžkou reťazca polyméru. Taktiež elektrochemická stabilita sa zvyšuje so zvyšujúcou sa hrúbkou membrány, čo je priamo úmerné Mw polymérnej membrány. Preto fosfolipidové membrány lipozómov v dôsledku ich nízkej Mw prasknú skôr než membrány tvorené polymérmi. Navyše v polymérnych nanokapsulách je znateľne znížená permeácia vody cez hrubú stenu polyméru, narozdiel od lipidových membrán a tak poskytujú polymérne nanokapsule zvýšenú stabilitu a znížený únik liečiva ( i znížené nárazové uvoľnenie– tzv. „burst release“) než je tomu u lipozómov.[5]



Obrázok 1 – Nanosféry a nanokapsule [12]

## 2.2 Ďalšie typy nanočastíc

Podľa materiálu z ktorého sú NPs zložené a spôsobe usporiadania tohto materiálu rozlišujeme okrem PNPs ďalšie nanočasticové formy ako sú napríklad **kremičité NPs**, **uhlíkové nanotrubičky**, „**quantum dots**“, **kovové NPs** (napr. Au, oxidy Fe), **dendriméry** (opakovane vetvené častice štruktúrou podobné „stromu“ tvoriace kavity



a obsahujúce koncové skupiny, ktoré môžu byť upravené podľa požiadaviek, majú kontrolovanú Mw), **lipozómy** (tvorené združovaním fosfolipidov do unilamelárnych alebo multilamelárnych štruktúr tvoriacich vodné kompartmenty, liečivo môže byť zabudované do vodného kompartmentu, alebo interkalované do fosfolipidovej dvojvrstvy, alebo prípadne môže byť rozdelené medzi obe fázy – závisí to na fyzikálno-chemických vlastnostiach liečiva), **polymérne micely** (tvorené združovaním amfifilných blokových kopolymérov do supramolekulárnych štruktúr pozostávajúcich z jadra a membrány, sú vhodné pre distribúciu vo vode nerozpustných liečiv, vykazujú vysoký „drug loading“ a stabilitu, navyše ich hydrofilný povrch im zaisťuje odolnosť voči pohlteniu RES), **a ďalšie**. [1] Niektoré z týchto foriem našli už v praxi uplatnenie, niektoré však ešte nie.

### 3. Materiály používané na prípravu PNPs

PNPs sú pripravované buď z **už predom pripravených polymérov**, alebo z **monomérov**, ktoré polymerizujú počas procesu prípravy samotných NPs.

Polyméry podľa pôvodu delíme na prírodné alebo syntetické. **Prírodné** sú zvyčajne biokompatibilné a biodegradovateľné, avšak sú limitované v užití kvôli ich interindividuálnej variabilite a sú všeobecne viac imunogénne než syntetické. **Syntetické** polyméry disponujú hlavnou výhodou oproti prírodným polymérom, že majú kontrolované chemické vlastnosti. [8]

Medzi najviac používané prírodné polyméry pre tvorbu PNPs patria: albumín, algináty, chitosan a želatina. Medzi syntetické polyméry pre PNPs sa využívajú hlavne alifatické polyestery (PLA, PGA, PLGA, PCL), polyethylenglykol, polyanhydridy, polyakrylová kyselina, polykyanoakryláty, polymethylmethakrylát a iné. [2, 5]

Podľa degradability sú tieto polyméry buď **biodegradovateľné**, čo znamená, že sú kompletne eliminované prirodzenými metabolickými cestami, [8] alebo **nebiodegradovateľné** (spravidla tie s vysokou Mw), čo môže byť využité pre prolongovaný účinok, avšak je to limitujúcim faktorom, pretože sa tieto polyméry môžu v tele kumulovať. [13]

### 3.1 Vplyv fyzikálne-chemických vlastností polyméru na PNP

Fyzikálne-chemické vlastnosti polymérov sú dôležité charakteristiky, ktoré pomáhajú pri výbere správneho typu polyméru pre formuláciu nanonosičov o vhodných vlastnostiach pre dané použitie. Medzi tieto dôležité fyzikálne-chemické vlastnosti patria: molekulová hmotnosť, hydrofobicita, povrchový náboj, kompozícia použitého kopolyméru, teplota sklovitého prechodu, kryštalinita a charakter obal'ovacieho materiálu.[14]

#### 3.1.1 Molekulová hmotnosť polymérov (Mw)

S Mw súvisí rada ďalších vlastností polymérov – Tg, rozpustnosť, viskozita, kryštalinita, mechanická odolnosť a miera degradácie. Mw má vplyv na degradačný proces polyméru, čím vykazuje signifikantný vplyv na kinetiku uvoľňovania API z PNP. HMw polyméry tvoria relatívne nedeformovateľnú matrix, ktorá limituje počet tvoriacich sa pórov v nej. Naopak, LMw polyméry tvoria matrix, ktorá je viac deformovateľná, čoho výsledkom je expanzia tvorby pórov ako dôsledok osmotického tlaku. Z toho vyplýva, že LMw polyméry podliehajú rýchlejšej degradácii než je tomu u HMw polymérov. Polyméry s dlhším reťazcom (s vyššími hodnotami Mw ) vykazujú pomalšiu degradáciu, a tým i znížené počiatočné nárazové uvoľnenie z celého objemu polymérnej častice (tzv. „burst effect“) a sú schopné poskytnúť riadené uvoľňovanie. Okrem toho, Mw môže mať vplyv na radu ďalších vlastností, napr. na veľkosť vzniklých nanočastíc, enkapsulačnú účinnosť, mieru absorpcie – nedajú sa však popísať priame zákonitosti medzi hodnotou Mw (či už LMw alebo HMw) a týmito parametrami. Mw je preto jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich farmakokinetu a farmakologickú účinnosť PNP.[14, 15]

### 3.1.2 Hydrofobicita, hydrofilita polymérov

Afinita polyméru jak k vodnej, tak organickej fáze reprezentuje jeho in-vivo a in-vitro osud, je daná jeho chemickou štruktúrou (a teda aj kryštalinitou) a dĺžkou reťazca. Všeobecne platí, že hydrofobicita polyméru sa zvyšuje s jeho Mw, pričom zvýšeným vetvením polyméru sa zvyšuje jeho rozpustnosť vo vode. Kompozícia monomérov polyméru je veľmi dôležitá pre jeho rozpustnosť. Napr. u ko-polyméru PLGA je jeho hydrofobicita daná molárnym pomerom zastúpenia hydrofóbnejšej zložky (kys. mliečnej) ku hydrofilnejšej zložke (kys. glykolová) – prevládajúca zložka určí charakter výsledného ko-polyméru. Čo sa týka dĺžky reťazca polyméru, čím je dlhší (zároveň rastie i Mw), tým je jeho hydrofobicita vyššia.[14, 15]

Hydrofobicita polyméru má vplyv na **absorpčný charakter a degradačnú kinetiku** nanočastice. Určuje teda mieru a trvanie uvoľňovania liečiva. Čím je polymér hydrofóbnejší, tým je pomalšia jeho degradácia. Medzi najviac používané hydrofóbne polyméry patria polyestery. Hydrofobicitou ev. hydrofilitou použitého polyméru sa dá ovplyvniť biodostupnosť liečiva (dôležité je to hlavne pri orálnom podaní). NPs potiahnuté na povrchu hydrofóbnym polymérom sú rýchlejšie vychytávané lymfoidným tkanivom čriev – Peyerovými plakmi. Tieto plaky majú malé slizničné pokrytie, a keďže hydrofóbne polyméry vykazujú malú afinitu k slizničnému povrchu, tak sú zvýšene vychytávané práve v tomto mieste – týmto sa obíde efekt prvého priechodu pečou a zvýši sa BAV liečiva. Naopak u NPs potiahnutých na povrchu hydrofilným polymérom je zvýšená BAV dosiahnutá odlišným mechanizmom – hydrofilné polyméry vykazujú mukoadhezívne vlastnosti, tým je zvýšená retencia na slizničnom epitele tvorenom absorpčnými enterocyty a dochádza k zlepšenej absorpcii týmito bunkami a zvýšeniu BAV.

Častice potiahnuté hydrofóbnym polymérom na povrchu sú rýchlo rozpoznávané RES (makrofágy) po i.v. podaní, deje sa to vďaka interakcii medzi hydrofóbnym povrchom NPs a plazmatickým opsonínom (opsonizácia). Makrofágy takto opsonizované NPs rýchlo rozpoznajú a fagocytujú ich, čo zníži ich plazmatický polčas. Tohto javu sa dá využívať cielene u niektorých ochorení (intracelulárne infekcie, hepatitída a iné). Naopak, niekedy je táto opsonizácia nežiadúcim javom a dá sa jej predchádzať úpravou

povrchu pokrytím hydrofilnými materiálmi (najčastejšie PEG, surfaktantmi alebo inými ligandmi), čo predĺži plazmatický polčas NPs. [14]

### **3.1.3 Povrchový náboj**

Povrchovým nábojom polyméru, z ktorého sú NPs tvorené sa dá ovplyvniť: miera absorpcie, opsonizácie, stability, imunitnej odpovede a biodistribúcie NPs.[14]

### **3.1.4. Teplota sklovitého prechodu ( $T_g$ )**

Teplota sklovitého prechodu je definovaná ako teplota, ev. teplotný rozsah, v ktorom polymér prechádza zo sklovitého štádia do viskózneho kaučukovitej fázy. Typ polyméru a teplota určujú, či sa amorfná oblasť polyméru nachádza v sklovitej alebo kaučukovitej forme. Pod  $T_g$  sa polymér nachádza v sklovitej forme, vykazuje limitovanú mobilitu a nižšiu mieru difúzie. Pri  $T_g$  sa polymér nachádza teda v kaučukovitej forme, ktorá umožňuje vyšší transfer vody a molekúl API cez matrix.  $T_g$  reflektuje štruktúru a stereochemiu polyméru, prítomnosť flexibilných reťazcov túto teplotu znižuje (stačí im prijať menšie množstvo tepelnej energie k pohybu reťazcov), zatiaľ čo prítomnosť rigidných reťazcov ju zvyšuje.  $T_g$  závisí na  $M_w$  a kompozícii polyméru ev. ko-polyméru. U PLGA sa s redukciou obsahu laktidového monéru a znížením  $M_w$  zníži  $T_g$ , a mnoho štúdií objavilo, že  $T_g$  má vplyv na uvoľňovanie API z polyméru.  $T_g$  je dôležitým parametrom, pretože nám indikuje minimálnu teplotu pre spracovanie amorfných polymérov a slúži pre popis kinetiky uvoľňovania liečiva.[14, 15]

### **3.1.5 Stupeň kryštalinity**

Vyjadruje podiel zastúpenia kryštalických (pravidelne usporiadané časti) oblastí v polyméru ku amorfným oblastiam. Štruktúrna a chemická pravidelnosť makromolekuly polyméru je nutná pre jeho kryštalizáciu. Nepravidelnosť v makromolekule polyméru,

prítomnosť dlhších postranných reťazcov a objemných substituentov kryštalizáciu zťažujú.[15, 16]

Stupeň kryštalinity má vplyv na mieru bobtnania, hydrolýzy, biodegradácie a mechanickej odolnosti polyméru. Čím je stupeň kryštalinity väčší, tým je polymér mechanickejšie pevnejší. Amorfné oblasti v polyméru sú permeabilné a prístupné pre molekuly vody, kryštalické sú naopak nepermeabilné pre vodu, a teda medzi kinetikou uvoľňovania liečiva a stupňom kryštalinity je inverzný vzťah. Vysoký stupeň kryštalinity zapríčiňuje pomalšie uvoľňovanie API, týka sa to hlavne LMw polymérov, u HMw polymérov stupeň kryštalinity nemá až taký vplyv na uvoľňovanie kvôli jeho zvýšenej porozite.[15]

Kryštalinita polyméru okrem iného ovplyvňuje i EE – všeobecne sa znižuje EE so zvyšovaním stupňa kryštalinity, pretože liečivo je enkapsulované prevažne v amorfnej časti, pretože kryštalické segmenty sú nepermeabilné pre vodu. [14]

Vyvážený pomer medzi kryštalickým a amorfným zastúpením v polyméru je preto veľmi dôležitý.[15]

#### **4. Metódy prípravy PNPs**

Pri výbere správnej metódy na prípravu PNPs sa berie zreteľ na typ polyméru, fyzikálne-chemické vlastnosti liečiva a finálne požadované vlastnosti PNPs. Všetky metódy zdieľajú jeden spoločný krok, ktorým je precipitácia polyméru, ktorá nastane buď pridaním nonsolventu (rozpúšťadla, v ktorom je polymér nerozpustný) alebo znížením solubility polyméru. Väčšina používaných metód vytvorí NPs, ktoré sú vo forme vodnej suspenzie, v ktorej je fyzikálne-chemická stabilita nízka. Veľmi často sa používa lyofilizácia ako riešenie, ktoré zvýši stabilitu systému a z dlhodobého hľadiska a uľahčí manipuláciu a skladovanie NPs. Lyofilizácia je stresujúci proces, ktorý môže poškodiť NPs, preto sa pri tomto kroku používa prídavok kryoprotektantov a lyoprotektantov.

Pripravené NPs často obsahujú potenciálne nečistoty, ktoré sú ako rezidua použitých látok a rozpúšťadiel, alebo prípadné časticové agregáty, ktoré vznikli počas procesu

prípravy. Tento problém sa rieši čistením. Medzi bežne používané čistiace metódy patria filtrácia, centrifugácia a dialýza.

PNPs sa pripravujú dvomi základnými spôsobmi, ako už bolo uvedené v predchádzajúcej kapitole, a to buď prípravou už z **predom pripravených polymerov** alebo **polymerizáciou monomérov** počas vlastného procesu prípravy NPs. Metódy, ktoré využívajú predom pripravené polyméry sú buď **dvojkrokové** (tvorba emulzifikačného systému nasledovaná tvorbou NPs) alebo **jednokrokové** (emulzifikácia nie je nutná pre tvorbu NPs). [8, 9]

## 4.1 Polymerizačné metódy prípravy NPs

Využíva dva spôsoby prípravy, emulzné polymerizačné techniky alebo interfaciálnu polymerizáciu. Medzi nedostatky polymerizačných metód patrí vznik vedľajších produktov často nebiokompatibilných a toxických (rezidua monomérov, iniciátory polymerizácie), preto je nutná rozsiahla purifikácia výsledných NPs. Požiadavkom metódy je tiež spustenie polymerizácie bez použitia voľných radikálov alebo ÚV, ktoré by mohli poškodiť proteíny, peptidy, nukleové kyseliny. Pre tieto nedostatky sú uprednostňované metódy prípravy NPs už z predom pripravených polymérov.[8]

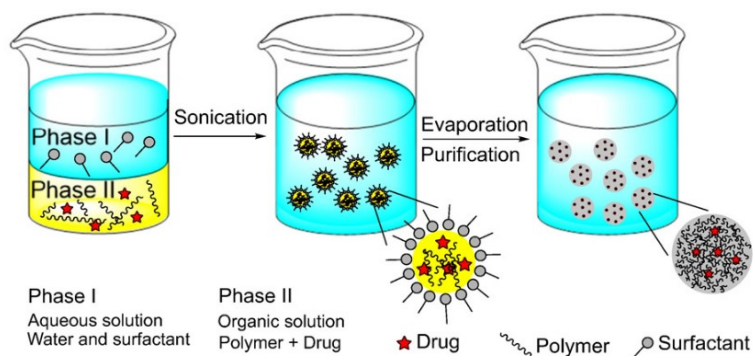
## 4.2 Metódy prípravy NPs z predom pripravených polymérov

### 4.2.1 Dvojkrokové metódy

Tvorba emulzifikačného systému je nasledovaná tvorbou NPs. Roztok polyméru v organickom rozpúšťadle je emulgovaný do vodnej fázy. S následnou tvorbou nanokvapiiek, z ktorých sa utvoria NPs počas odstraňovania organického rozpúšťadla, čo je zapríčinené precipitáciou polyméru. U týchto metód je liečivo spravidla pridané k roztoku polyméru v organickom rozpúšťadle.[8]

#### 4.2.1.1 Emulzne-odparovacia metóda (Emulsification-solvent evaporation)

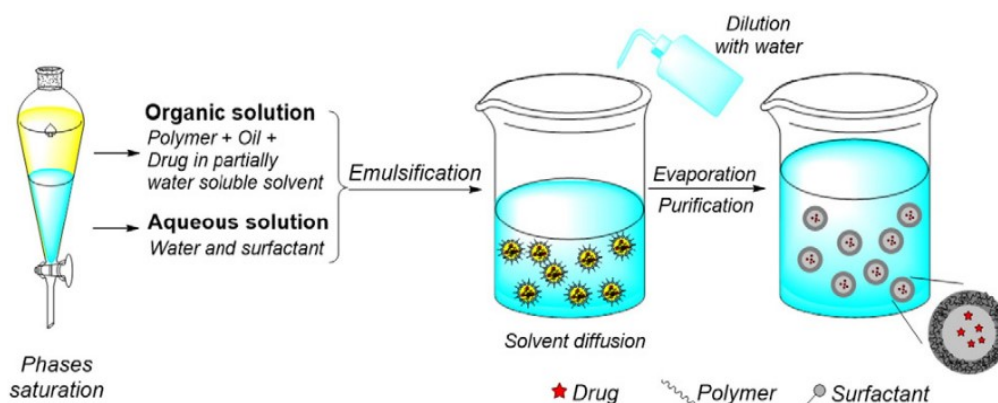
Pripravujú sa buď jednoduché emulzie typu o/v alebo zložené emulzie typu v/o/v. Emulzia typu o/v je vhodná pre hydrofóbne alebo pre vo vode slabo rozpustné liečivá, naopak emulzia typu v/o/v je vhodná pre vo vode dobre rozpustné liečivá.[9] Pre jednoduchú emulziu platí, že polymér je najprv rozpustený v prchavom rozpúšťadle (solvente), pridá sa liečivo, tento roztok je potom emulgovaný do vodnej fázy obsahujúcej surfaktant alebo iný emulgátor (želatínu, polysorbát). Vysokorýchlostnou homogenizáciou alebo za použitia ultrazvuku vzniká emulzia obsahujúca rozptýlené nanokvapky organickej fázy. Suspenzia NPs sa formuje počas odparovania solventu, ktoré difunduje kontinuálnou vonkajšou vodnou fázou emulzie. Odparovanie prebieha buď súvislým miešaním na magnetickej miešačke pri laboratórnej teplote, alebo pod zníženým tlakom. Pre zloženú emulziu typu v/o/v platí podobný postup s rozdielom, že liečivo je rozpustené vo vodnej fáze, táto vodná fáza je pridaná do organickej fázy za stáleho miešania s následnou tvorbou primárnej emulzie v/o. Táto primárna emulzia v/o je potom emulgovaná do vodného roztoku za tvorby emulzie v/o/v. S následným odparením rozpúšťadla z tejto zloženej emulzie sa formujú NPs. Nastavením parametrov tohto procesu ako sú napr. teplota, metóda odparovania, pomer objemov organickej a vodnej fázy, koncentrácia surfaktantu, Mw polyméru sa dajú pripraviť NPs s rôznymi vlastnosťami.[8, 17]



Obrázok 2 - Emulzne-odparovacia metóda prípravy NPs [8]

#### 4.2.1.2 Emulzne-difúzna metóda (Emulsification-solvent diffusion)

Touto metódou sa tvorí emulzia o/v. Vnútrnú fázu predstavuje organické rozpúšťadlo čiastočne miešateľné s vodou, v ktorom je rozpustený polymér a liečivo. Vodná fáza obsahuje surfaktant. Dôležité pre tento postup je, aby na začiatku tohto procesu bola vodná fáza a organické rozpúšťadlo vzájomne nasýtené pri laboratórnej teplote, aby bola medzi nimi termodynamická rovnováha. Po vytvorení emulzie vysokorýchlostnou homogenizáciou sa emulzia zriedi väčším množstvom vody, čo indukuje difúziu organického rozpúšťadla z dispergovaných kvapiek emulzie do vonkajšej vodnej fázy v dôsledku narušenia termodynamickej rovnováhy systému. Výsledkom tohto deja je vznik NPs. Rozpúšťadlo je nakoniec eliminované odparením alebo vakuovou destiláciou. Tento typ metódy dáva vznik menších NPs, než ako je tomu u emulzne-odparovacej metódy. Všeobecne takto vznikajú nanosféry, avšak pri pridaní malého množstva oleja do organickej fázy sa tvoria nanokapsule. Rozpúšťadlo je nakoniec eliminované odparením alebo filtráciou NPs. Výhodami metódy sú vysoká enkapsulačná účinnosť, vysoká reproducibilita, NPs s úzkou veľkostnou distribúciou.[8, 17, 18]

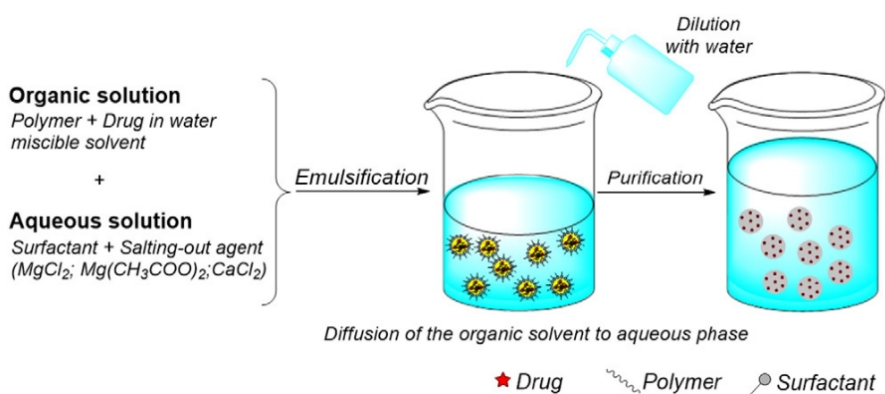


Obrázok 3 – Emulzne-difúzna metóda prípravy PNPs [8]



### 4.2.1.3 Emulzne-reverzná vysol'ovacia metóda

Emulzne-difúzna metóda je modifikáciou tejto metódy. Rozdiel je v kompozícii emulzie, vnútornú organickú fázu tvorí opäť s vodou miešateľné rozpúšťadlo, ale vonkajšiu vodnú fázu tvorí vodný gel obsahujúci vysol'ovacie činidlo a koloidný stabilizátor. Používané vysol'ovacie činidlá sú elektrolyty ( $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ , acetát horečnatý) alebo aj neelektrolyty (sacharóza). Ako koloidný stabilizátor sa môže použiť napríklad PVP. Miešateľnosť organickej fázy a vodnej fázy je znížená nasýtením vodnej fázy vysol'ovacím činidlom, čo umožní tvorbu emulzie o/v aj pri vzájomnej miešateľnosti týchto fáz. Zriedenie tejto emulzie prebytkom vody podporí difúziu organického rozpúšťadla do vodnej fázy za súčasnej precipitácie polyméru a vzniku NPs. Podmienka úplnej miešateľnosti organického rozpúšťadla s vodou nie je nevyhnutná, ale uľahčí tento proces tvorby NPs. Na záver sa eliminuje organického rozpúšťadla aj vysol'ovacie činidlo. Výhodou metódy je vyhnutie sa použitiu chlórovaných organických rozpúšťadiel, ktoré sú ekologicky škodlivé. Nevýhodami sú použitie výhradne pre enkapsuláciu lipofilných liečiv a nutnosť intenzívneho prečistenia od vysol'ovacích činidiel.[8, 17]



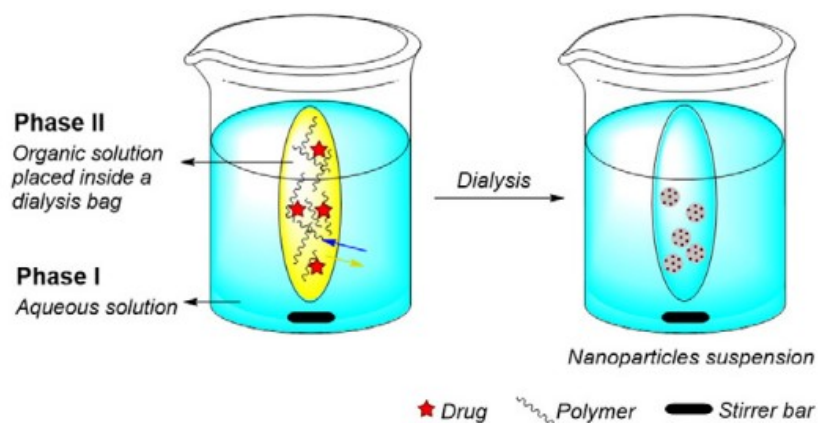
Obrázok 4 – Emulzne-reverzná vysol'ovacia metóda prípravy PNPs [8]

### 4.2.2 Jednokrokové metódy prípravy

U týchto metód tvorba NPs vzniká v jednom kroku a tým je precipitácia polyméru.

#### 4.2.2.1 Metóda využívajúca princíp dialýzy

Všeobecne sa používa pre prípravu NPs o malej veľkosti a úzkou veľkostnou distribúciou. Podmienkou je vzájomná miešateľnosť oboch fáz, vonkajšej i vnútornej. Polymér je rozpustený aj s liečivom v organickom rozpúšťadle (solvente) a tvorí vnútornú fázu, táto fáza je umiestnená do dialyzačného vrečka alebo trubičky tvorenej polopriepustnou membránou s presne určenou veľkosťou jej pórov, aby polymér neprešiel touto membránou. Dialýza prebieha proti vonkajšej fáze, v ktorej je polymér nerozpustný (nonsolvent). Prechod solventu z dialyzačného vrecúška a prechod nonsolventu dovnútra vrecúška utvorí zmes, v ktorej polymér stráca rozpustnosť a precipituje za formácie NPs. [8, 17, 19]



Obrázok 5 – Metóda prípravy PNPs využívajúca princíp dialýzy [8]

#### 4.2.2.2 Metóda sprejového sušenia

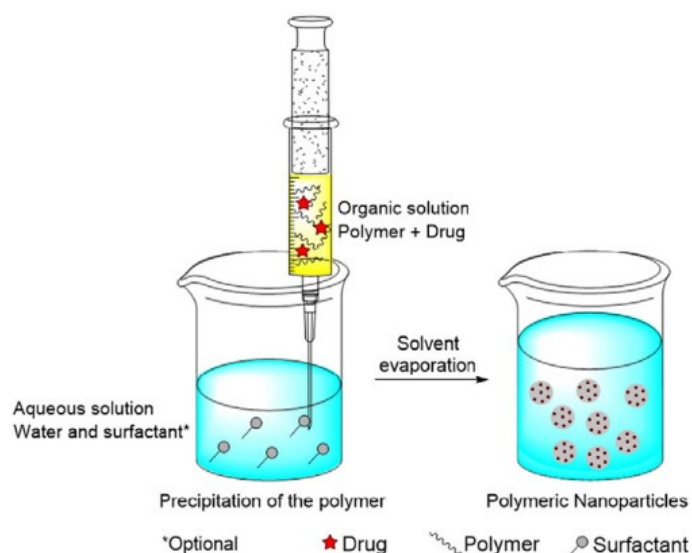
Je alternatívou konvenčných prípravných metód PNPs. Ponúka mnoho výhod, rýchlosť a jednoduchosť prevedenia. Pri tejto metóde sa najprv pripraví emulzia typu v/o, ktorá je nastrekovaná do prúdu horúceho vzduchu, čo vedie k tvorbe NPs. Nevýhodou je adhézia vytvorených NPs na steny prístroja.[17]

### 4.2.2.3 Technológia superkritických kvapalín

Metóda je šetrnejšia k životnému prostrediu a produkuje PNPs o vysokej čistote s menším množstvom stopových nečistôt. Využíva rapidnu expanziu superkritických roztokov (roztok polyméru v superkritickej kvapaline, ktorou je napr. CO<sub>2</sub>) vo vzduchu alebo v kvapaline za súčasnej formácie NPs.[17, 19]

### 4.2.2.4 Nanoprecipitačná metóda

Metóda po prvý krát vyvinutá Fessim a kolektívom. Princípom metódy je depozícia polyméru na medzipovrchovom rozhraní organickej vnútornej fázy a vonkajšej vodnej fázy pri prechode rozpúšťadla z organickej do vodnej fázy. Polymér je rozpustený v organickom rozpúšťadle strednej polarita, ktoré je miešateľné s vodou (acetón, DMSO, ethanol, methanol), do tohto roztoku sa pridá liečivo. Tento roztok nám tvorí vnútornú fázu, ktorá je následn pridávaná vo vonkajšej vodnej fázy, toto pridanie môže byť prevedené viacerými spôsobmi: v jednom kroku - „one-shot“, postupne - „step-wise“ alebo po kvapkách - „drop-wise“. Vďaka rýchlej spontánnej difúzii organického rozpúšťadla do vodnej fázy začne polymér okamžite precipitovať za vzniku NPs. Všeobecne sa organická fáza pridáva do vodnej, ale nie je to zákonitosťou. Do vodnej fázy je možné pridať i surfaktanty, avšak nie je to nevyhnuté pre samotnú tvorbu NPs. Je možné použiť i zmesi rozpúšťadiel pre tvorbu vnútornej fázy a taktiež zmesi pre vytvorenie vonkajšej fázy, pokiaľ podmienky rozpustnosti a miešateľnosti ostanú zachované. Rôznym nastavením podmienok prípravy ako sú typ, koncentrácia a Mw polyméru, pomer jednotlivých fáz, miera naočkovania vnútornej fázy do vonkajšej a rýchlosť miešania môžu ovplyvniť výsledné vlastnosti vzniknutých NPs. Napríklad bolo popísané pri zvýšení koncentrácie a Mw polyméru súčasné zväčšenie veľkosti NPs, ktoré sa pripisuje zvýšenej viskozite organickej fázy, ktorá bráni difúzii rozpúšťadla s výsledkom nanokvapiiek o väčšej veľkosti. Metóda má jednoduché prevedenie a využíva sa pre enkapsuláciu hydrofóbných liečiv.[8, 17]



Obrázok 6 – Nanoprecipitačná metóda prípravy PNPs [8]

## 5. Dôležité charakteristiky nanočastíc ovplyvňujúce ich účinok

Medzi najdôležitejšie vlastnosti NPs ovplyvňujúce ich správanie in-vitro aj in-vivo sú **veľkosť**, **index polydispersity** suspenzie NPs, **tvar**, **zeta-potenciál** a **povrchová úprava** NPs. Len malé zmeny v týchto vlastnostiach môžu predstavovať veľké zmeny v ich účinku, preto je potrebné ich počas formulácie sledovať a prípadne upravovať rôznymi obmenami postupov prípravy.[20]

### 5.1 Veľkosť NPs

Od veľkosti NPs sa odvíja ich in-vivo distribúcia, biologický osud a toxicita. Veľkosť má navyše vplyv na stabilitu NPs systému, uvoľňovanie liečiva a „drug loading“.[6] Je dôležité, aby NPs mali optimálne zvolenú veľkosť, pretože príliš malé alebo príliš veľké NPs sú predčasne eliminované z tela (glomerulárnou filtráciou – príliš malé častice, pohltitím RES – veľké častice) a tak nemôžu dosiahnuť svoj cieľ.[20] Výnimkou je, ak je požadované NPs zacieliť práve na RES. Menšie NPs disponujú väčším povrchom než väčšie NPs, čo spôsobí rýchlejšie uvoľňovanie liečiva, ktoré sa nachádza na povrchu

alebo v blízkosti povrchu nanočastice. Čo sa týka stability, u častíc s menšou veľkosťou hrozí väčšie riziko agregácie.[6]

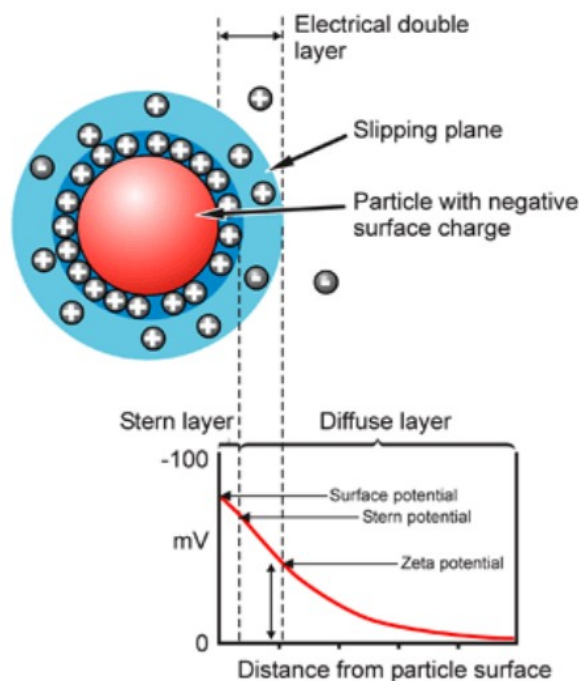
## 5.2 Index polydisperzity (pDI)

Poskytuje nám informáciu o veľkostnom zastúpení NPs v suspenzii – o miere neuniformity disperzie. Všeobecne, čím viac NPs o rôznych veľkostiach sa nachádza v disperzii, tým je pDI vyšší. Je dôležitým parametrom, pretože polydisperzná sústava môže vykazovať neočakávané odchýlky v predpokladanom správaní nanoformulácie (bezpečnosť, stabilita, účinnosť).[20, 21] Je bezrozmernou veličinou, ktorej hodnoty sa pohybujú v rozmedzí 0-1. Hodnoty pod 0,05 vyjadrujú, že sústava je vysoko monodisperzná, zatiaľ čo hodnoty vyššie ako 0,7 popisujú sústavu s veľmi širokou distribúciou veľkosti NPs. Pre PNPs je všeobecne akceptovateľná hodnota pDI do 0,2.[21]

## 5.3 Zeta-potenciál (elektrokinetický potenciál)

Zeta-potenciál je nepriamym vyjadrením povrchového náboja častice v prostredí hydrofilnej (vodnej) kvapaliny.[11] Častica v hydrofilnom (vodnom) prostredí vďaka disociácii povrchových funkčných skupín vykazuje určitý povrchový náboj, ktorý je obalený v elektrickej dvoj-vrstve. Táto elektrická dvoj-vrstva pozostáva zo Sternovej vrstvy a difúznej vrstvy. Sternova vrstva predstavuje tenkú, tesne priliehajúcu a rigidnú vrstvu opačne nabitých iónov, než má častica. Táto tenká vrstva však nestačí pre vyrovnanie nábojov a preto na Sternovu vrstvu nadväzuje vrstva difúzna, ktorá má už menej organizovanú štruktúru, je pohyblivejšia a je tvorená obomi, kladnými i zápornými iónmi, v prevahe sú však ióny opačne nabité než je častica – protiióny (vyrovnávajú náboj častice). S rastúcou vzdialenosťou však hustota týchto protiiónov klesá a rastie koncentrácia opačne nabitých iónov až sa ich koncentrácie vyrovnajú. Difúznu vrstvu tvoria dve časti, medzi ktorými sa nachádza klzná vrstva, tá oddeľuje pohyblivé ióny roztoku od iónov nepohyblivých, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou častice. ZP teda predstavuje potenciálový rozdiel medzi klznou vrstvou a disperzným médiom.[22]

ZP je dôležitým parametrom pre predpovedanie stability koloidných disperzií a in-vivo správanie NPs (interakcie s biologickými štruktúrami).[8] Jeho hodnota závisí na kompozícii NPs a vlastnostiach roztoku, v ktorom sa častica nachádza (iónovej sile, pH). NPs, ktoré sú slabo nabité alebo nenabité vykazujú proagregačné správanie a tvoria tak nestabilnú disperziu, preto je pre stabilitu disperzie dôležité aby boli častice dostatočne nabité a vzájomne sa odpudzovali. Dôležité je poznamenať, že význam ZP klesá s rastom veľkosti častice. Disperzia, obsahujúca častice so ZP hodnotnou +30mV alebo -30mV je pokladaná za stabilnú, pričom so zvyšovaním hodnoty nad +30mV a znižovaním pod -30mV sa stáva sústava ešte viac stabilnejšou. Rozmedzie hodnôt ZP medzi -30mV až +30mV je pokladané za nestabilné.[22, 23] Čím nižšie hodnoty ZP častica vykazuje, tým je menšia pravdepodobnosť, že bude rozpoznávaná plazmatickými proteínmi a dlhšie zotrúva v plazme. Dôležité je spomenúť, že častice interagujú s biologickými štruktúrami na základe svojich ZP, nie na základe ich povrchových nábojov.[24]



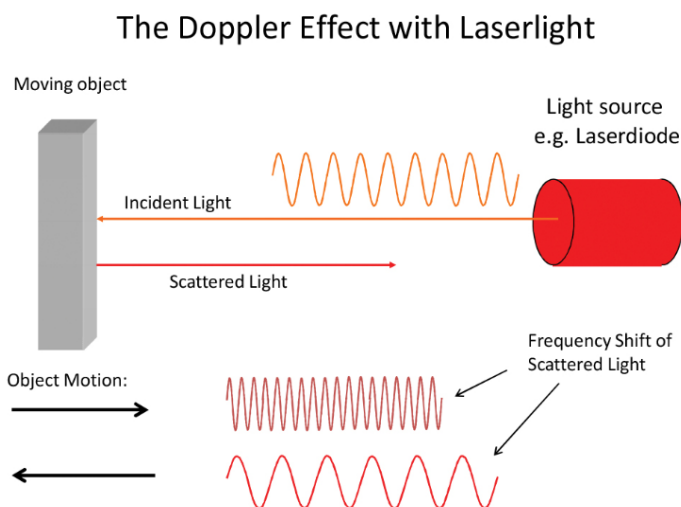
Obrázok 7 – Elektrická dvojrústva solvatovanej častice a jej ZP [24]

## 6. Meranie veľkosti a zeta-potenciálu NPs

### 6.1 Meranie veľkosti NPs

#### 6.1.1 DLS – Dynamický rozptyl svetla

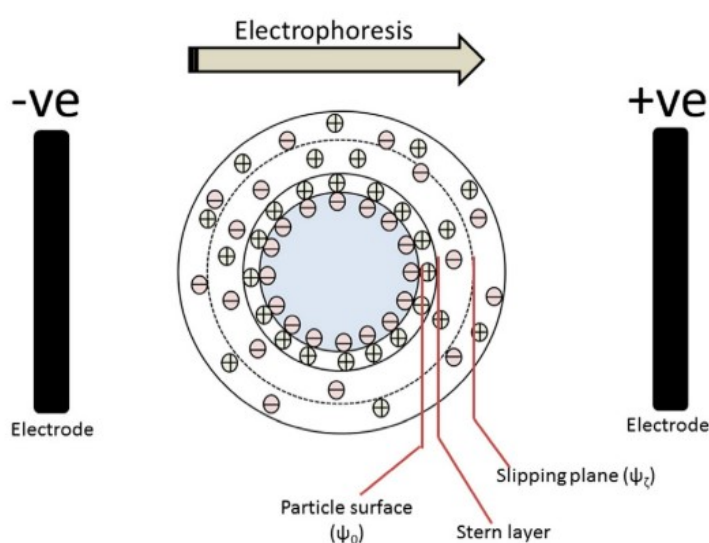
V koloidnej disperzii sa NPs pohybujú difúznym Brownovým pohybom, ktorého rýchlosť závisí na veľkosti častíc, teplote a viskozite média. Disperzia je počas merania ožiarená monochromatickým laserovým lúčom, kde pohybujúce sa NPs rozptyľujú toto svetlo a menia jeho frekvenciu (Dopplerov posun). Tieto zmeny intenzity žiarenia v čase (predstavujú rýchlosť častice) sú spôsobené práve Brownovým pohybom častíc. Menšie častice spôsobujú väčšiu fluktuáciu intenzity žiarenia než tie väčšie, pretože sa rýchlejšie pohybujú. Naopak väčšie častice sa pohybujú pomalšie, a tak v rovnakom časovom intervale dôjde u nich k menšiemu počtu výkyvov intenzity žiarenia. Zo získaných údajov sa matematickým odvodením z korelačnej funkcie prístroja zistí difúzny koeficient potrebný pre Einstein-Stockesovu rovnicu, z ktorej sa následne vypočítajú hodnoty hydrodynamického priemeru NPs. DLS predpokladá, že častice sú sférického tvaru. Výsledná veľkosť častice je vrátane jej solvátového obalu (hydrodynamický priemer). Touto metódou nie je vhodné merať častice väčšie ako 1000 nanometrov a vzorky absorbujúce žiarenie v oblasti, ktorá je použitá pri metóde. [11, 22, 25–27]



Obrázok 8 – Dopplerov efekt rozptylu laserovho lúča [28]

## 6.2 Meranie zeta-potenciálu NPs

Využíva princíp elektroforézy, pretože nie je priamo merateľným. Pôsobením vonkajšieho elektrického poľa na disperziu nabitých NPs dochádza k ich pohybu k opačnej nabitej elektróde. Čím má častica väčší náboj, tým rýchlejšie sa pohybuje smerom k opačne nabitej elektróde. Táto elektroforetická mobilita sa dá zmerať dvomi metódami – elektroakusticky, alebo využitím Dopplerovho posunu (ELS).[25]

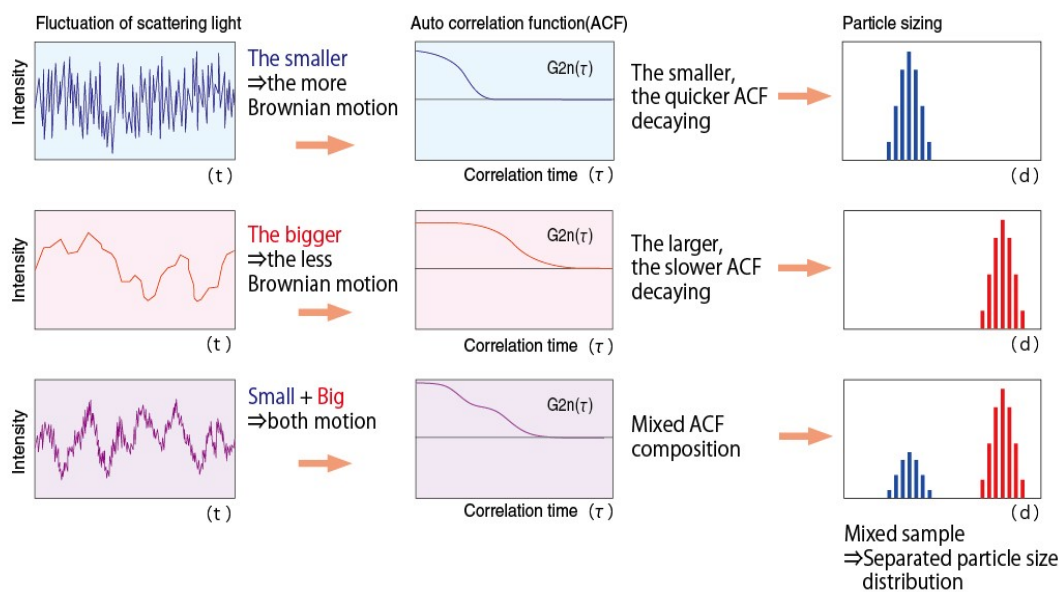


Obrázok 9 – Elektroforetická mobilita nabitej častice [25]

### 6.2.1 ELS – Elektroforetický rozptyl svetla

Mobilné NPs, ktoré sa pohybujú pôsobením vonkajšieho elektrického poľa na disperziu, spôsobujú rozptyl laserového lúča. Takto rozptýlený lúč vykazuje odlišnú frekvenciu (vlnovú dĺžku) od pôvodného dopadajúceho lúča a tento frekvenčný posun je známy tiež ako Dopplerov posun. Na základe fluktuácie intenzity žiarenia tohto posunu je odhadovaná rýchlosť častíc a následnými matematickými výpočtami je získaná hodnota ZP častíc. Využíva v podstate rovnaký princíp ako DLS, ale zdrojom pohybu častíc je v tomto prípade elektroforetická mobilita.[25, 29]





Obrázok 10 – Princíp DLS merania a výpočtu veľkosti NPs [30]

## 7. Povrchová úprava NPs

NPs v závislosti na ich kompozícii a okolitom disperznom médiu vykazujú povrchové vlastnosti ako sú ZP, hydrofilitu / hydrofobicitu, ktoré ovplyvňujú ich stabilitu, imunogenicitu, preferenčné miesto biodistribúcie, BAV a toxicitu. Vhodnou úpravou povrchu sa dajú tieto vlastnosti ovplyvniť s cieľom dosiahnutia žiadaných parametrov NPs pre daný účinok.[31]

Medzi najčastejší typ modifikácie povrchu patrí jeho zvýšenie hydrofility, pretože hydrofóbny povrch NPs vedie k ich rozpoznaní plazmatickými proteínmi po i.v. podaní, následnej opsonizácii a fagocytóze, čo skráti ich cirkulačný polčas. Zvýšenie hydrofility sa najčastejšie dosahuje pokrytím povrchu NPs s hydrofilnými polymérmi alebo surfaktantmi, najčastejšie PEGyláciou. Toto PEG pokrytie môže byť dosiahnuté elektrostatickou adsorpciou alebo kovaletným pripojením, ev. tvorbou ko-polymérov s hydrofilnými segmentami. Niekedy však toto pohlcovanie hydrofóbnych NPs je využívané pre zacielenie liečiva práve do RES. [14, 32]

Dekorácia NPs je taktiež využívaná pre optimalizáciu ZP a teda stability nanodisperzie. Stabilizovať disperziu vo vodnom roztoku je možné elektrostaticky alebo

stéricky. So ZP súvisia aj interakcie s bunkami – internalizácia NPs a ich rozpoznávanie RES. Všeobecne sú rozpoznávané viac elektrostaticky nabité NPs, než tie neutrálne. NPs s kladnými hodnotami ZP vykazujú lepšie vychytávanie väčšinou bunkových línií (kvôli elektrostatickým interakciám s negatívne nabitou membránou buniek), avšak môže to predstavovať problém kvôli nedostatočnej špecifite k cieľovým bunkám a následným toxickým účinkom.[8, 14, 33]

Špecifickejšie úpravy povrchu naviazaním ligandov (napr. monoklonálne protilátky) sú využívané v aktívnom targetingu. Taktiež sa využívajú peptidové sekvencie, tzv. CPP (cell-penetrating peptides), ktoré sú odvodené od virálnych štruktúr a umožňujú zlepšenú penetráciu NPs do buniek. [33]

## **8. Cielená biodistribúcia**

Metóda používaná na zaistenie preferenčnej lokalizácie liečiva v predom určenom tkanive alebo populácii buniek za účelom zlepšenia terapeutického účinku, ktorý je špecifickejší a tak menej ovplyvňuje zdravé bunky (necieľové štruktúry). Využíva samotné nosiče alebo časticové nosiče (NPs, mikročastice), ktoré dopravia liečivo do cieľovej štruktúry. Vlastnosti týchto nosičov sú využité pre špecifickú biodistribúciu a možnosť riadeného uvoľňovania. Uplatňujú sa dve hlavné stratégie dopravy liečiv (tzv. „targetingu“) – pasívny a aktívny targeting.

### **8.1 Pasívny „targeting“**

Využíva selektívnu kumuláciu liečiva v cieľovej štruktúre, ktorá vykazuje typické charakteristiky (patologické alebo fyziologické) na rozdiel od ostatných tkanív. Najbežnejším príkladom je kumulácia liečiva v nádorovom tkanive využívajúca EPR efekt (skratka - enhanced permeation and retention). EPR charakterizuje nádorové patologicky zmenené tkanivo, na rozdiel od zdravého, so zvýšenou fenestráciou endotelu krvných kapilár a zníženou lymfodrenážou. Takto zvýšená fenestrácia kapilár umožní

NPs vďaka ich malej veľkosti preniknúť dovnútra, ale zároveň zníženou lymfodrenážou dochádza ku zníženému odstraňovaniu týchto NPs z tohto miesta a ich retencii.[17, 34] Ako ďalší príklad je možné uviesť preferenčné vychytávanie NPs s hydrofóbnym povrchom v RES. Inými slovami, pasívny „targeting“ využíva fyzikálne-chemické vlastnosti častíc pre preferenčnú kumuláciu v určitej štruktúre na základe typických vlastností tejto štruktúry.[34]

## **8.2 Aktívny „targeting“**

Využíva špecifické rozpoznanie medzi molekulou exprimovanou typicky pre určité tkanivo (alebo priamo cieľovou molekulou) a ligandom, ktorý je naviazaný na nosič resp. časticu nosiacu liečivo. Pre tieto účely sa ako ligandy využívajú hlavne monoklonálne protilátky a ich fragmenty, antigény, peptidy, nukleové kyseliny. Naviazaním ligandu na receptor sa NPs internalizuje do bunky alebo sa priamo naviaže na cieľovú štruktúru. [35]

Problémom u tohto druhu terapie môže byť in-vivo naviazanie sérových proteínov, ktoré utvoria tzv. korunu okolo NPs, ktorá zakryje tieto povrchové špecifické ligandy a môže ich tak „ukryť“ pred cieľovou molekulou.[36]

Špeciálnym typom aktívneho targetingu je nasmerovanie kovových magnetických NPs externým magnetickým poľom do miesta pôsobenia. [35]

## 9. Experimentálna časť

### Poznámky k riešenej problematike

Formulácia nanočasticových, biodegradabilných, biokompatibilných systémov využiteľných v biologických disciplínach má hlavný cieľ v dosiahnutí cieľenej interakcie s biologickým prostredím na požadovanej štrukturálnej úrovni v optimálnej intenzite po optimálnu dobu. Pre dosiahnutie týchto základných parametrov je nutné splniť celú radu kritérií. Medzi tieto kritériá patria optimálne parametre povrchu. V tejto práci bol vývoj NPs smerovaný predovšetkým na modifikáciu povrchových parametrov charakterizovaných ZP a stabilitou ZP po dobu 20hodín.

Nosičom NPs boli PLGA alebo vetvený polyester odvodený od ko-polyméru kyseliny mliečnej a glykolovej. Oligomérene reťazce tohto ko-polyméru boli naviazané na molekule tripentaerythritolu za vzniku vo vode nerozpustnej pomaly bobtnajúcej semipolárnej polymérnej štruktúry. Polymér je dobre rozpustný v DMSO, rovnako ako aj RIFA, ktorý bol pre realizáciu experimentov cieľene vybraný v rôznych koncentráciách ako vhodné modelové, prípadne i potenciálne liečivo. NPs bolo snahou stabilizovať vo vodnom prostredí kationickými tenzidmi, úpravou pH a prípadne tiež dekorovaním adsorpciou polymérov.

Pre zvýšenie niektorých špecifických interakcií v biologických systémoch je vhodné alebo nutné, aby NPs mali optimálny povrchový náboj. Preto boli aktivity smerované na modifikáciu tohto náboja. K tomu boli zvolené tri prístupy. Jedným bolo využitie kationických tenzidov CET alebo DMAB, druhý prístup vychádzal z úpravy hodnoty pH a tretí prístup spočíval v dekorovaní NPs anionickými biopolymérmí, ako je HA a XK.

## **9.1 Zoznam použitej laboratórnej techniky**

Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments

PMMA 2,5ml makro kyvety PLASTIBRAND

Kapilárne cely DTS 1060 Malvern

Spektrofotometr Helios Alfa

ÚV kyvety High Precision Cell 6030 Hellma Analytics

Centrifuga Fischer Scientific Micro Z

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

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

Automatické pipety Eppendorf Research plus

Ultrazvuková čistička BANDELIN SONOREX SUPER 10 P

Laboratórny mixér s pádlom IKA-WERKE EUROSTAR R power 50-2000 ot./min

Váhy Kern PLE, max 420 g, d = 0,01 g

Analytické váhy OHAUS Discovery Vitrum max. 210g min. 0,001g

pH meter - Hanna instruments HI221

## 9.2 Zoznam použitých chemikálií a ich použité skratky

AP – aqua purificata - FaF UK HK

Acidum citricum monohydricum – Dr. Kulich Pharma s.r.o. HK – CAS: 5949-29-1

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát – PENTA – CAS: 10039-32-4

CET - cetrimid (N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid) – Merck- CAS: 8044-71-1

DMAB - didodecyldimethylammonium bromide – Sigma-Aldrich, CAS: 3282-73-3

DMSO – dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, CAS: 67-68-5

HA – kyselina hyalurónová – Acetrad – CAS: 9004-61-9

Hydroxid sodný – PENTA – CAS: 1310-73-2

Kyselina chlorovodíková 35% - Lalhema, a.s – CAS: 7647-01-0

PLGA – kopolymér kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny glykolovej (50:50) – FaF UK HK

RIFA – rifampicín – Sigma-Aldrich – CAS: 13292-46-1

T3 – terpolymér kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny glykolovej vetvený na 3%

tripentaerythritole – originálne syntetizovaný na FaF UK HK

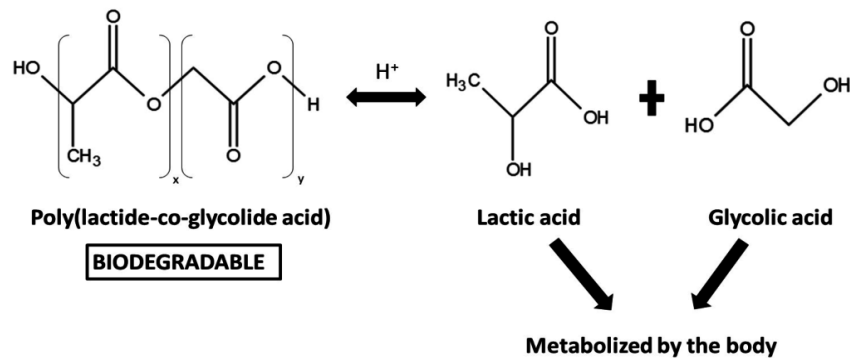
XK – xantánová klovatina – Sigma-Aldrich – CAS: 11138-66-2

### 9.3 Charakteristika použitých polymérov

Na samotnú tvorbu NPs boli použité biodegradabilné alifatické polyestery – PLGA a T3. Na povrchovú modifikáciu boli použité prírodné polysacharidy – HA a XK.

#### PLGA

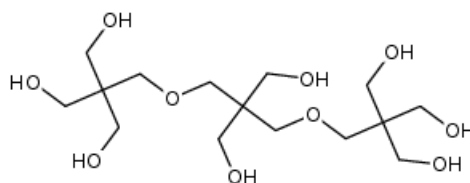
Je lineárnym kopolymérom  $\alpha$ -hydroxykyselín, kyseliny D,L-mliečnej a kyseliny glykolovej. Zastúpenie týchto zložiek pri PLGA označení je všeobecne dané rovnakým zastúpením oboch týchto zložiek (50:50). Zmenou tohto pomeru by sa pozmenili i vlastnosti ko-polyméru podľa vlastností týchto monomérnych jednotiek. PLGA vďaka možnosti poskytnutia riadeného uvoľňovania, nízkej cytotoxicite, biokompatibilite, dobrej spracovateľnosti a možnosti využitia pre enkapsuláciu rôznych liečiv bola schválená FDA a EMA pre použitie v humánnej medicíne. Hydrolyzou esterových väzieb vzniklé monoméry kyselín sú endogénne metabolizované vstupom do Krebsovho cyklu na jednoduché, ľahko odstrániteľné molekuly –  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . [17, 37]



Obrázok 11 – Štruktúra PLGA a jej monoméry[38]

#### T3

Je vetveným terpolymérom ekvimolárneho množstva kyseliny D,L-mliečnej (48,5%) a glykolovej (48,5%) vetvených na 3% tripentaerythritol. Miestom vetvenia je vznik esterových väzieb medzi hydroxylovými skupinami tripentaerythritolu a karboxylovými koncami PLGA. T3 má voľné hlavne hydroxylové skupiny PLGA.



Obrázok 12 – Štruktúra tripentaerythritolu[39]

Polymér	Mn [g/mol] <sup>a)</sup>	Mw [g/mol] <sup>b)</sup>	g' (Mw) <sup>c)</sup>
PLGA (50:50)	1700	2400	-
T3	5300	17400	0,43

a) číselne stredná molárna hmotnosť b) hmotnostne stredná molárna hmotnosť c) vetviaci pomer

Tabuľka 1 - Charakteristiky použitých polymérov na tvorbu NPs

## HA

Patrí do skupiny polysacharidov, konkrétne sa jedná o lineárny glykosaminoglykán tvorený opakujúcimi sa jednotkami N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny D-glukuronovej. Je to biodegradabilný, biokompatibilný, netoxický a neimunogenický polymér vyskytujúci sa prevažne v extracelulárnej matrix spojivového tkaniva. Prakticky sa vyskytuje vo všetkých bunkách stavovcov. HA je vo vode rozpustná tvoriaca vysoko viskózný roztok. Jej Mw dosahujú až niekoľko miliónov. Pri fyziologickom pH sú karboxylové skupiny prevažne ionizované (hyaluronan). Dôležitú rolu má i v intracelulárnych funkciách – proliferácia, migrácia buniek a modulácia vnútrobunkovej signalizácie (cez rôzne typy HA-receptorov). Najznámejším je CD44-receptor exprimovaný na povrchu mnoho typov rakovinových buniek, HA s týmto receptorom interaguje a tak sa stáva atraktívnym kandidátom pre aktívny tarteging protinádorových liečiv a diagnostik.[37]

## XK

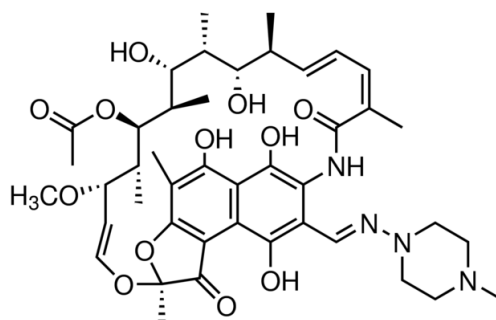
XK je mikrobiálny anionický polysacharid, vzniká aeróbnou fermentáciou pôsobením baktérie Xanthomonas. Je biodegradabilný, biokompatibilný, netoxický a nesenzitizujúci. Má dobrú rozpustnosť v horúcej i studenej vode, avšak je potreba ho počas rozpúšťania intenzívne miešať, aby nevznikali zhluky. Má vysokú Mw a tvorí



vysoko viskózne roztoky už pri malých koncentráciách. Jeho štruktúrna jednotka pozostáva z pentasacharidu tvoreného 2 molekulami D-glukózy spojenými väzbou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (tvoria hlavný reťazec), na tento hlavný reťazec je napojená vetva trisacharidovej časti (manóza-kyselina glukuronová- manóza) s pyruvylovými alebo acetylovými koncami. Má mnoho voľných hydroxylových a karboxylových skupín.[40–42]

## 9.4 Rifampicín

Rifampicín je širokospektré makrocyclické antibiotikum pôsobiace na G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> baktérie, špeciálne na *Mycobacterium tuberculosis*. Vzhľadom na rýchly vznik rezistencie baktérií je použitie obmedzené na liečbu mykobakteriálnych infekcií a to do kombinácie s ďalšími liečivami. Inhibuje bakteriálnu DNA-dependentnú-RNA-polymerázu tvorbou stabilného komplexu s týmto enzýmom. Je baktericídny a pôsobí jak na extracelulárne, tak i intracelulárne baktérie. Je veľmi stabilný v DMSO a pomerne stabilný i vo vode. Je to zwitteriónová zlúčenina obsahujúca kyslé hydroxylové skupiny a bazický N v piperazínovom cykle.[43]



Obrázok 13 – Štruktúra rifampicínu [44]

## **9.5 Postup prípravy**

### **9.5.1 Samotný postup prevedenia prípravy NPs a testovania NPs**

NPs boli pripravené nanoprecipitačnou metódou.

Predom pripravená vnútorná fáza bola pridaná do vonkajšej fázy metódou „one-pot“, teda naraz, za súčasného miešania na magnetickej miešačke pri laboratórnej teplote po dobu 30 minút. Boli použité miešadlá buď krížové alebo oválne v 25ml kadičkách. Niektoré vzorky boli dekorované s roztokmi polymérov HA a XK.

Následne boli u pripravených vzoriek zmerané hodnoty veľkosti častíc, pdI, a zeta potenciál. U niektorých vzoriek, ktoré aglomerovali počas procesu prípravy neboli skúmané tieto parametre. Následne bola prevedená centrifugácia predom odobratých množstiev z týchto vzoriek, sediment predstavujúci NPs bol rozpustený v DMSO a bola zmeraná absorbanca týchto roztokov na UV-spektrofotometre. Podľa kalibračnej krivky zostrojenej z predchádzajúcej práce, na ktorú táto diplomová práca nadväzuje bola zistená koncentrácia liečiva v roztoku rozpustených nanočastíc a následne vypočítaná enkapsulačná účinnosť celého procesu.

### **9.5.2 Príprava zásobných roztokov polymérov použitých na prípravu NPs**

#### **T3, PLGA**

Boli pripravené zásobné roztoky polymérov, ich rozpúšťaním v DMSO pri teplote 50°C na magnetickej miešačke až do vytvorenia čírych roztokov. Tieto zásobné roztoky boli následne riedené s DMSO na potrebné koncentrácie.

### **9.5.3 Príprava zásobných roztokov polymérov použitých na dekoráciu NPs**

#### **HA**

Bol pripravený zásobný roztok termicky degradovanej HA v HCl a následne bol tento zásobný roztok neutralizovaný roztokom 10% NaOH v rôznych časových odstupoch od ukončenia termickej degradácie (neutralizácia bezprostredne po ukončení termickej degradácie, po 4 dňoch od termickej degradácie, po 5 dňoch od termickej degradácie). Tento zásobný roztok bol uskladňovaný v chladničke pri teplote 3°C medzi jednotlivými

neutralizáciami s výnimkou neutralizácie, ktorá nastala tesne po odstavení z tepelného zdroja.

0,05g HA sa rozpustilo v 10ml 1-molárneho roztoku HCl a bola prevedená termická degradácia HA pri teplote 65-70°C po dobu 4 hodín v uzavretom opodeldoku za stáleho miešania. Následne bol tento roztok neutralizovaný 10% roztokom NaOH na pH 7-8. Táto neutralizácia bola prevedená viackrát zo zásobného roztoku (z roztoku termicky degradovanej HA v HCl) a v rôznych časových intervaloch od ukončenia termickej degradácie. Degradácia prebiehala i počas skladovania zásobného roztoku, nakoľko tento roztok nebol v celom svojom množstve zneutralizovaný bezprostredne po ukončení termickej degradácie. U jednotlivých meraní bude presne špecifikované, po akej dobe prebehla neutralizácia zásobného roztoku.

### **Xantánová klovatina**

Boli pripravené 2 zásobné dekorovacie roztoky xantánovej klovatiny, z toho jeden bol vodný roztok xantánovej klovatiny, druhý bol podrobený termickej degradácii v kyslom prostredí HCl.

#### 1. Vodný roztok XK

Bol pripravený 1% zásobný roztok XK v čistenej vode, rozpúšťanie prebiehalo pri laboratórnej teplote až do úplného rozpustenia XK. Výsledný roztok mal vysokú viskozitu a tak bol riedený čistenou vodou až na 0,025% roztok. Tento 0,025% roztok XK bol použitý na dekoráciu povrchu NPs.

#### 2. Termicky degradovaný roztok XK

Bol pripravený 1% roztok XK v 1-molárnom roztoku HCl, keďže bol tento roztok vysoko viskóznym bol nariadený čistenou vodou na koncentráciu 0,5% XK v 0,5-molárnom roztoku HCl. Takto pripravený roztok bol následne podrobený termickej degradácii v kadičke s prikrytým vrchom za stáleho miešania pri teplote 61°C po dobu 5 hodín. Po ukončení termickej degradácie bol uchovaný v chladničke pri 3°C po dobu približne 16hodín. Potom bol roztok zriedený čistenou vodou až na výsledný 0,025% roztok XK v 0,025-molárnom roztoku HCl. Cieľom riedenia bolo dosiahnuť roztok s približne podobnou viskozitou ako bol predchádzajúci roztok HA. Tento výsledný roztok bol zneutralizovaný 10% roztokom NaOH na pH 7-8 a následne používaný na dekoráciu povrchu NPs.

#### **9.5.4 Príprava vonkajšej fázy**

Vonkajšiu fázu tvorila buď samotná čistená voda, roztok CET v DMSO, alebo fosfát-citrátový vodný roztok (FC-roztok) o rôznych hodnotách pH. FC roztok bol pripravený spoločným nariadením roztokov monohydrátu kyseliny citrónovej v čistenej vode a hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu v čistenej vode na presne stanovenú hodnotu pH (podľa tabuľky nariadenia fosfát-citrátového pufru uvedenej v prílohe tejto práce na strane č. 76) s následným overením hodnoty pH-metrom.

Vonkajšia fáza u niektorých vzoriek obsahovala i emulgátory. Použité boli kationické emulgátory CET a DMAB.

Vonkajšia fáza bola použitá v množstvách – 5ml, 9ml, 10ml.

#### **9.5.5 Príprava vnútornej fázy**

Vnútnú fázu tvoril roztok polyméru (PLGA alebo T3 v DMSO) a RIFA. Bola pripravená rozpustením rôznych množstiev RIFA v roztoku polyméru.

Vnútná fáza bola použitá v množstvách 1ml, 2ml.

#### **9.5.6 Dekorácia NPs**

Na dekoráciu NPs boli použité polyméry HA, XK. Tieto polyméry boli pridávané buď do vonkajšej fázy ešte pred pridaním vnútornej fázy alebo až po pridaní vnútornej fázy. A boli pridávané buď metódou „drop-wise“ (po kvapkách) alebo „one-pot“ (naraz), a pridávalo sa rôzne množstvo roztoku polyméru na dekoráciu – 0,1ml až 1ml.

#### **9.5.7 Meranie veľkosti a ZP NPs**

Meranie bolo prevádzané na prístroji Zetasizer Nano ZS, ktorý je schopný merať oba tieto skúmané parametre. Prístroj bol pred začiatkom merania spustený 30min, aby bol správne nakalibrovaný na teplotu 25°C. Na meranie veľkosti NPs boli použité kyvety z polymethylmethakrylátu, na meranie ZP bola používaná kapilárna cela DTS1070. Vzorky boli opatrne odoberané zo stredu vzoriek injekčnou striekačkou. Dôležité bolo,

aby vzorky nevykazovali prítomnosť prachových častíc alebo bublín, ktoré by mohli skresliť výsledky merania.

### **9.5.8 Centrifugácia**

Podmienky centrifugácie sa postupne upravovali z 15 000G, 18°C, 10 minút až na optimum 10 000G, 20°C, 30 minút. Centrifugovali sa 2ml odobrané zo vzoriek nanosuspenzií.

### **9.5.9 Spektrofotometria a určenie enkapsulačnej účinnosti (EE)**

Sediment NPs pochádzajúci z centrifugácie bol následne rozpustený v 2ml DMSO a bola zmeraná absorbanca týchto vzoriek pri 475nm (RIFA v tejto vlnovej dĺžke vykazoval najvýhodnejšiu absorbanciu). Ako slepá vzorka bol použitý DMSO. Pre každú vzorku boli prevedené 3 merania, ktoré sa spriemerovali. Z výsledných nameraných hodnôt absorbancie bola z rovnice kalibračnej krivky určená hodnota koncentrácie RIFA vo vzorkách [g/100ml] s následným prepočítaním na celkové množstvo liečiva enkapsulovaného do NPs celej disperzie [mg]. Toto výsledné množstvo enkapsulovaného liečiva bolo delené celkovým množstvom liečiva použitého na prípravu NPs a prevedením na percentuálnu hodnotu bola získaná EE celého procesu [%].

#### ***Rovnica kalibračnej krivky RIFA v DMSO: [45]***

$$y = 0,1841x + 0,0044$$

y.....Absorbancia

x.....c [g/100ml]

## 10. Výsledky a ich diskusia

### 10.1 Nedekorované NPs

#### 10.1.1 Modelové NPs – voľba typu polyméru a podmienok pre prípravu NPs

Vonkajšia fáza [9ml]: AP / CET v DMSO

Vnútrotná fáza [1ml]

Vzor-ka číslo	RIFA [mg]	Poly-mér [%]	AP	CET v DMSO [%]	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [mV]
1.	0	T3 – 3%	+	-	128,9	0,070	139,7	100,0	-
2.	0	T3 – 3%	-	0,5	143,1	0,098	158,4	100,0	-
3.	1	T3 – 1%	-	0,5	-	-	-	-	49,0
4.	0	PLGA-1%	+	-	77,21	0,090	85,55	100,0	-
5.	0	PLGA-3%	+	-	-	0,915	-	66,7	-

Tabuľka 2 - Vplyv typu a koncentrácie polyméru, prítomnosť CET a RIFA na parametre NPs

Predmetom skúmania bolo orientačne pripraviť modely NPs a zistiť, s ktorým polymérom a v akom prostredí vzniknú NPs s perspektívnejšími vlastnosťami. Ako je zrejmé z tabuľky, PLGA-NPs nevykazovali vo vodnom prostredí dostatočnú veľkosť alebo vyhovujúcu polydisperzitu. Nanočastice obsahujúce T3 vykazovali lepšie veľkostné parametre, a navyše, i s pridaným rifampicínom bol ZP stabilný, aj keď v kladnej hodnote, ktorá je nie vždy žiadúca. Markantný rozdiel vo veľkosti T3-NPs vo vodnej fáze a v prítomnosti kationického emulgátoru nebol, preto sa volila ako budúca vonkajšia fáza vodný fosfát-citrátový roztok, ktorý je biokompatibilnejší s biologickými štruktúrami s cieľom vyhnúť sa nadbytočnému používaniu chemických látok. Preto predmetom ďalšieho záujmu sa stal T3 s modifikáciou parametrov prípravy a vonkajšej fázy (fosfát-citrátový roztok ako už bolo spomenuté vyššie) týchto T3-obsahujúcich nanočastíc s cieľom vylepšiť ich výsledné parametre.

### 10.1.2 Sledovanie vplyvu fosfát-citrátovej vonkajšej fázy s pH 3,5 na parametre NPs pri rôznom obsahu liečiva a T3

Vzorka	Vnútoraná fáza (1ml)		Vonkajšia fáza (9ml)	ZP [mV]
	RIFA [mg]	T3 v DMSO [%]	FC roztok [pH]	
1.	0,4	1	3,5	-
2.	4	1		-
3.	0,4	3		-10,5
4.	4	3		4,84

Tabuľka 3 - Vplyv fosfát-citrátovej vonkajšej fázy o pH 3,5 na parametre NPs pri rôznom obsahu liečiva a T3

Vonkajšiu fázu v nanodisperzii tvoril fosfát-citrátový roztok kyslej pH oblasti 3,5. V tejto oblasti má tento roztok pufrovaciu kapacitu skoro nulovú. Pri príprave začali okamžite po zmiešaní fáz vznikať aglomeráty, preto bol len orientačne premeraný ZP niektorých vzoriek, ktorý značil nestabilné nanosuspénzie. Z týchto údajov je zaujímavé, že ZP pri vyššom obsahu rifampicínu prešiel zo zápornej do kladnej oblasti.

Diskusia pre kapitoly 10.1.1 a 10.1.2 – V prostredí vody ani v prostredí roztoku fosfát-citrátovej kompozície s veľmi malou kapacitou v kyslom prostredí pH 3,5 neboli získané dostatočne veľkostne štandardné a stabilné nanočastice. ZP pri vyššom obsahu rifampicínu vo fosfát-citrátovom roztoku o kyslom pH 3,5 prešiel zo zápornej do kladnej hodnoty.

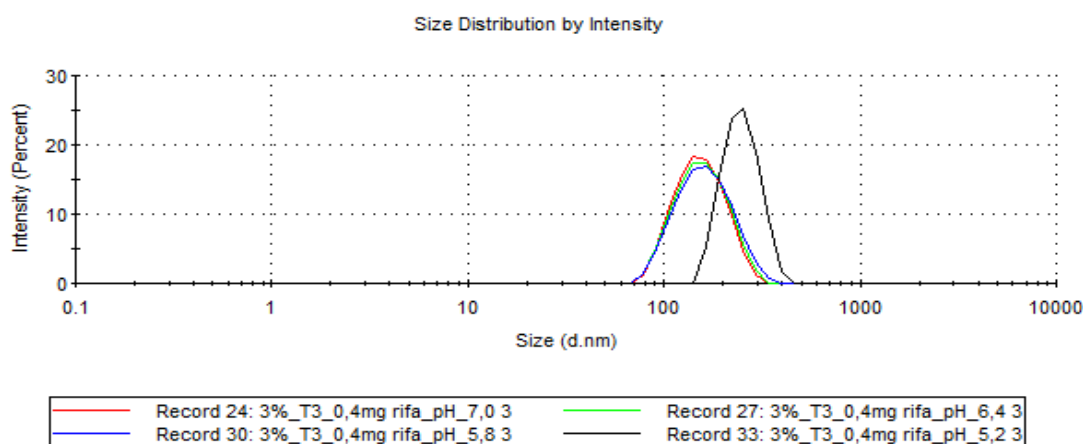
### 10.1.3 Anionické NPs bez emulgátoru - sledovanie vplyvu škály pH fosfát-citrátového roztoku na parametre NPs pri zvyšujúcom sa obsahu liečiva a T3

Vnútoraná fáza [1ml]

Vonkajšia fáza [9ml]

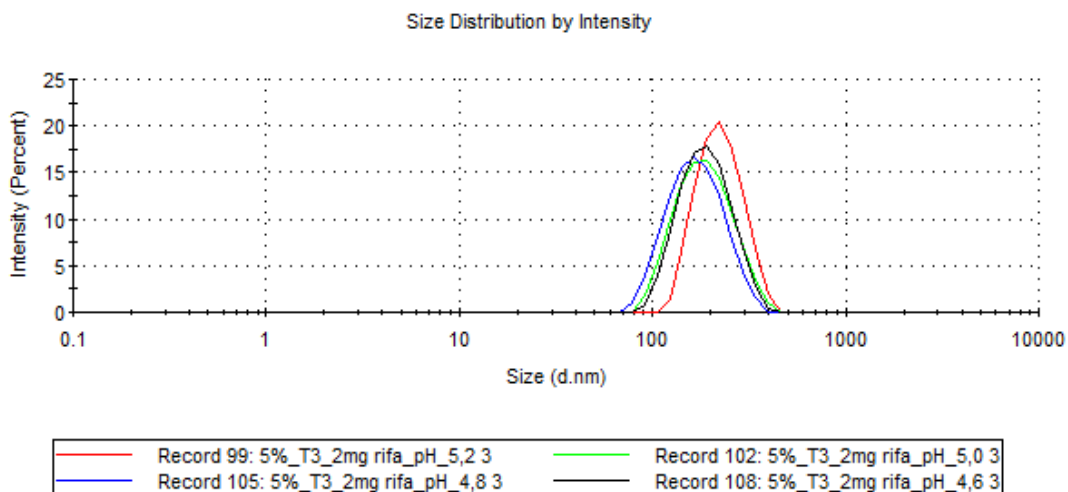
Vzor-ka číslo	RIFA [mg]	T3 [%]	FC roz-tok [pH]	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [nm]	EE [%]	
1.	0,4	3	7,0	145,8	0,087	158,6	100,0	-28,5	1,43	
2.			6,4	146,3	0,095	160,3	100,0	-28,8	1,28	
3.			5,8	150,5	0,076	164,4	100,0	-28,4	4,11	
4.			5,2	241,0	0,036	252,6	100,0	-24,7	5,09	
5.			4,6	aglomeráty						
6.			4,0							
7.	2	5	5,2	211,7	0,068	226,6	100,0	-28,8	6,21	
8.			5,0	174,0	0,099	190,1	100,0	-32,1	2,19	
9.			4,8	159,1	0,082	173,8	100,0	-31,4	1,99	
10.			4,6	177,9	0,064	191,9	100,0	-30,3	5,89	
11.	1	3	5,2	192,0	0,040	202,9	100,0	-26,2	5,51	
12.		5	5,2	237,9	0,095	258,1	100,0	-27,2	9,94	
13.		3	5,0	151,5	0,072	164,5	100,0	-28,5	2,62	
14.		3	4,8	158,4	0,058	169,0	100,0	-27,6	3,59	

Tabuľka 4 - Anionické NPs bez emulgátoru –vplyv škály pH fosfát-citrátového roztoku na parametre NPs pri zvyšujúcom sa obsahu liečiva a T3

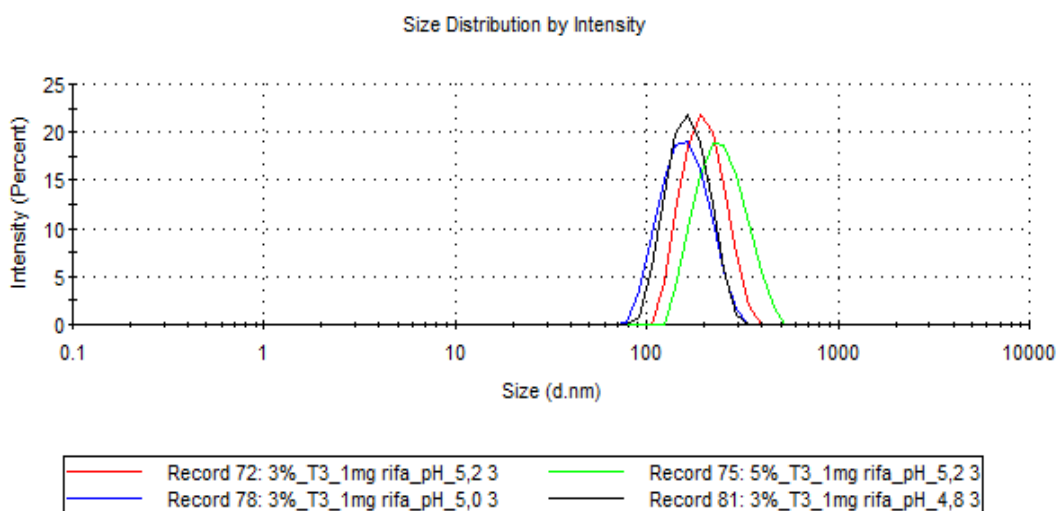


Obrázok 14 – Distribučná krivka veľkosti pre vzorky č. 1 – 4 (anionické NPs bez emulgátoru)





Obrázok 15 – Distribučná krivka veľkosti pre vzorky č. 7 – 10  
(anionické NPs bez emulgátoru)



Obrázok 16 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 11 – 14  
(anionické NPs bez emulgátoru)

Uvedené nanodisperzie disponovali okrem obligátneho rifampicínu v 0,4%, 1%, 2% koncentrácií a T3 v 0,3% a 0,5% koncentrácií i roztokmi pufru o pH od 7,0 do 4,0. Pri použití nižšej koncentrácie rifampicínu a T3 vznikli aglomeráty pri hodnotách pH 4,6 a nižších. Táto skutočnosť však nenastala, ak boli použité vyššie koncentrácie rifampicínu a T3 a dokonca i pri pH 4,6 vznikli relatívne stabilné nanosuspenzie s celkom uspokojivou EE. Dalo by sa teda usudzovať, že zvýšením obsahu RIFA a T3 sa dajú pripraviť relatívne stabilné NPs i pri nižších hodnotách pH, avšak ako bolo známe z kapitoly predchádzajúcej kde nanosuspenzie obsahovala RIFA až v 4% koncentrácií a T3 v 0,3% pri pH 3,5

kde vznikli aglomeráty , by mohol byť akýsi „strop“ tohto množstva komponent, pri ktorom by už opäť vznikali nestabilné aglomerované nanosuspenzie. Zaujímavé tiež bolo, že pri použití nižšej koncentrácie RIFA a T3 vznikli pri pH 5,2 NPs rozmermi väčšie než by bolo očakávané u analogických vzoriek obsahujúcich vyššie koncentrácie týchto komponent. Ako zaujímavú je možné hodnotiť radu vzoriek obsahujúcich roztok pufru s hodnotou pH 5,2 v ktorých boli preukázané významne väčšie nanočastice. Pri tomto pH 5,2 bola tiež získaná najvyššia hodnota EE. Hodnoty ZP sa nijako významne nelíšili, i keď pri pH 5,0 a najvyšších koncentráciách T3 a RIFA bola jeho hodnota najpriaznivejšia a dosahovala až okolo -32mV, avšak na úkor nízkej EE.

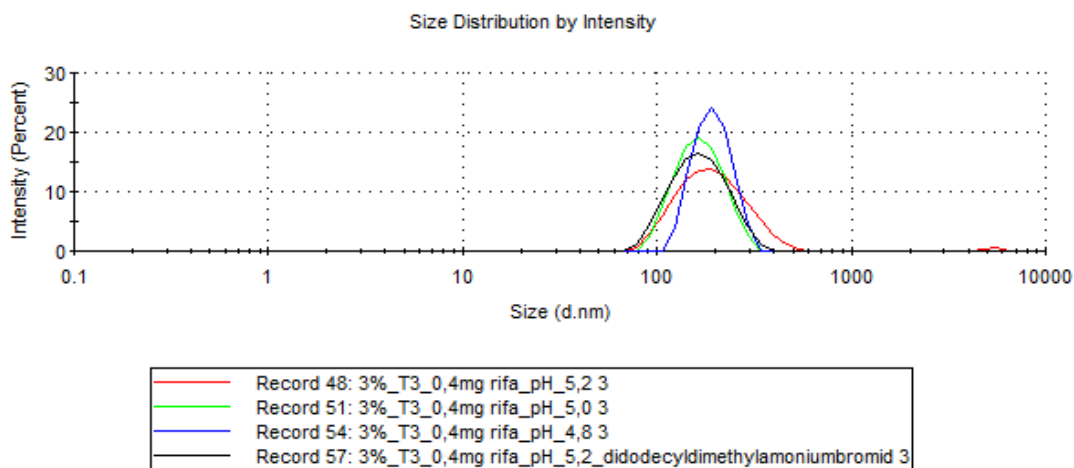
#### 10.1.4 Anionické NPs s emulgátorom - vplyv prítomnosti emulgátoru na parametre NPs vo fosfátcitrátovom roztoku v pH škále 5,2 – 4,8

Vnútoraná fáza [1ml]

Vonkajšia fáza [9ml]

Vzorka číslo	RIFA [mg]	T3 [%]	FC roztok [pH]	DMAB [%]	Z-ave [nm]	pDI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1.	0,4	3	5,2	-	180,7	0,161	199,7	99,0
2.				0,01	154,1	0,084	168,7	100,0
3.			5,0	-	157,5	0,057	168,3	100,0
4.				0,01	aglomeráty			
5.			4,8	-	188,0	0,025	196,5	100,0
6.				0,01	aglomeráty			

Tabuľka 5 – Anionické NPs s emulgátorom - vplyv prítomnosti DMAB na veľkosť NPs pri pH vonkajšej fázy 5,2–4,8



Obrázok 17 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky 1,2,3,5 (sledovanie vplyvu prítomnosti DMAB pri pH vonkajšej fázy 5,2-4,8)

Vnútoraná fáza [1ml]				Vonkajšia fáza [9ml]		
Vzorka číslo	RIFA [mg]	T3 [%]	FC roztok [pH]	DMAB [%]	ZP [mV]	EE [%]
1.	0,4	3	5,2	-	-28,9	2,49
2.				0,01	-27,3	1,68
3.			5,0	-	-24,3	1,58
4.				0,01	aglomeráty	-
5.			4,8	-	-24,5	3,12
6.				0,01	aglomeráty	-

Tabuľka 6 - Anionické NPs s emulgátorom - vplyv prítomnosti DMAB na ZP a EE pri pH vonkajšej fázy 5,2-4,8

Ako je vyššie uvedené, pripravené boli nanodisperzie vo fosfát-citrátovom roztoku s pH 5,2; 5,0 a 4,8; u ktorých bol zároveň skúšaný vplyv kationického tenzidu DMAB v stopovej koncentrácii 0,01% pri jednotlivých hodnotách pH. Bolo potvrdené, že pri pH 5,0 a nižšom dochádza prekvapivo po pridaní stopového množstva tenzidu DMAB k vyzrážaniu nanočastíc. Prekvapivo i pri pH 4,8 boli získané disperzie bez tenzidu relatívne stabilné. Prítomnosť stôp emulgátoru ani hodnoty pH sa na hodnote ZP prakticky neprejavili, i keď ako už bolo zmienené v predchádzajúcej kapitole, nanočastice pripravené pri pH 5,2 (bez emulgátoru) vykazovali vyšší ZP a tiež EE. Použitím tenzidu

DMAB sa nanočastice o poznanie zmenšili rozmermi aj EE, avšak ZP nebol významne ovplyvnený.

## 10.2 Dekorované NPs

### 10.2.1 Vplyv dekorovania s HA a prítomnosť emulgátoru na parametre NPs v prostredí vody

HA použitá na dekorovanie bola zneutralizovaná 10% roztokom NaOH na pH 7-8 bezprostredne po ukončení termickej degradácie v kyslom prostredí. Takto zneutralizovaný roztok HA bol v objeme 0,1ml metódou „one-pot“ (naraz) pridaný do zmesi vonkajšej a vnútornej fázy (30 sekúnd po zmiešaní týchto fáz). Tento pokus bol len orientačný, za účelom zistenia, či aj vodná vonkajšia fáza by bola použiteľná s T3 pre tvorbu NPs bez tvorby veľkých aglomerátov.

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + 5% T3 v DMSO

Vonkajšia fáza [10ml] – H<sub>2</sub>O (AP)

Vzor- ka číslo	RIFA [mg]	T3 [%]	AP	DMAB 0,01%	HA 0,1ml	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1.	2	5	+	-	-	aglomeráty			
2.			+	-	+				
3.			+	+	-	-	-	-	-
4.			+	+	+	185,4	0,088	205,8	100,0

Tabuľka 7 - Vplyv prítomnosti DMAB a dekorovania s HA na veľkosť NPs vo vonkajšej vodnej fáze

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + 5% T3 v DMSO Vonkajšia fáza [10ml] – H<sub>2</sub>O (AP)

Vzorka číslo	RIFA [mg]	T3 [%]	AP	DMAB 0,01%	HA 0,1ml	ZP [mV]
1.	2	5	+	-	-	aglomeráty
2.			+	-	+	
3.			+	+	-	44,5
4.			+	+	+	-6,97

Tabuľka 8 - Vplyv prítomnosti DMAB a dekorovania s HA na ZP vo vonkajšej vodnej fáze

Bolo preukázané, že NPs obsahujúce rifampicín vo vonkajšej vodnej fáze bez emulgátoru aglomerujú. Táto aglomerácia vôbec nebola ovplyvnená ani dekoráciou povrchu s HA. Zaujímavé je, že pri príprave modelových T3 – nanočastíc neobsahujúcich rifampicín (z kapitoly 10.1.1) nevznikli aglomeráty vo vodnom prostredí bez emulgátoru, i keď bol narozdiel od tohto pokusu použitý 3% T3. U vzoriek obsahujúcich DMAB nedošlo k tvorbe aglomerátov, takže DMAB preukázal pozitívny vplyv na stabilitu nanodisperzie vo vodnom prostredí. Porovnaním hodnôt ZP dekorovaných a nedekorovaných NPs s prímiesou emulgátoru bol preukázaný dôkaz markantnej zmeny povrchového náboja na základe dekorovania. Nedekorované NPs s DMAB vykazovali stabilný ZP +44,5mV; naopak dekorovanie s HA udelilo nanočasticiam v prostredí vody ZP záporný v nestabilnej hodnote -6,97mV.

### 10.2.2 NPs dekorované s HA „dropwise“ metódou pri pH škále

#### fosfát-citrátového roztoku 5,2 – 6,4 a vplyv na ich parametre

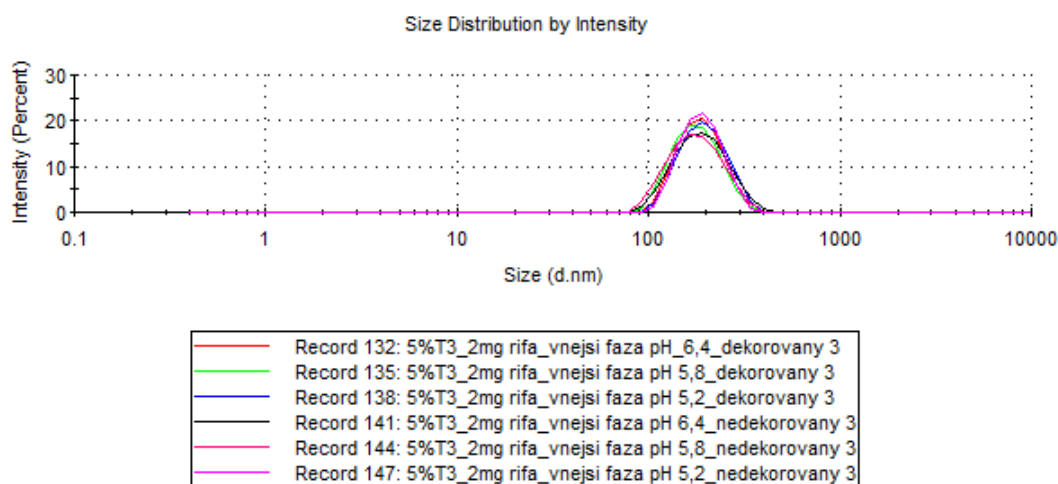
HA použitá na dekorovanie bola zneutralizovaná 10% roztokom NaOH na pH 7-8 bezprostredne po ukončení termickej degradácie v kyslom prostredí. Takto zneutralizovaný roztok HA bol v objeme 0,1ml metódou „drop-wise“ (po kvapkách) pridaný do zmesi vonkajšej a vnútornej fázy (30 sekúnd po zmiešaní týchto fáz). Následne sa vzorky miešali 30 minút na magnetickej miešačke.

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + 5% T3 v DMSO

Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok

Vzor-ka číslo	RIFA [mg]	T3 [%]	FC roz-tok [pH]	HA 0,1ml „drop-wise“	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [mV]
1.	2	5	6,4	+	176,7	0,069	192,0	100,0	-22,0
2.				-	176,8	0,088	193,4	100,0	-24,3
3.			5,8	+	169,4	0,066	183,0	100,0	-29,8
4.				-	166,0	0,078	181,4	100,0	-27,8
5.			5,2	+	184,1	0,044	195,7	100,0	-28,8
6.				-	182,3	0,037	192,0	100,0	-27,2

Tabuľka 9 - Dekorované NPs s HA metódou „drop-wise“ pri pH vonkajšej fázy 6,4-5,2



Obrázok 18 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 (sledovanie vplyvu dekorovania s HA „dropwise“ pri pH vonkajšej fázy 6,4-5,2)

Okrem rýchlosti zvyšovania koncentrácie HA sa podmienky prípravy nanočastíc líšili prítomnosťou pufrův o rôznych pH namiesto samotnej vody. Je preukázané, že vplyv hodnôt pH v kyslej oblasti a prítomnosti HA na veľkosť nanočastíc sa významne neprejavil, ale opäť pri pH 5,2 boli preukázané častice s najväčším rozmerom, ako tomu bolo u predchádzajúcich meraní. Ako už bolo vyššie popísané, nanočastice v prostredí pufru alebo elektrolytu bez tenzidu sú do pH 5,2 odolné k aglomerácii. Vplyv dekorovania

na veľkosť nanočastíc bol veľmi slabý. Najmenšie nanočastice boli preukázané pri pH 5,8 – najväčšie boli získané pri pH 5,2 pri ich najmenej polydisperzite.

### 10.2.3 Vplyv spôsobu dekorovania s HA a koncentrácie T3 na parametre

#### NPs

HA použitá na dekorovanie bola zneutralizovaná 10% roztokom NaOH na pH 7-8 po 4 dňoch od ukončenia termickej degradácie v kyslom prostredí. Takto zneutralizovaný roztok HA (dekorovací roztok) bol v objeme 0,1ml metódou „drop-wise“ (po kvapkách) alebo „one-pot“ (naraz). Pri použití metódy „drop-wise“ bol dekorovací roztok pridaný 30 sekúnd po zmiešaní vonkajšej a vnútornej fázy. Naopak, ak bola použitá metóda „one-pot“, bola modifikovaná spôsobom, že dekorovací roztok bol pridaný do vonkajšej fázy ešte pred pridaním vnútornej fázy. Následne sa tieto vzorky miešali 30 minút na magnetickej miešačke.

Behom skladovania častíc pre sledovanie stability boli nanodisperzie uskladnené v chladničke pri teplote 3°C.

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + T3 v DMSO

Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok pH 6,4

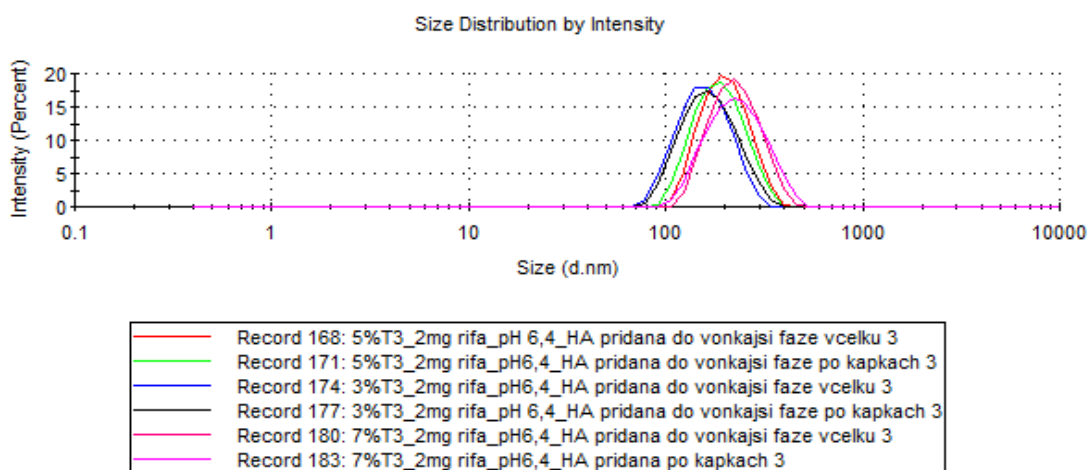
Vzor- ka číslo	RIFA [mg]	T3 [%]	FC roztok [pH]	HA 0,1ml „drop- wise“	HA 0,1ml „one- pot“	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1.	2	3	6,4	-	+	150,4	0,071	164,0	100,0
2.				+	-	156,4	0,100	171,7	100,0
3.		5		-	+	191,3	0,064	205,6	100,0
4.				+	-	178,8	0,088	195,1	100,0
5.		7		-	+	214,2	0,066	231,1	100,0
6.				+	-	212,5	0,101	235,9	100,0

Tabuľka 10 - Vplyv metódy dekorovania s HA a koncentrácie T3 na veľkosť NPs pri pH vonkajšej fázy 6,4

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + T3 v DMSO Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok pH 6,4

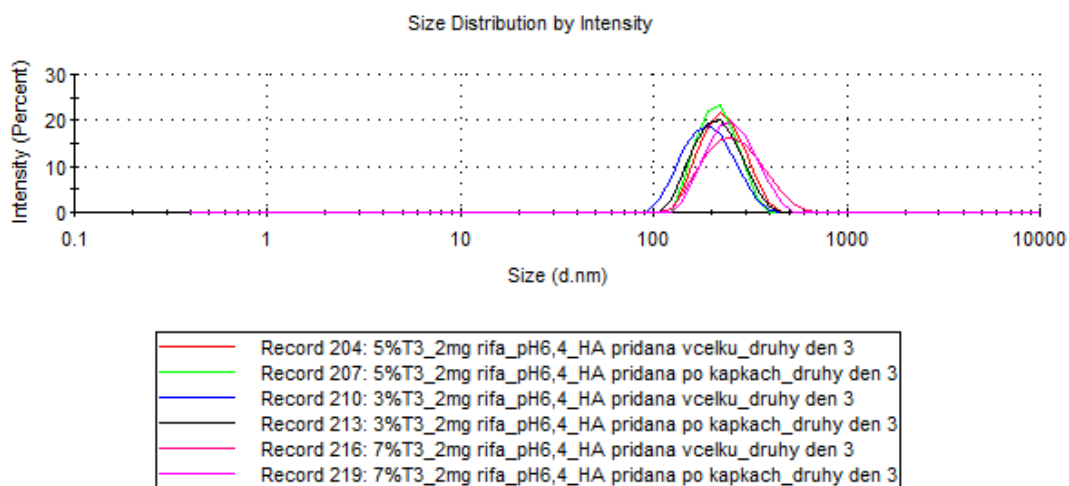
Vzorka číslo	RIF [mg]	T3 [%]	FC roztok [pH]	HA 0,1ml „drop-wise“	HA 0,1ml „one-pot“	ZP [mV]	EE [%]
1.	2	3	6,4	-	+	-29,0	3,74
2.				+	-	-26,9	3,46
3.				-	+	-24,6	3,45
4.		5		+	-	-25,6	3,88
5.				-	+	-26,2	6,87
6.				7	+	-	-31,1

Tabuľka 11 – Vplyv metódy dekorovania s HA a koncentrácie T3 na ZP a EE pri pH vonkajšej fázy 6,4



Obrázok 19 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 (sledovanie vplyvu metódy dekorovania a koncentrácie T3 na veľkosť častíc pri pH vonkajšej fázy 6,4)





Obrázok 20 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 po 20 hodinovom skladovaní (pre vzorky s distribučnou krivkou z obrázka 19)

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + T3 v DMSO

Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok pH 6,4

Vzor- ka číslo	T3 [%]	HA 0,1ml „drop -wise“	HA 0,1ml „one- pot“	Po čase [hod]	Z-ave [nm]	pDI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [mV]
1.	3	-	+	0	150,4	0,071	164,0	100,0	-29,0
		-	+	20	182,0	0,073	198,2	100,0	-27,2
2.	3	+	-	0	156,4	0,100	171,7	100,0	-26,9
		+	-	20	206,4	0,039	218,7	100,0	-26,1
3.	5	-	+	0	191,3	0,064	205,6	100,0	-24,6
		-	+	20	221,3	0,043	235,7	100,0	-21,8
4.	5	+	-	0	178,8	0,088	195,1	100,0	-25,6
		+	-	20	210,0	0,047	223,5	100,0	-25,3
5.	7	-	+	0	214,2	0,066	231,1	100,0	-26,2
		-	+	20	243,8	0,091	266,4	100,0	-28,3
6.	7	+	-	0	212,5	0,101	235,9	100,0	-31,1
		+	-	20	241,0	0,078	260,6	100,0	-28,7

Tabuľka 12 - Sledovanie stability časticových parametrov po 20 hodinovom skladovaní pre NPs z tabuliek č. 10 a 11

Pri jednotnej a relatívne vysokej 2% koncentrácii rifampicínu boli testované NPs pripravené z roztokov, ktoré obsahovali nosič v koncentráciách 3%, 5% a 7%. Preto sa tiež výrazne líšili veľkosti nanočastíc. Pozoruhodný je v rámci štatistických chýb

zanedbateľný vplyv rýchlosti pridávania HA do roztoku pufru o pH 6,4. Zaujímavá je nižšia polydisperzita veľkosti nanočastíc pripravených pridaním HA do vonkajšej fázy ešte pred pridaním vnútornej fázy (modifikovanou „one-pot“ metódou). Nižšia polydisperzita by teoreticky mohla byť spôsobená tým, že v prípade modifikovanej one-pot metódy, bola HA do vonkajšej fázy pridaná ešte pred zmiešaním oboch fáz a teda ešte pred tvorbou NPs. ZP nebol svojou veľkosťou u dekorovaných NPs prakticky ovplyvnený. Z hľadiska účinnosti enkapsulácie rifampicínu sa ako výhodné javia vzorky s 3% a 7% nosičom. Dôvod menšej efektivity enkapsulácie u vzoriek s 5% nosičom nie je známy, vylúčená nie je odlišná manipulácia so vzorkami.

Stabilitné sledovanie ukázalo, že NPs po 20 hodinovom skladovaní zväčšili svoju veľkosť u všetkých vzoriek, čo by mohlo byť spôsobené Ostwaldovým zraním nanosuspenzie alebo zväčšovaním svojho hydratovaného obalu nanočastíc pod vplyvom bobtnania HA, alebo kombináciou oboch. Z distribučnej krivky veľkosti NPs po 20 hodinovom skladovaní sa dá usúdiť, že NPs si zachovali stabilitu počas skladovania. Taktiež vo väčšine vzoriek, okrem jedného bola po skladovaní znížená i polydisperzita sústav. ZP nebol nejak významne ovplyvnený.

#### **10.2.4 Vplyv koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva**

##### **HA použitej na dekorovanie na parametre NPs a ich stabilitu po 20 hodinách**

Použitý zásobný dekorovací roztok HA bol zneutralizovaný po 5 dňoch od ukončenia termickej degradácie v kyslom prostredí Neutralizovalo sa 10% roztokom NaOH na pH 7-8. Ako vonkajšia fáza sa použila čistená voda alebo FC roztok s pH 7,0. Dekorovací roztok sa pridával do vonkajšej fázy modifikovanou „one-pot“ metódou za stáleho miešania pred pridaním vnútornej fázy. Behom skladovania častíc pre sledovanie stability boli nanodisperzie uskladnené v chladničke pri teplote 3°C.

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + T3 v DMSO Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok / H<sub>2</sub>O (AP)

Vzorka číslo	T3 [%]	FC roztok [pH]	AP	Množ-stvo HA [ml]	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1.	5	-	+	0,5	aglomeráty			
2.		-	+	1,0				
3.	7	7,0	-	0	231,7	0,080	250,7	100,0
4.			-	0,1	239,3	0,071	256,2	100,0
5.	10		-	0	282,9	0,153	305,8	100,0
6.			-	0,1	327,2	0,193	367,2	98,4

Tabuľka 13 - Vplyv koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva HA na veľkosť NPs

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + T3 v DMSO Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok / H<sub>2</sub>O (AP)

Vzorka číslo	T3 [%]	FC roztok [pH]	AP	Množ-stvo HA [ml]	ZP [mV]	EE [%]
1.	5	-	+	0,5	-7,69	-
2.		-	+	1,0	-4,91	-
3.	7	7,0	-	0	-26,4	5,48
4.			-	0,1	-27,6	5,91
5.	10		-	0	-27,7	8,04
6.			-	0,1	-20,2	7,55

Tabuľka 14 - Vplyv koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva HA na ZP a EE

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + T3 v DMSO Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok / H<sub>2</sub>O (AP)

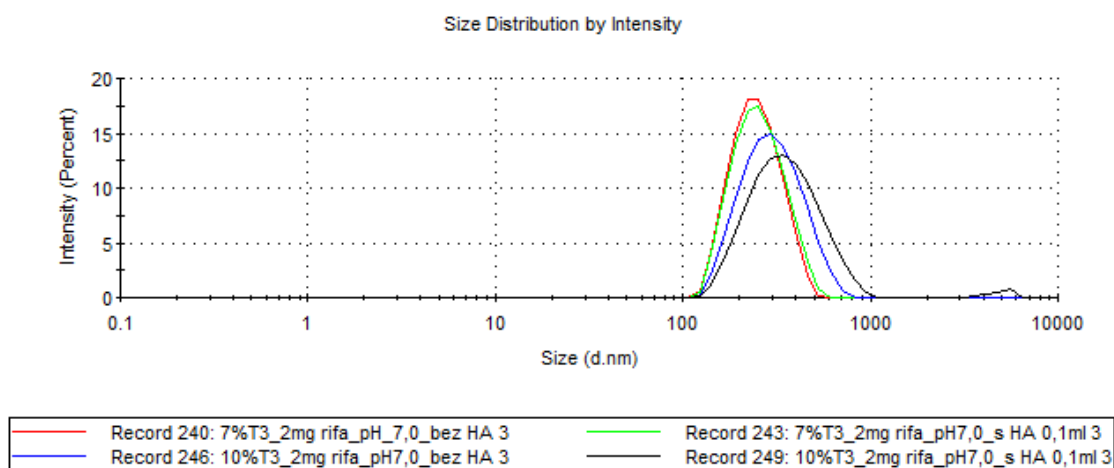
Vzor- ka číslo	T3 [%]	FC roztok [pH]	AP	Množ- stvo HA [ml]	Po čas [hod]	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1.	5	-	+	0,5	0	aglomeráty			
		-	+		20				
2.		+	-	1,0	0				
		+	-		20				
3.	7	-	+	0	0	231,7	0,080	250,7	100,0
		-	+		20	265,4	0,115	289,1	100,0
4.		+	-	0,1	0	239,3	0,071	256,2	100,0
		+	-		20	265,2	0,093	290,9	100,0
5.	10	-	+	0	0	282,9	0,153	305,8	100,0
		-	+		20	333,9	0,203	375,6	96,6
6.		+	-	0,1	0	327,2	0,193	367,2	98,4
		+	-		20	392,6	0,239	488,6	98,0

Tabuľka 15 - Sledovanie stability veľkosti po 20 hodinovom skladovaní u NPs z tabuľky č. 13

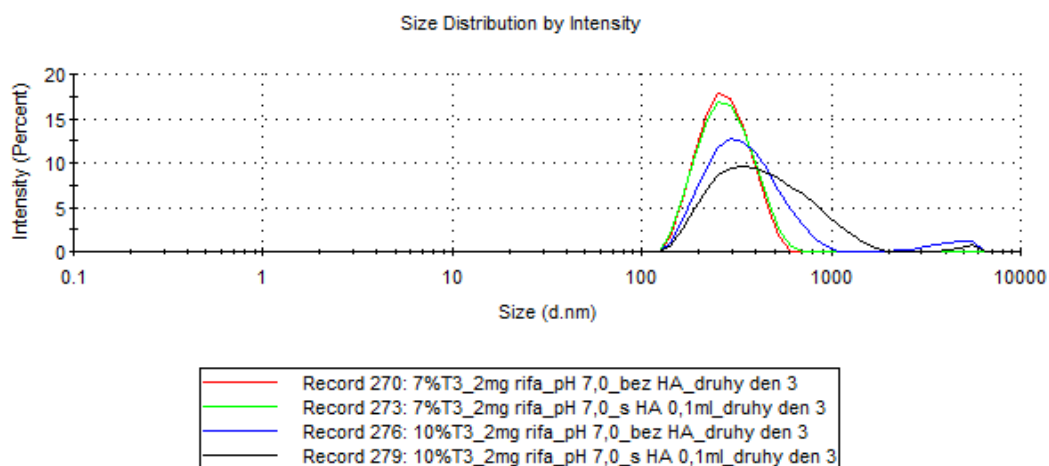
Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + T3 v DMSO Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok / H<sub>2</sub>O (AP)

Vzorka číslo	T3 [%]	FC roztok [pH]	AP	Množstvo HA [ml]	ZP [mV]	ZP po 20 hodinách [mV]
1.	5	-	+	0,5	-7,69	-
2.		-	+	1,0	-4,91	-
3.	7	7,0	-	0	-26,4	-26,8
4.			-	0,1	-27,6	-28,0
5.			-	0	-27,7	-26,0
6.	10	-	-	0,1	-20,2	-26,9

Tabuľka 16 - Sledovanie stability ZP po 20 hodinovom skladovaní u NPs z tabuľky č. 14



Obrázok 21 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 3 – 6 (sledovanie vplyvu koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva HA na veľkosť častíc)



Obrázok 22 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 3 – 6 po 20 hodinovom skladovaní (pre porovnanie s distribučnou krivkou z obrázka 21)

Bolo preukázané, že T3-NPs obsahujúce rifampicín vo vodnom prostredí opäť aglomerovali a dekorácia ani s väčším obsahom HA nevykázala na tento jav žiaden vplyv. Taktiež bolo preukázané, že polydisperzita sa pri použití 10% T3 podstatne zväčšila a presiahla až 300nm pri súčasnom dekorovaní, narozdiel od použitých nižších koncentrácií T3. Taktiež veľkosť a EE NPs sa so zvyšujúcou koncentráciou T3 zväčšila, ako by sa dalo predpokladať.

Čo sa týka stability po 20 hodinách, NPs opäť vykazovali vyššie hodnoty rozmerov, ale zároveň však došlo k zvýšeniu polydisperzity, čo je zrejme aj z distribučnej krivky veľkosti. ZP nebol počas skladovania významne ovplyvnený.

## 10.2.5 Vplyv postupného zvyšovania množstva HA použitej na dekorovanie na parametre NPs

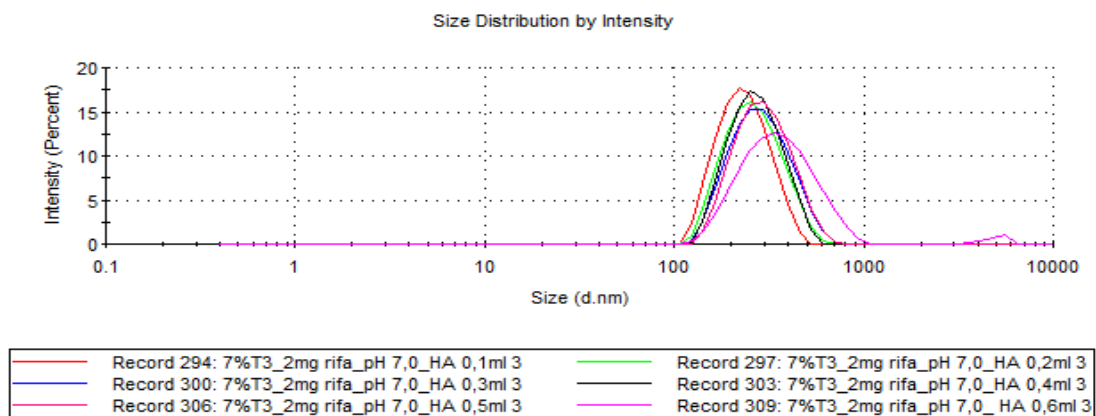
Použitý zásobný dekorovací roztok HA bol zneutralizovaný po 5 dňoch od ukončenia termickej degradácie v kyslom prostredí. Neutralizovalo sa 10% roztokom NaOH na pH 7-8. Ako vonkajšia fáza sa použil FC roztok s pH 7,0. Dekorovací roztok sa pridával do vonkajšej fázy (modifikovanou „one-pot“ metódou) za stáleho miešania pred pridaním vnútornej fázy. Behom skladovania častíc pre sledovanie stability boli nanodisperzie uskladnené v chladničke pri teplote 3°C. Vnútoraná fáza bola pridaná do vonkajšej fázy „one-pot“ za stáleho miešania.

Vnútoraná fáza [1ml] – 2mg RIFA + 7% T3 v DMSO

Vonkajšia fáza [10ml] – FC roztok pH 7,0

Vzorka číslo	T3 [%]	FC roztok [pH]	Množstvo HA [ml]	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [mV]	EE [%]
1.	7	7,0	0,1	218,4	0,073	237,3	100,0	-27,8	5,37
2.			0,2	247,6	0,103	272,3	100,0	-21,0	5,63
3.			0,3	262,5	0,105	290,6	100,0	-27,8	5,64
4.			0,4	256,3	0,089	282,0	100,0	-29,4	5,80
5.			0,5	278,4	0,136	305,9	99,6	-23,2	6,27
6.			0,6	333,0	0,202	403,1	98,7	-27,5	6,03

Tabuľka 17 - Vplyv postupného zvyšovania množstva HA na parametre NPs



Obrázok 23 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 (sledovanie vplyvu postupného zvyšovania množstva HA na dekorovanie)

V nanodisperzii bola použitá konštantná koncentrácia T3 aj rifampicínu a taktiež i konštantná hodnota pH 7,0 fosfát-citrátovej vonkajšej fázy. Z výsledkov sa dá usúdiť, že zvyšovaním množstva HA použitej na dekorovanie došlo k zvyšovaniu veľkosti NPs, čo by mohlo byť spôsobené postupným zväčšovaním hydratačného obalu na povrchu NPs vplyvom zvýšeného obsahu HA. Taktiež dochádzalo k zvýšeniu polydisperzity, až na jednu výnimku – jednalo sa o vzorku obsahujúcu 0,4ml HA. ZP nebol nijak významne ovplyvnený, avšak u už zmieneného vzorku obsahujúceho 0,4ml HA bola preukázaná najvyššia hodnota ZP.

#### **10.2.6 Sledovanie vplyvu zmeny objemu fáz na parametre NPs dekorovaných a nedekorovaných analogických vzoriek**

Použitý zásobný dekorovací roztok HA bol zneutralizovaný po 5 dňoch od ukončenia termickej degradácie v kyslom prostredí. Neutralizovalo sa 10% roztokom NaOH na pH 7-8. Ako vonkajšia fáza sa použil FC roztok s pH 7,0. Dekorovací roztok sa pridával do vonkajšej fázy modifikovanou „one-pot“ metódou (teda dekorovací roztok bol zmiešaný s vonkajšou fázou pred pridaním vnútornej fázy) v množstve 0,1ml do dekorovaných vzoriek za stáleho miešania pred pridaním vnútornej fázy.

Vnútoraná fáza bola pridaná „one-pot“, a to buď do samotnej vonkajšej fázy (nedekorované vzorky) alebo do predom pripravenej zmesi vonkajšej fázy s dekorovacím roztokom HA (dekorované vzorky).

Vnútoraná fáza - 2mg RIFA + T3 v DMSO

Vonkajšia fáza - FC roztok pH 7,0

Vzorka číslo	T3 [%]	Vnúť. fáza [ml]	Vonk. fáza [ml]	HA 0,1ml „one-pot“	Z-ave [nm]	pDI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1.	5	2	10	-	287,6	0,072	312,8	100,0
2.				+	296,4	0,071	321,4	100,0
3.	7			-	292,4	0,094	324,9	100,0
4.				+	311,2	0,118	336,2	100,0
5.	5	1	5	-	313,0	0,088	342,6	100,0
6.				+	356,0	0,150	402,5	99,6
7.	7			-	336,2	0,130	384,5	100,0
8.				+	376,7	0,164	401,0	99,6

Tabuľka 18 - Vplyv zmeny objemu fáz na veľkosť NPs

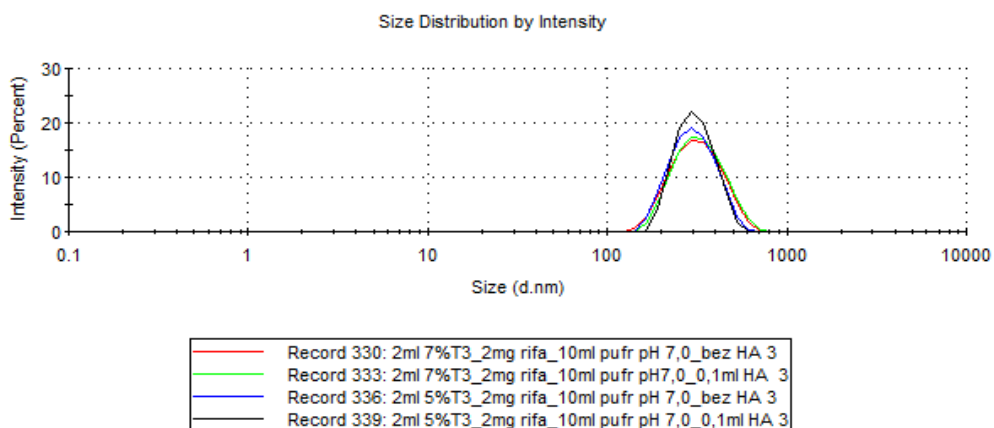
Vnútoraná fáza - 2mg RIFA + T3 v DMSO

Vonkajšia fáza - FC roztok pH 7,0

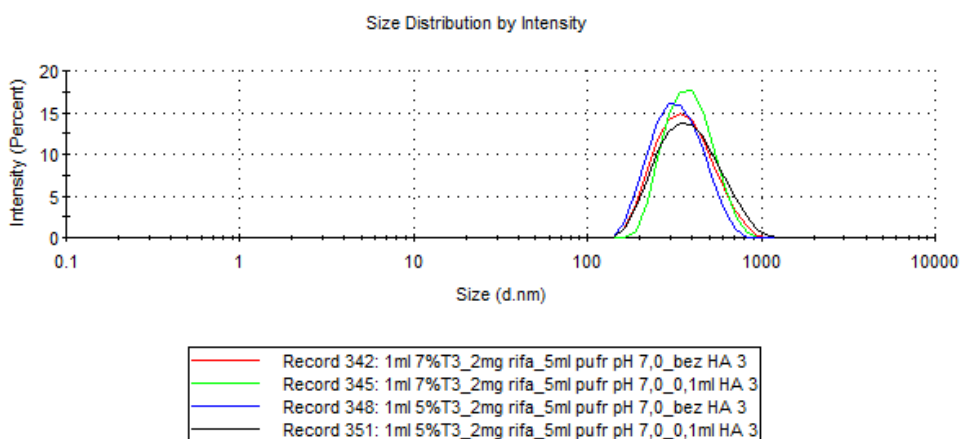
Vzorka číslo	T3 [%]	Vnúť. fáza [ml]	Vonk. fáza [ml]	HA 0,1ml „one-pot“	ZP [mV]	EE [%]
1.	5	2	10	-	-20,3	3,70
2.				+	-24,4	4,38
3.	7			-	-20,0	6,32
4.				+	-21,9	5,97
5.	5	1	5	-	-17,4	4,09
6.				+	-22,8	4,66
7.	7			-	-23,3	5,72
8.				+	-17,9	6,06

Tabuľka 19 – Vplyv zmeny objemu fáz na ZP a EE

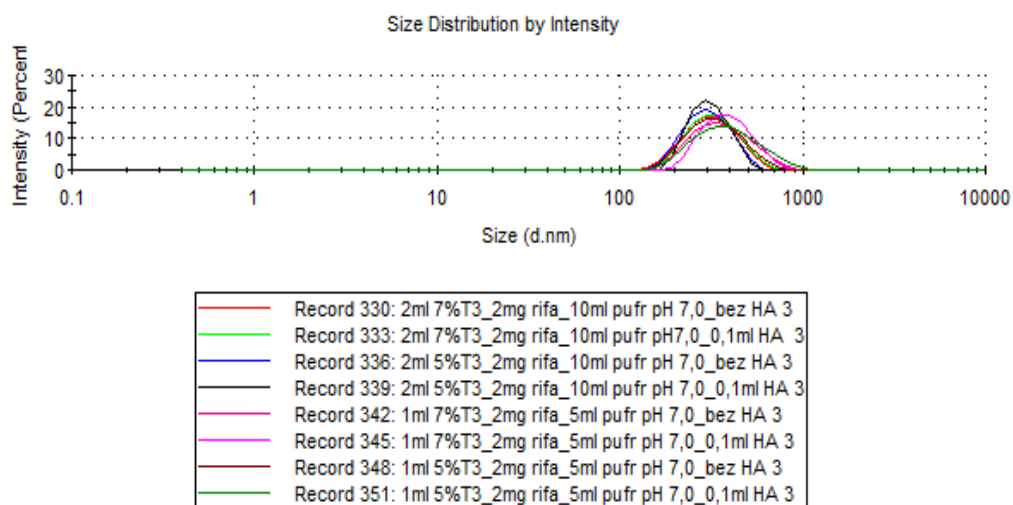




Obrázok 24 – Distribučná krivka veľkosti častíc u vzoriek č. 1 – 4  
(sledovanie zmeny objemu fáz)



Obrázok 25 – Distribučná krivka veľkosti častíc u vzoriek č. 5 – 8  
(sledovanie zmeny objemu fáz)



Obrázok 26 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 8 súhrnne  
(sledovanie zmeny objemu fáz)

V prípade nanosuspenzie s väčším celkovým objemom, boli získané veľké NPs veľkosťou tesne pod 300nm. V prípade nanosuspenzie s polovičným množstvom fáz vykazovali NPs hodnoty ešte väčšie, presahujúce hodnotu 300nm. Prítomnosť HA sa prejavila predovšetkým v prípade vonkajšej fázy s nižším objemom, pretože T3 aj HA tu boli zastúpené v dvojnásobne vyššej koncentrácii. ZP u tejto nanodisperzie mal kolísavý charakter bez ohľadu na prítomnosť HA. Polydisperzita bola značne zvýšená u nanodisperzie s menším objemom, narozdiel od analogickej nanodisperzie s väčším objemom. EE nebola prítomnosťou HA značne ovplyvnená.

### **10.2.7 Vplyv metódy zmiešania vonkajšej a vnútornej fázy na parametre dekorovaných a nedekorovaných NPs pri zmene objemu fáz**

Použitý zásobný dekorovací roztok HA bol zneutralizovaný po 5 dňoch od ukončenia termickej degradácie v kyslom prostredí. Neutralizovalo sa 10% roztokom NaOH na pH 7-8. Ako vonkajšia fáza sa použil FC roztok s pH 7,0. Dekorovací roztok sa pridával do vonkajšej fázy modifikovanou „one-pot“ metódou v množstve 0,1ml do dekorovaných vzoriek za stáleho miešania pred pridaním vnútornej fázy.

Vzorky sú analogické vzorkám z kapitoly 10.2.6, s rozdielom, že vnútorná fáza bola k vonkajšej pridávaná metódou „drop-wise“ v tomto pokuse. Vo výsledkovej tabuľke budú preto zahrnuté i výsledky z kapitoly 10.2.6 pre možné vzájomné porovnanie.

Vnútoraná fáza - 2mg RIFA + T3 v DMSO

Vonkajšia fáza - FC roztok pH 7,0

Vzor- ka číslo	T3 [%]	Vnú- toraná fáza [ml]	Von- kajšia fáza [ml]	HA 0,1ml „one-pot“	Metóda zmie- šania fáz	Z-ave [nm]	pDI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]			
1.	5	2	10	-	one-pot	287,6	0,072	312,8	100,0			
					drop-wise	<b>289,1</b>	<b>0,087</b>	<b>310,8</b>	<b>100,0</b>			
2.				+	one-pot	296,4	0,071	321,4	100,0			
					drop-wise	<b>305,5</b>	<b>0,070</b>	<b>331,9</b>	<b>100,0</b>			
3.				7	2	10	-	one-pot	292,4	0,094	324,9	100,0
								drop-wise	<b>305,7</b>	<b>0,104</b>	<b>336,2</b>	<b>100,0</b>
4.							+	one-pot	311,2	0,118	336,2	100,0
								drop-wise	<b>340,6</b>	<b>0,110</b>	<b>381,9</b>	<b>100,0</b>
5.	5	1	5				-	one-pot	313,0	0,088	342,6	100,0
								drop.wise	<b>307,3</b>	<b>0,135</b>	<b>331,3</b>	<b>99,5</b>
6.							+	one-pot	356,0	0,150	402,5	99,6
								drop-wise	<b>341,7</b>	<b>0,089</b>	<b>375,9</b>	<b>100,0</b>
7.				7	1	5	-	one-pot	336,2	0,130	384,5	100,0
								drop-wise	<b>337,4</b>	<b>0,180</b>	<b>367,4</b>	<b>98,2</b>
8.							+	one-pot	376,7	0,164	401,0	99,6
								drop-wise	<b>385,7</b>	<b>0,132</b>	<b>430,7</b>	<b>100,0</b>

\*šedou sú označené výsledky z kapitoly 10.2.6

Tabuľka 20 - Vplyv metódy zmiešania fáz na veľkosť NPs

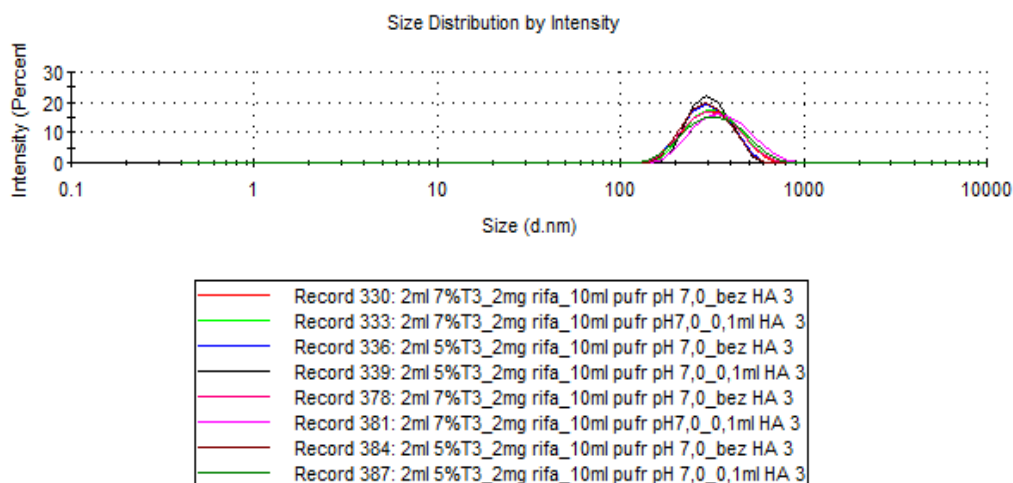
Vnútoraná fáza - 2mg RIFA + T3 v DMSO

Vonkajšia fáza - FC roztok pH 7,0

Vzorka číslo	T3 [%]	Vnúť. fáza [ml]	Vonk. fáza [ml]	HA 0,1ml „one-pot“	Metóda zmiešania fáz	ZP [mV]	EE [%]
1.	5	2	10	-	one-pot	-20,3	3,70
					drop-wise	<b>-23,1</b>	<b>4,17</b>
2.	5			+	one-pot	-24,4	4,38
					drop-wise	<b>-23,0</b>	<b>4,46</b>
3.	7			-	one-pot	-20,0	6,32
					drop-wise	<b>-19,5</b>	<b>5,97</b>
4.	7			+	one-pot	-21,9	5,97
					drop-wise	<b>-21,6</b>	<b>6,24</b>
5.	5	1	5	-	one-pot	-17,4	4,09
					drop.wise	<b>-18,5</b>	<b>4,15</b>
6.	5			+	one-pot	-22,8	4,66
					drop-wise	<b>-22,5</b>	<b>4,20</b>
7.	7			-	one-pot	-23,3	5,72
					drop-wise	<b>-21,6</b>	<b>6,25</b>
8.	7			+	one-pot	-17,9	6,06
					drop-wise	<b>-17,7</b>	<b>6,31</b>

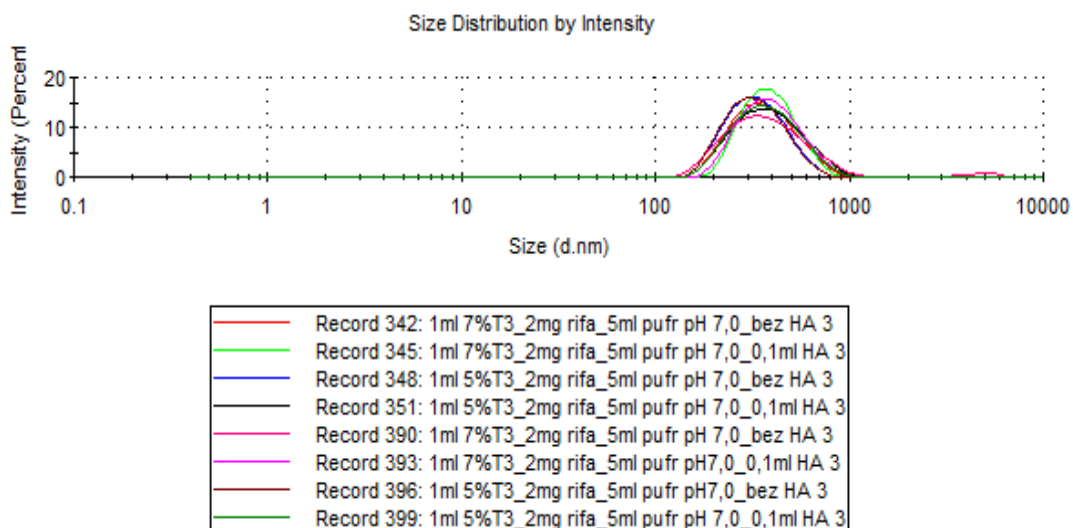
\*šedou sú označené výsledky z kapitoly 10.2.6

Tabuľka 21 Vplyv metódy zmiešania fáz na ZP a EE



Obrázok 27 – Distribučná krivka veľkosti častíc u analogických vzoriek č. 1 – 4 (sledovanie vplyvu metódy zmiešania fáz)

\*Prvé 4 údaje značia metódu „one-pot“ (kapitola 10.2.6) a ďalšie 4 údaje značia metódu „drop-wise“ (kapitola 10.2.7)



Obrázok 28 – Distribučná krivka veľkosti častíc u analogických vzoriek č. 5 – 8 (sledovanie vplyvu metódy zmiešania fáz)

\*Prvé 4 údaje značia metódu „one-pot“ (kapiola 10.2.6) a ďalšie 4 údaje značia metódu „drop-wise“(kapitola 10.2.7)



Obrázok 29 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 8 z kapitoly 10.2.7 pripravených metódou „drop-wise“ (súhrn)

\*Všetky tieto vzorky boli pripravené „drop-wise“ metódou (kapitola 10.2.7)

Z nameraných hodnôt je možné dôjsť k záveru, že rýchlosť zmiešania fáz nemá markantný vplyv na veľkosť NPs, pokiaľ sa zohľadní objem nanodisperzií, s istou mierou opatrnosti z dôvodu malého počtu vzoriek je možné predpokladať menšie NPs v prípade použitia one-pot metódy, čo sa potvrdilo u nanodisperzie s väčším objemom. Čo sa týka ZP, mal kolísavý charakter u všetkých vzoriek, teda nebol zistený vplyv rýchlosti

zmiešania fáz na tento parameter. Dekoráciou NPs bola opäť potvrdená zväčšená veľkosť výsledných NPs ako by sa dalo predpokladať. ZP nebol dekoráciou ovplyvnený. Zaujímavým zistením však bolo, že u nedekorovaných NPs sa javila výhodnejšia „one-pot“ metóda zmiešania fáz z hľadiska získania nanodisperzie s nižšou polydisperzitou, naopak u dekorovaných vzoriek sa zdá byť použitie „drop-wise“ metódy výhodnejšie z hľadiska získania nanodisperzie nižšej polydisperzity. Z dôvodu relatívne rozmerných NPs bola skoro u všetkých vzoriek preukázaná relatívne uspokojivá EE. V rade prípadov presahovala hodnotu 6%. Čo sa týka zrovnania zmeny pomeru fáz, u nanodisperzie s menším objemom, nebola preukázaná jasná závislosť medzi použitím „drop-wise“ metódy a zväčšením NPs.

### 10.2.8 Vplyv dekorovania vodným roztokom XK na parametre NPs

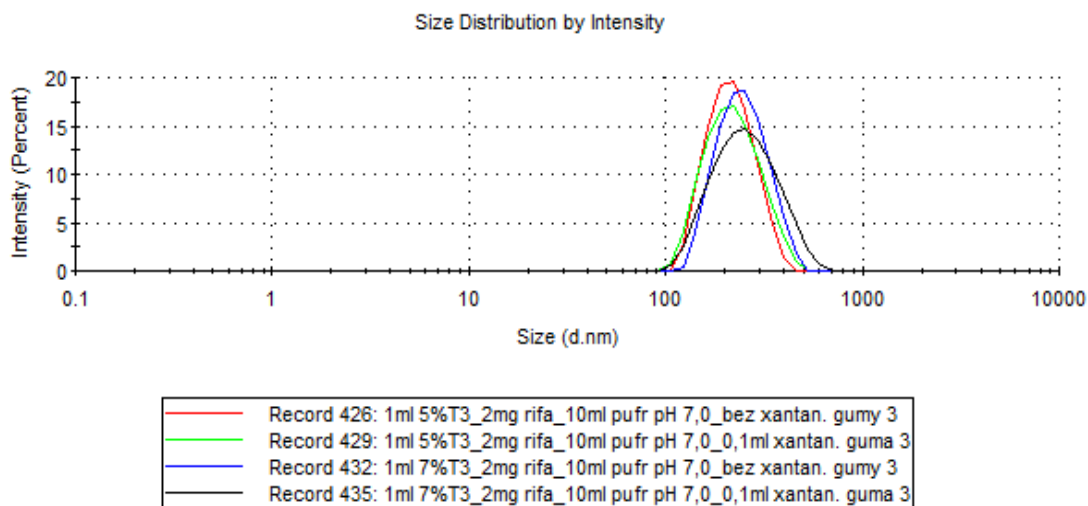
Na dekorovanie bol použitý 0,025% vodný roztok XK v množstve 0,1ml , ktorý bol pridaný modifikovanou „one-pot“ metódou do vonkajšej fázy za stáleho miešania ešte pred pridaním vnútornej fázy. Vnútoraná fáza bola pridávaná „one-pot“ k vonkajšej fáze za stáleho miešania.

Vnútoraná fáza [1ml] - 2mg RIFA + T3 v DMSO

Vonkajšia fáza [10ml] - FC roztok pH 7,0

Vzorka číslo	T3 [%]	0,1ml XK „one-pot“	Z-ave [nm]	pDI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [mV]	EE [%]
1.	5	-	203,4	0,069	219,8	100,0	-25,9	3,95
2.		+	211,3	0,140	226,2	99,4	-28,3	3,88
3.	7	-	232,7	0,081	255,5	100,0	-28,3	5,36
4.		+	235,1	0,091	261,3	100,0	-26,6	5,76

Tabuľka 22 - Vplyv prítomnosti dekorovania vodným roztokom XK na parametre NPs



Obrázok 30 – Distribučná krivka veľkosti častíc u vzoriek č. 1 – 4  
(sledovanie vplyvu dekorovania s vodným roztokom XK)

Pre testovanie boli zvolené relatívne veľké nanočastice prasaajúce rozmer 200nm. Nanočastice s xanthanovou klovatinou mali vyššiu hodnotu polydisperzity a podľa predpokladu bola nepatrne väčšia veľkosť nanočastíc. ZP nebol anionickým polysacharidovým polymérom ovplyvnený.

### 10.2.9 Vplyv prítomnosti dekorovania termicky degradovanou XK na parametre NPs

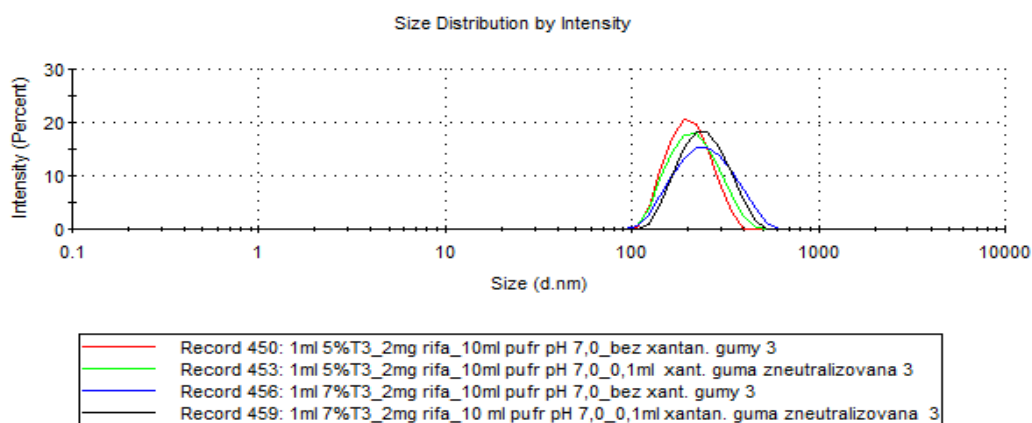
Na dekorovanie bol použitý roztok termicky degradovanej XK v kyslom prostredí, ktorý bol zriedený čistenou vodou na 0,025% roztok XK v 0,025 molárnom roztoku HCl a následne bol zneutralizovaný 10% roztokom NaOH na pH 7-8. Z tohto dekorovacieho roztoku bolo odoberaných po 0,1ml do dekorovaných vzorkov. Dekorovací roztok bol pridaný do vonkajšej fázy modifikovanou „one-pot“ metódou za stáleho miešania ešte pred pridaním vnútornej fázy. Vnútoraná fáza sa pridávala k vonkajšej „one-pot“ za stáleho miešania.

Vnútoraná fáza [1ml]- 2mg RIFA + T3 v DMSO

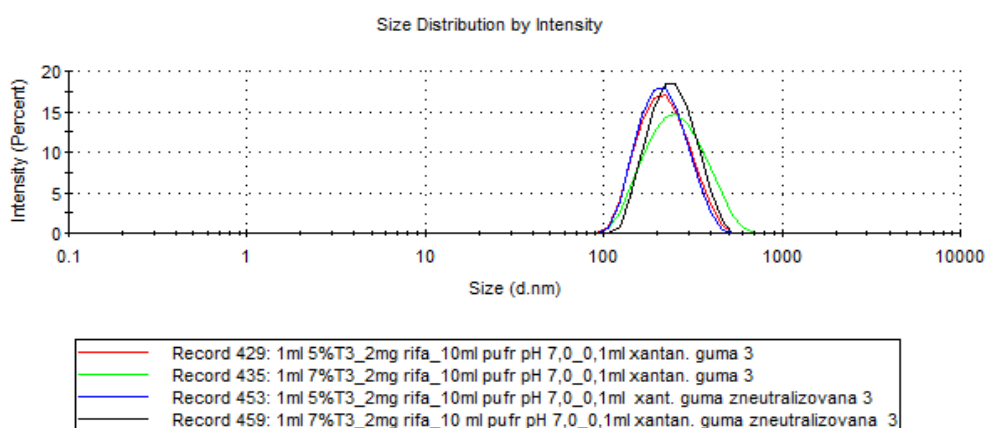
Vonkajšia fáza [10ml] - FC roztok pH 7,0

Vzor-ka číslo	T3 [%]	0,1ml termicky degr. XK „one-pot“	Z-ave [nm]	pdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [mV]	EE [%]
1.	5	-	194,3	0,065	208,3	100,0	-26,7	3,68
2.		+	203,0	0,061	218,8	100,0	-22,5	4,14
3.	7	-	228,4	0,083	250,6	100,0	-26,8	5,48
4.		+	230,4	0,078	251,1	100,0	-26,5	5,66

Tabuľka 23 - Vplyv prítomnosti dekorovania s termicky degradovanou XK na parametre NPs



Obrázok 31 – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 4 (sledovanie vplyvu dekorovania častíc s roztokom termicky degradovanej XK)



\*Porovnanie výsledkov pre dekorované vzorky č. 2,4 z kapitoly 10.2.8 a 10.2.9

Obrázok 32 - Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 2 a 4 z kapitol 10.2.8 a 10.2.9 (porovnanie dekorovania s vodným roztokom XK a roztokom termicky degradovanej XK)



NPs dekorované termicky degradovanou XK použitou v rovnakej koncentrácii vykazovali narozdiel od dekorácie vodným roztokom XK nepatrne menšie rozmery NPs s nižšou hodnotou polydisperzity. ZP nebol významne ovplyvnený.

## 11. Závery

- A) Bolo preukázané, že je možné jednoduchým postupom dekorovať nanočastice z biodegradabilných polyesterov kyselinou hyaluronovou a xantanovou klovatinou a modifikovať tak ich povrchový náboj.
- B) Disperzie polyesterových nanočastíc s enkapsulovaným rifampicínom v prostredí elektrolytu bez tenzidu sú do pH 5,2 odolné k aglomerácii.
- C) Disperzie polyesterových nanočastíc s enkapsulovaným rifampicínom v prostredí vody bez tenzidu aglomerujú, pričom kationický tenzid DMAB dokázal pozitívny vplyv na prevenciu tejto aglomerácie v prostredí vody ako vonkajšej fázy. Dekorácia s HA túto aglomeráciu nijak neoplyvnila.
- D) Disperzie obsahujúce ako vonkajšiu fázu elektrolyt s pH 5,0 a nižšou v kombinácii s DMAB vykazovali aglomeráciu, DMAB sa teda preukázal ako vhodný stabilizátor len u disperzie nanočastíc obsahujúcej ako vonkajšiu fázu iba samotnú vodu.
- E) Pri použití rifampicínu v 10x vyššej koncentrácii (4%) vo fosfát-citrátovom roztoku o pH 3,5 došlo k zvratu ZP zo zápornej hodnoty na kladnú.
- F) Ako zaujímavá sa dá hodnotiť nanodisperzia obsahujúca fosfát-citrátový roztok o pH 5,2 ako vonkajšiu fázu; u ktorej bola veľkosť nanočastíc významne väčšia a s relatívne vysokou enkapsulačnou účinnosťou.
- G) Pri dekorácii s HA bola najnižšia polydisperzita veľkosti nanočastíc získaná pri použití modifikovanej „one-pot“ metódy dekorovania, v ktorej bol dekorovací roztok pridaný do vonkajšej fázy ešte pred pridaním vnútornej fázy.
- H) Zvyšovaním koncentrácie HA použitej na dekorovanie sa zvyšovala i veľkosť výsledných nanočastíc.
- I) Prítomnosť HA použitej v rovnakom množstve na dekoráciu sa prejavila predovšetkým u disperzie s menším objemom.
- J) Rýchlosť zmiešania vonkajšej a vnútornej fázy nevykazovala jednoznačný a markantný vplyv na veľkosť nanočastíc, i keď vo väčšine vzoriek boli získané nanočastice s menšími rozmermi pri použití „one-pot“ metódy.

- K) U dekorovaných nanodisperzií sa z hľadiska polydisperzity javila výhodnejšia „drop-wise“ metóda dekorovania. U nedekorovaných nanodisperzií sa z hľadiska polydisperzity javilo výhodnejšie pridať HA do vonkajšej fázy ešte pred zmiešaním s vnútornou fázou (modifikovaná „one-pot“ metóda).
- L) Použitie termicky degradovanej XK, narozdiel od termicky nedegradovanej XK, viedlo k tvorbe nanodisperzií s nižšou polydisperzitou.
- M) Výsledky testovania vplyvu dekorovania na enkapsulačnú efektivitu liečivej látky nie sú jednoznačné, sú ovplyvnené radou faktorov.

## Príloha: tabuľka nariadenia fosfát-citrátového pufru [46]

(podľa ktorej bola pripravená škála pufrov pre experimenty)

$$x + y = 100\text{ml}$$

pH	x [ml] 0,1M kyselina citrónová	y [ml] 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
3,4	71,50	28,50
3,6	67,80	32,20
4,0	61,45	38,55
4,6	53,25	46,75
4,8	50,70	49,30
5,0	48,50	51,50
5,2	46,40	53,60
5,8	39,55	60,45
6,4	30,75	69,25
7,0	17,65	82,35

Tabuľka 24 – Príprava fosfát-citrátového pufru o rôznych pH

## Zoznam tabuliek

<b>Tabuľka 1</b> – Charakteristiky použitých polymérov na tvorbu NPs.....	40
<b>Tabuľka 2</b> – Vplyv typu a koncentrácie polyméru, prítomnosť CET, RIFA na parametre NPs.....	46
<b>Tabuľka 3</b> – Vplyv fosfát-citrátovej vonkajšej fázy o pH 3,5 na parametre NPs pri rôznom obsahu liečiva a T3.....	47
<b>Tabuľka 4</b> – Anionické NPs bez emulgátoru – vplyv škály pH fosfát-citrátového roztoku na parametre NPs pri zvyšujúcom sa obsahu liečiva a T3.....	48
<b>Tabuľka 5</b> – Anionické NPs s emulgátorom – vplyv prítomnosti DMAB na veľkosť NPs pri pH vonkajšej fázy 5,2-4,8.....	50
<b>Tabuľka 6</b> – Anionické NPs s emulgátorom – vplyv prítomnosti DMAB na ZP a EE pri pH vonkajšej fázy 5,2-4,8.....	51
<b>Tabuľka 7</b> – Vplyv prítomnosti DMAB a dekorovania s HA na veľkosť NPs vo vonkajšej vodnej fáze.....	52
<b>Tabuľka 8</b> – Vplyv prítomnosti DMAB a dekorovania s HA na ZP vo vonkajšej vodnej fáze.....	53
<b>Tabuľka 9</b> – Dekorované NPs s HA metódou „drop-wise“ pri pH vonkajšej fázy 6,4-5,2.....	54
<b>Tabuľka 10</b> – Vplyv metódy dekorovania s HA a koncentrácie T3 na veľkosť NPs pri pH vonkajšej fázy 6,4.....	55
<b>Tabuľka 11</b> – Vplyv metódy dekorovania s HA a koncentrácie T3 na ZP a EE pri pH vonkajšej fázy 6,4.....	56
<b>Tabuľka 12</b> – Sledovanie stability časticových parametrov po 20 hodinovom skladovaní pre NPs z tabuliek č. 10 a 11.....	57
<b>Tabuľka 13</b> – Vplyv koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva HA na veľkosť NPs.....	59
<b>Tabuľka 14</b> – Vplyv koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva HA na ZP a EE.....	59
<b>Tabuľka 15</b> – Sledovanie stability veľkosti po 20 hodinovom skladovaní u NPs z tabuľky č. 13.....	60
<b>Tabuľka 16</b> – Sledovanie stability ZP po 20 hodinovom skladovaní u NPs z tabuľky č. 14.....	60
<b>Tabuľka 17</b> – Vplyv postupného zvyšovania množstva HA na parametre NPs.....	62
<b>Tabuľka 18</b> – Vplyv zmeny objemu fáz na veľkosť NPs.....	64

<b>Tabuľka 19</b> – Vplyv zmeny objemu fáz na ZP a EE.....	64
<b>Tabuľka 20</b> – Vplyv metódy zmiešania fáz na veľkosť NPs.....	67
<b>Tabuľka 21</b> – Vplyv metódy zmiešania fáz na ZP a EE.....	68
<b>Tabuľka 22</b> – Vplyv prítomnosti dekorovania vodným roztokom XK na parametre NPs.....	70
<b>Tabuľka 23</b> – Vplyv prítomnosti dekorovania s termicky degradovanou XK na parametre NPs.....	72
<b>Tabuľka 24</b> – Príprava fosfát-citrátového pufru o rôznych pH.....	76

## Zoznam obrázkov

<b>Obrázok 1</b> – Nanosféry a nanokapsule [12].....	16
<b>Obrázok 2</b> - Emulzne-odparovacia metóda prípravy PNPs [8].....	23
<b>Obrázok 3</b> – Emulzne-difúzna metóda prípravy PNPs [8].....	24
<b>Obrázok 4</b> – Emulzne-reverzná vyoľovacia metóda prípravy PNPs [8].....	25
<b>Obrázok 5</b> – Metóda prípravy PNPs využívajúca princíp dialýzy [8].....	26
<b>Obrázok 6</b> – Nanoprecipitačná metóda prípravy PNPs [8].....	28
<b>Obrázok 7</b> – Elektrická dvojvrstva solvovanej častice a jej ZP [24].....	30
<b>Obrázok 8</b> – Dopplerov efekt rozptylu laserovho lúča [28].....	31
<b>Obrázok 9</b> – Elektroforetická mobilita nabitých častíc [25].....	32
<b>Obrázok 10</b> – Princíp DLS merania a výpočtu veľkosti NPs [30].....	33
<b>Obrázok 11</b> – Štruktúra PLGA a jej monoméry[38].....	39
<b>Obrázok 12</b> – Štruktúra tripenaerythritolu[39].....	40
<b>Obrázok 13</b> – Štruktúra rifampicínu [44].....	41
<b>Obrázok 14</b> – Distribučná krivka veľkosti pre vzorky č. 1 – 4 (anionické NPs bez emulgátoru).....	48
<b>Obrázok 15</b> – Distribučná krivka veľkosti pre vzorky č. 7 – 10 (anionické NPs bez emulgátoru).....	49
<b>Obrázok 16</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 11 – 14 (anionické NPs bez emulgátoru).....	49
<b>Obrázok 17</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky 1,2,3,5 (sledovanie vplyvu prítomnosti DMAB pri pH vonkajšej fázy 5,2-4,8).....	51
<b>Obrázok 18</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 (sledovanie vplyvu dekorovania s HA „dropwise“ pri pH vonkajšej fázy 6,4-5,2).....	54
<b>Obrázok 19</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 (sledovanie vplyvu metódy dekorovania a koncentrácie T3 na veľkosť častíc pri pH vonkajšej fázy).....	56
<b>Obrázok 20</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 po 20 hodinovom skladovaní (pre vzorky s distribučnou krivkou z obrázka 19).....	57

<b>Obrázok 21</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 3 – 6 (sledovanie vplyvu koncentrácie T3, typu vonkajšej fázy a množstva HA na veľkosť častíc).....	61
<b>Obrázok 22</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 3 – 6 po 20 hodinovom skladovaní (pre porovnanie s distribučnou krivkou z obrázka 21).....	61
<b>Obrázok 23</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 6 (sledovanie vplyvu postupného zvyšovania množstva HA na dekorovanie).....	62
<b>Obrázok 24</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc u vzoriek č. 1 – 4 (sledovanie zmeny objemu fáz).....	65
<b>Obrázok 25</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc u vzoriek č. 5 – 8 (sledovanie zmeny objemu fáz).....	65
<b>Obrázok 26</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 8 súhrnne (sledovanie zmeny objemu fáz).....	65
<b>Obrázok 27</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc u analogických vzoriek č. 1 – 4 (sledovanie vplyvu metódy zmiešania fáz).....	68
<b>Obrázok 28</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc u analogických vzoriek č. 5 – 8 (sledovanie vplyvu metódy zmiešania fáz).....	69
<b>Obrázok 29</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 8 z kapitoly 10.2.7 pripravených metódou „drop-wise“ (súhrn).....	69
<b>Obrázok 30</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc u vzoriek č. 1 – 4 (sledovanie vplyvu dekorovania s vodným roztokom XK).....	71
<b>Obrázok 31</b> – Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 1 – 4 (sledovanie vplyvu dekorovania častíc s roztokom termicky degradovanej XK).....	72
<b>Obrázok 32</b> - Distribučná krivka veľkosti častíc pre vzorky č. 2 a 4 z kapitol 10.2.8 a 10.2.9 (porovnanie dekorovania s vodným roztokom XK a roztokom termicky degradovanej XK).....	72



## Zoznam použitej literatúry

- [1] JAIN, N K. PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY Pharmaceutical Nanotechnology [online]. 2007 [vid. 2018-07-16]. Dostupné z: [http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/748/1/revised Pharmaceuticall Nanotech.pdf](http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/748/1/revised%20Pharmaceuticall%20Nanotech.pdf)
- [2] EL-SAY, Khalid M. a Hossam S. EL-SAWY. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **528**(1–2), 675–691 [vid. 2018-07-09]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJPHARM.2017.06.052
- [3] MISHRA, Nidhi, Prerna PANT a Juhi JAISWAL. Targeted Drug Delivery : A Review. 2016, (March).
- [4] PLACHÁ, Daniela a Josef JAMPÍLEK. ELIŠKA VACULÍKOVÁ a. *Chem. Listy* [online]. 2015, **109**, 346–352 [vid. 2018-07-15]. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2015\\_05\\_346-352.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2015_05_346-352.pdf)
- [5] TAMMAM, Salma Nabil a Alf LAMPRECHT. Nanostructures in Drug Delivery. In: *Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production* [online]. 2016. Dostupné z: doi:10.1002/9783527800681.ch6
- [6] MOHANRAJ, V J a Y CHEN. Nanoparticles-A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2006, **5**(1), 561–573 [vid. 2018-07-15]. Dostupné z: <http://www.tjpr.freehosting.net>
- [7] BANSAL, Kuldeep, Luana SASSO, Hiteshri MAKWANA, Sahar AWWAD, Steve BROCCINI a Cameron ALEXANDER. 0 Nanopharmacy: Exploratory Methods for Polymeric Materials [online]. nedatováno [vid. 2018-07-17]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527800681.ch10>
- [8] CRUCHO, Carina I.C. a Maria Teresa BARROS. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **80**, 771–784 [vid. 2018-07-09]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/J.MSEC.2017.06.004

- [9] SOPPIMATH, Kumaresh S, Tejraj M AMINABHAVI, Anandrao R KULKARNI a Walter E RUDZINSKI. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* [online]. 2001, **70**(1–2), 1–20 [vid. 2018-07-09]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4
- [10] MOGHIMI, S M V E, M L GARDA, O A R AL-HANBALI a K J RUTT. Polymeric nanoparticles as drug carriers and controlled release implant devices. *In: Nanoparticulates as Drug Carriers*. 2006, 29–42.
- [11] RANJIT, Konwar a Ahmed Abdul BAQUEE. NANOPARTICLE: AN OVERVIEW OF PREPARATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION. *Int. Res. J. Pharm* [online]. nedatováno, **2013**(4) [vid. 2018-07-15]. Dostupné z: doi:10.7897/2230-8407.04408
- [12] DU TOIT, Lisa C, Viness PILLAY, Yahya E CHOONARA, Thirumala GOVENDER a Trevor CARMICHAEL. Ocular drug delivery – a look towards nanobioadhesives. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2011, **8**(1), 71–94 [vid. 2018-07-20]. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2011.542142
- [13] STEFANI, Stefano, Sunil K. SHARMA, Rainer HAAG a Paul SERVIN. Core-shell nanocarriers based on PEGylated hydrophobic hyperbranched polyesters. *European Polymer Journal* [online]. 2016, **80**, 158–168 [vid. 2018-07-21]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2016.05.005
- [14] SONAM, Hema CHAUDHARY, Vimal ARORA, Kanchan KHOLI a Vikash KUMAR. Effect of Physicochemical Properties of Biodegradable Polymers on Nano Drug Delivery. *Polymer Reviews* [online]. 2013, **53**(4), 546–567 [vid. 2018-07-22]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2013.828751
- [15] KAMALY, Nazila, Basit YAMEEN, Jun WU a Omid C FAROKHZAD. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical reviews* [online]. 2016, **116**(4), 2602–63 [vid. 2018-07-24]. ISSN 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346

- [16] *Struktura polymerů a její vliv na vlastnosti* [online]. [vid. 2018-07-24]. Dostupné z: <https://publi.cz/books/180/03.html>
- [17] SHARMA, Shweta, Ankush PARMAR, Shivpoojan KORI a Rajat SANDHIR. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **80**, 30–40 [vid. 2018-08-18]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/J.TRAC.2015.06.014
- [18] GADAD, A P, S V Vijay KUMAR, P M DANDAGI, U B BOLMOL a N Pavani PALLAVI. Nanoparticles and their Therapeutic Applications in Pharmacy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* [online]. 2014, **7**(3), 2509–2518 [vid. 2018-02-25]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/32de/92f88376fc04447149a176bf0ac19df23d6b.pdf>
- [19] V N, Nagavarma B a Hemant KSYADAV. *DIFFERENT TECHNIQUES FOR PREPARATION OF POLYMERIC NANOPARTICLES-A REVIEW* [online]. nedatováno [vid. 2018-07-29]. Dostupné z: <https://innovareacademics.in/journal/ajpcr/Vol5Suppl3/1128.pdf>
- [20] LUÍSA, Ana a Pécurto CARTAXO. Nanoparticles types and properties- understanding these promising devices in the biomedical area [online]. nedatováno [vid. 2018-07-21]. Dostupné z: <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/844820067124759/ABSTRACTAnaCartaxo.pdf>
- [21] DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATA EI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. R. MOZAFARI. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(2), 1–17. ISSN 19994923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [22] MANAIA, Eloísa Berbel, Marina Paiva ABUÇAFY, Bruna Galdorfini CHIARI-ANDRÉO, Bruna Lallo SILVA, João Augusto OSHIRO JUNIOR a Leila Aparecida CHIAVACCI. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International journal of nanomedicine* [online]. 2017, **12**, 4991–5011 [vid. 2018-08-01]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S133832

- [23] *What is Zeta Potential* [online]. [vid. 2018-08-03]. Dostupné z: <https://www.brookhaveninstruments.com/what-is-zeta-potential>
- [24] LEARY, James F a SVM ENDOWED PROFESSOR OF NANOMEDICINE. *"The Importance of Zeta Potential for Drug/Gene Delivery in Nanomedicine"*; [online]. 2011 [vid. 2018-08-03]. Dostupné z: <https://nanohub.org/resources/13793/download/2011.09.20-Leary-Malvern.pdf>
- [25] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, **235**, 337–351 [vid. 2018-07-09]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: [doi:10.1016/J.JCONREL.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017)
- [26] *Dynamic Light Scattering* [online]. [vid. 2018-08-04]. Dostupné z: [https://www.slideshare.net/poojabhartii3/dynamic-light-scattering?next\\_slideshow=1](https://www.slideshare.net/poojabhartii3/dynamic-light-scattering?next_slideshow=1)
- [27] *Dynamic light scattering* [online]. [vid. 2018-08-03]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/MannuMaken92/dynamic-light-scattering-61278656>
- [28] *Improving cut length tolerance and long term consistency in continuous casters with laser velocimeters - EE Publishers* [online]. [vid. 2018-08-03]. Dostupné z: <http://www.ee.co.za/article/improving-cut-length-tolerance-long-term-consistency-continuous-casters-laser-velocimeters.html>
- [29] *Electrophoretic light scattering - Wikipedia* [online]. [vid. 2018-08-04]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoretic\\_light\\_scattering](https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoretic_light_scattering)
- [30] *Dynamic Light Scattering Spectrophotometer DLS-8000 | Otsuka Electronics* [online]. [vid. 2018-08-04]. Dostupné z: <http://www.otsuka-el.com/product/detail/productid/23/category1id/2/category2id/2/category3id/32>
- [31] ELSABAHY, Mahmoud a Karen L WOOLEY. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society reviews* [online]. 2012, **41**(7), 2545–61 [vid. 2018-08-04]. ISSN 1460-4744. Dostupné z: [doi:10.1039/c2cs15327k](https://doi.org/10.1039/c2cs15327k)

- [32] OWENS, Donald E. a Nicholas A. PEPPAS. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2006, **307**(1), 93–102 [vid. 2018-07-09]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJPHARM.2005.10.010
- [33] MORACHIS, José M, Enas A MAHMOUD a Adah ALMUTAIRI. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacological reviews* [online]. 2012, **64**(3), 505–19 [vid. 2018-07-10]. ISSN 1521-0081. Dostupné z: doi:10.1124/pr.111.005363
- [34] FAHMY, Tarek M., Peter M. FONG, Amit GOYAL a W. Mark SALTZMAN. Targeted for drug delivery. *Materials Today* [online]. 2005, **8**(8), 18–26 [vid. 2018-08-09]. ISSN 1369-7021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(05)71033-6
- [35] MECHANISMS, Drug Targeting. b 3 integrin receptors. The. In: [online]. 2018, s. 109–119. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/reader.action?docID=1365054&query=advanced+drug+delivery>
- [36] DAI, Wenbing, Xiaoyou WANG, Ge SONG, Tongzhou LIU, Bing HE, Hua ZHANG a Xueqing WANG. Combination antitumor therapy with targeted dual-nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2017, **115**, 23–45 [vid. 2018-07-09]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/J.ADDR.2017.03.001
- [37] NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, **32**(8–9), 762–798 [vid. 2018-08-10]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2007.05.017
- [38] *PLGA nanoparticles - EN Nanovex Biotechnologies SL* [online]. [vid. 2018-08-11]. Dostupné z: <http://www.nanovexbiotech.com/858-2/>
- [39] *TRIPENTAERYTHRITOL - CAS - 78-24-0 (05219526) - MP Biomedicals* [online]. [vid. 2018-08-11]. Dostupné z: <https://www.mpbio.com/product.php?pid=05219526&country=56>

- [40] SWORN, G. Xanthan gum. *Handbook of Hydrocolloids* [online]. 2009, 186–203 [vid. 2018-08-12]. Dostupné z: doi:10.1533/9781845695873.186
- [41] KUMAR, Anuj, Kummara Madhusudana RAO a Sung Soo HAN. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **180**, 128–144 [vid. 2018-08-12]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/J.CARBPOL.2017.10.009
- [42] SAHARUDIN, S H, Z AHMAD a M BASRI. *Role of xanthan gum on physicochemical and rheological properties of rice bran oil emulsion* [online]. 2016 [vid. 2018-08-12]. Dostupné z: [http://www.ifrj.upm.edu.my/23 \(04\) 2016/\(2\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20(04)2016/(2).pdf)
- [43] TUPIN, Audrey, Maxime GUALTIERI, Françoise ROQUET-BANÈRES, Zakia MORICHAUD, Konstantin BRODOLIN a Jean-Paul LEONETTI. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2010, **35**(6), 519–523 [vid. 2018-08-12]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017
- [44] *Rifampicin | Sigma-Aldrich* [online]. [vid. 2018-08-12]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/rifampicin822941329246111?lang=en&region=CZ>
- [45] Josef MAŠEK. *UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Katedra farmaceutické technologie Částicové medikované systémy DIPLOMOVÁ PRÁCE* [online]. B.m., nedatováno [vid. 2018-08-19]. b.n. Dostupné z: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/91212/DPTX\\_2015\\_1\\_1\\_1160\\_0\\_375813\\_0\\_173927.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/91212/DPTX_2015_1_1_1160_0_375813_0_173927.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [46] *Buffer Reference Center | Sigma-Aldrich* [online]. [vid. 2018-08-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>