

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



Príprava biodegradovateľných nanočastíc pre dodanie
hydrofilných makromolekulárnych liečiv

Diplomová práca

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Dňa 14.05.2019 v Hradci Králové

.....

Alexandra Szanyiová

Na tomto mieste by som chcela poďakovať za ochotu a podporu pánovi PharmDr. Ondřejovi Holasovi, PhD. a pani Mgr. Jane Kubačkovej, a taktiež za zaradenie do projektu SVV 260 401.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické technologie

Školiteľ: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Poslucháč: Alexandra Szanyiová

Názov diplomovej práce: Príprava biodegradovateľných nanočastíc pre podanie hydrofilných makromolekulárnych liečiv

Práca sa zaoberá prípravou nanočastíc enkapsulujúcich hydrofilné makromolekulárne látky (napr. proteíny). Nanočastice sa pripravovali pomocou polyméru PLGA, nasyntetizovaného na Katedre farmaceutickej technológie. Ako modelové látky sa používali Rodamín B, fluorescenčne značený dextran a fluorescenčne značený albumín. Zvolenými metódami prípravy boli duálna emulgácia a nanoprecipitačná metóda. Následne prebiehali tri cykly centrifugácie k oddeleniu nanočastíc od média. Sledoval sa efekt rozličných polymérov a stabilizátorov na výsledné parametre častíc. Konkrétne sa zisťovali rozdiely vo veľkosti, zeta potenciálu a úspešnosti enkapsulácie. Zmeny v hodnotách týchto parametrov vznikali v závislosti od zvolených polymérov, stabilizátorov, enkapsulovanej látky, doby centrifugácie.

Získané nanočastice dosahovali veľkosť od 150-474 nm a zeta potenciál približne 30 mV. Dosiahnutie úspešnej enkapsulácie proteínu bolo našim hlavným zameraním, pričom jeho množstvá v nanočasticiach mali oproti enkapsulovanému rodamínu a značenom dextranu oveľa nižšie hodnoty. Na bariéry v príprave sme narazili pri oddelovaní nanočastíc z média. Agregácia častíc počas centrifugácie alebo naopak ich strata nedostatočným odstredením patrili medzi významné nežiaduce javy experimentu. Komparácia dvoch metód pri enkapsulácii rovnakej látky odhalila v prípade nanoprecipitačnej metódy vhodnosť použitia rozvetvených polymérov, kým u duálnej emulgácie sa dokázalo opodstatnenie postavenia lineárneho polyméru PLGA.

Kľúčové slová: nanočastica, Rodamín B, FITC-dextran, FITC-albumín, duálna emulgácia, nanoprecipitácia

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Student: Alexandra Szanyiová

Title of thesis: Preparation of biodegradable nanoparticles for hydrophilic macromolecular drugs delivery

This study investigates the formulation of nanoparticles containing hydrophilic macromolecular components (e.g. proteins). Selected material was PLGA based compounds synthesized at Department of Pharmaceutical Technology. As model compounds were used Rhodamine B, FITC labelled dextran and FITC labelled albumin. Selected methods of nanoparticles formulation were double-emulsion technique and nanoprecipitation. Prepared nanoparticles were purified by three cycles of centrifugation and encapsulation efficacy and recovery yield was measured. Effect of different polymers and stabilizers was followed. More specifically, the principal objective was to explore the differences between size, zeta potential and efficacy of encapsulation. Changes in these characteristics were brought about by the chosen polymers, stabilizers, encapsulated compound, length of centrifugation period.

Prepared nanoparticles had size ranging between 150-474 nm and zeta potential approximately 30 mV. Even though the main goal of the study was to efficiently encapsulate protein, the amounts of encapsulated albumin were a lower compared to Rhodamine B or dextran. Main obstacles were presented by separation of nanoparticles from the medium. The centrifugation time had a significant impact on the amount of collected nanoparticles. During the centrifugation nanoparticles tended to aggregate. In case of smaller particles, centrifugation proved to be ineffective way of purification, therefore it was problematic to gain them. From the observation of the two methods working with the same substance (FITC labelled dextran) to encapsulate is clear, that nanoprecipitation is more suitable for the use of polymers branched polymers, while for double-emulsion is more appropriate for the linear PLGA polymer-based nanoparticles.

Key words: nanoparticle, Rhodamine B, FITC-dextran, FITC-albumin, double emulsion, nanoprecipitation

Obsah

Úvod a cieľ práce.....	9
1 Teoretická časť.....	10
1.1 Nanočastice	10
1.1.1 Parametre nanočastíc	10
1.1.2 Ligandy	15
1.1.3 Metódy prípravy nanočastíc.....	16
1.2 Polyestery.....	20
1.2.1 PLGA	20
1.3 Mechanizmy uvoľnenia liečiv z biodegradovateľných nanočastíc	20
1.4 Význam nanočastíc	21
2 Experimentálna časť	24
2.1 Použité suroviny.....	24
2.2 Použité prístroje	25
2.3 Použité metódy.....	25
2.3.1 Duálna emulgácia	25
2.3.2 Nanoprecipitácia	27
2.3.3 Purifikácia surovej nanosuspenzie.....	28
2.4 Analýza	28
2.4.1 Dynamic light scattering (DLS) a zeta potenciál.....	28
2.4.2 Spektrofotometria	29
2.4.3 Fluorescenčná spektroskopia	30
2.4.4 Porovnanie RY.....	32
3 Výsledky a diskusia	34
3.1 Vyhodnotenie výsledkov nanočastíc s Rodamínom B.....	34
3.1.1 Duálna emulgácia	34
3.1.2 Výťažnosť (recovery yield: RY).....	37
3.2 Vyhodnotenie výsledkov NČ s FITC-dextranom	38
3.2.1 Nanoprecipitácia	38
3.2.2 Duálna emulgácia	41
3.3 Vyhodnotenie výsledkov NČ s FITC-albumínom	45
3.3.1 Duálna emulgácia	45

3.4	Celkový prehľad výsledkov	54
4	Zhrnutie.....	59
4.1	Bariéry v príprave nanočastíc s hydrofilným liečivom	61
	Záver	63
	Zoznam grafov	64
	Zoznam tabuliek	66
	Použitá literatúra	67

Zoznam skratiek

A2	kopolymér PLGA s pridaním 2% kyseliny polyakrylovej ako vetviacej zložky
A4	kopolymér PLGA s pridaním 4% kyseliny polyakrylovej ako vetviacej zložky
ACN	Acetonitril
BSA	bovinný sérový albumín
DCM	Dichlormetán
DE	duálna emulgácia
DLS	Dynamic light scattering
EE	enkapsulačná efektívnosť
FITC-albumín	Fluoresceinom značený albumín
FITC-dextran	Fluoresceinom značený dextran
FNP	Flash nanoprecipitácia
NČ	nanočastica/ nanočastice
NP	nanoprecipitácia
Kolliphor	Poloxamer, Kolliphor® P-188
PCL	poly(ϵ -kaprolaktón)
PDI	polydisperzita
PEG	poly(ethylenglykol)
PGA	poly(glykolová) kyselina
PLA	poly(mliečna) kyselina
PLGA	poly(mliečna-ko-glykolová) kyselina
Pluronic	Poloxamer, Pluronic® F-127
RES	retikuloendoteliálny systém
Rodamín B	Rhodamin B Sigma-Aldrich s.r.o.
ROS	reaktívne kyslíkové radikály
RY	recovery yield
Span 20	Sorbitan monolaurát, Span 20®, Sigma-Aldrich s.r.o.
Tween	Tween® 20, polysorbát 20, pegylovaný sorbitan monolaurát

Úvod a cieľ práce

Liekové formy existujú z dôvodu zabezpečenia efektívnej cesty dodania liečiv. Okrem vlastností samotnej liečivej látky nesie zodpovednosť za celkový účinok aj spôsob podania. Schopnosť liekovej formy poskytnúť predĺžený účinok, cieleňú liečbu určitého tkaniva alebo zníženie toxicity pre zdravé tkanivo je čím ďalej, tým zásadnejšia vlastnosť. Využitím technológie nanočastíc je možné tieto charakteristiky dosiahnuť.

Dôležitosť výskumu nanočastíc spočíva v ich značnom potenciáli biomedicínskeho využitia založenom na ich schopnosti enkapsulovať liečivá. Dokážu permeovať a prechádzať rôznymi tkanivami, naviazať sa na receptory, vniknúť do cieľových buniek a vplývať na intracelulárne deje. Napriek potencionálnemu významnému prínosu, ich príprava stále nie je na úrovni zavedenia do výrobnjej praxe. Metód prípravy je niekoľko, pre enkapsuláciu hydrofilných liečiv je najvhodnejšou duálna emulgácia a pre hydrofóbne látky nanoprecipitačná metóda. Z tohto dôvodu boli k prevedeniu experimentov zvolené tieto metódy.

Liečivé látky modernej medicíny sú najčastejšie charakteru peptidov, proteínov a nukleových kyselín. Avšak, jedná sa o látky senzitivne na podmienky vonkajšieho prostredia, prípadne citlivé na enzymatické pôsobenie po aplikácii do organizmu, preto je vhodná formulácia liečivého prípravku zásadná. Riešením môže byť enkapsulácia liečivých látok do mikro a nanočastíc. Preto bolo naším cieľom zistenie najvhodnejších podmienok prípravy k dosiahnutiu čo najefektívnejšej enkapsulácie liečiv porovnaním polymérov, stabilizátorov a ďalších faktorov a charakterizácia vytvorených častíc.

Cieľom tejto práce bolo nájsť metódu vhodnú pre prípravu nanoformulácie slúžiacej k cieleňému dodaniu makromolekulárnych hydrofilných liečiv. Pre prácu boli vybrané netoxické, biokompatibilné a biodegradovateľné materiály založené na kyseline poly(mliečnej-ko-glykolovej). Ako modelové látky sa použili fluorescenčne značený dextran a fluorescenčne značený proteín.

1 Teoretická časť

1.1 Nanočastice

Za nanočastice (NČ) využívané vo farmaceutickom obore sa považujú častice s veľkosťou od 1 do 500 nm, obklopené medzifázovou vrstvou, ktorá môže byť rôzne derivatizovaná a funkcionalizovaná. Táto vrstva je neoddeliteľnou súčasťou častíc a zúčastňuje sa na charakterizácii všetkých vlastností častice.¹

Priebehom času sa hodnota technológie NČ v biomedicíne zvýšila. Ich vysoká stabilita, biokompatibilita a nízka toxicita umožnili ich využitie v dodaní liečiv, zobrazovacích systémoch a biosenzoroch. Vďaka ich veľkosti, ako aj ich optickým vlastnostiam, je možné ich skúmať mikroskopickými a spektroskopickými metódami.

1.1.1 Parametre nanočastíc

K dosiahnutiu efektívneho využitia NČ je nutné brať ohľad na ich fyzikochemikálne vlastnosti ako veľkosť, distribúcia povrchového napätia, derivatizácia povrchu, kapacita naplnenia, interakcie, ale aj elasticita.² Tieto parametre ovplyvňujú správanie NČ v ľudskom tele. Veľkosťou NČ je zásadne definovaná biodistribúcia, derivatizácia povrchu môže byť využitá k zvýšeniu efektívnosti liečby, kapacita naplnenia udáva množstvo enkapsulovaného liečiva, interakcie ovplyvňujú dobu zotrvania (NČ) v tele a elasticita sa prejavuje pri prieniku do tkanív.

1.1.1.1 Veľkosť

Veľkosť NČ sa zúčastňuje na modulácii interakcií s biologickým prostredím, v zmysle vplyvu na internalizáciu, intracelulárny transport, vaskulárnu distribúciu, extravazáciu, ale aj tkanivovú difúziu. Významne tak určuje efektívnosť dodania liečiva.³

1.1.1.1.1 Biodistribúcia a liekové formy

Lieková forma dokáže slabo rozpustné liečivo premeniť na efektívnu formuláciu a liečivo s krátkym polčasom na formuláciu s predĺženým účinkom, oneskoreným účinkom či pulzným uvoľňovaním. Preto budú mať nové liekové formy vysoko hodnotné postavenie vo vývoji nových liečiv. K možnosti zavedenia sľubných

liečiv a efektívnejšieho využitia už existujúcich, ktoré sa vyznačujú slabou rozpustnosťou vo vode, je potrebné vyvinutie nových liekových foriem bez používania organických rozpúšťadiel.⁴

Po podaní liečiva pacientovi sa NČ obyčajne dostávajú do obehového systému. Častice sa distribuujú do fenestrovaného tkaniva krvnými riečišťami rôznych prierezov, pri čom je veľkosť častíc rozhodujúca spoločne s veľkosťou fenestrácie. Štruktúra tkanív a možnosť transportu do nich je veľmi rôznorodá, preto je cesta podania NČ zásadná pre definovanie kinetiky transportu a efektívnosti doručenia liečiva. Medzi najčastejšie cesty podania NČ patrí orálne (p.o.), intravenózne (i.v.), subkutánne (s.c.), intradermálne (i.d.), intramuskulárne (i.m.), nazálne a pľúcne podanie. **Chyba! Záložka nie je definovaná.**^{5,6}

Moderné technológie dodávania liečiv majú svoje začiatky spred 60 rokov. Vyvinuli sa mnohé liekové formy, ktoré musia zvládnuť fyzikochemikálne a biologické bariéry. K dosiahnutiu úspechu moderných liekových foriem je nutné prekonanie ľudskej fyziológie.⁴

Po extravazácii sa NČ dostávajú do extracelulárneho priestoru, kde narážajú na podobné bariéry ako NČ podané do tkaniva. NČ s veľkosťou 100 nm síce budú efektívne putovať ku tkanivu, ale narazia na problém pri penetrácii do buniek cieľového tkaniva. Do interstícia buniek sa dostanú NČ veľké 40-70 nm.¹

Pri podaní špecifických NČ k cielej terapii sa najčastejšie využíva i.v. podanie. Následne sa distribuujú NČ v obehovom systéme až kým nedôjde endocytózou, pasívnou difúziou alebo fenestráciou z kapilárneho systému k úniku do tkanív. NČ do 30 nm sú z tela odstraňované obličkami, v rozpätí 30-200 nm pečajú a častice veľkosti nad 200 nm sú vychytávané slezinou. **Chyba! Záložka nie je definovaná.** NČ menšie ako 6 μm a väčšie ako 100 nm sú atraktívne pre retikulo-endoteliálny systém (RES). Častice väčšieho charakteru (30-100/150 nm) pretrvávajú v cirkulácii dlhšiu dobu, pretože nie sú vylučované obličkami, ani vychytávané RES.⁷

Najefektívnejšia veľkosť NČ pri zacielení lymfatických uzlín je pravdepodobne 20-50 nm. Väčšie NČ dosiahnu uzliny až neskôr dendritickými bunkami.⁸

Príkladom vzťahu biodistribúcie a veľkosti NČ sú rakovinové a zápalové ochorenia. Sú to ochorenia, u ktorých sa objavuje angiogenéza. Lenže v tumoroch sa

vyskytuje nedostatok pericytov, teda buniek podporujúcich zrenie endoteliálnych buniek, navyiac, objavujú sa u nich abnormality bazálnej membrány. Vedie to k tvorbe perforovaných ciev, pričom perforácie dosahujú veľkosti od 100 nm do 2 μ m. Lymfatický systém je v rakovinových útvaroch taktiež nedostatočný. Kombináciou týchto dvoch faktorov vzniká EPR-efekt, teda efekt zvýšenej permeácie a retencie. Vďaka tomuto efektu dochádza k akumulácii NČ v tumoroch. Jedná sa o multifaktoriálny efekt, kde okrem veľkosti hrá významnú úlohu aj hydrofilizácia povrchu NČ. Obecne však platí, že pre EPR sú vhodné častice s veľkosťou do 400 nm⁷

1.1.1.1.2 Vzťah veľkosti a prípravy častice

Napriek veľkému pokroku, vplyv veľkosti NČ na ich transport a doručovaciu účinnosť stále nie je úplne pochopená. Dôvodom je hlavne limitované množstvo metód na tvorbu NČ s dobre kontrolovateľnou veľkosťou a vysokým stupňom uniformity. Veľkosť NČ hrá obrovskú rolu v modulácii interakcií s biologickým prostredím, siahajúc od molekulárnej väzbovosti a povrchovej modifikácii NČ, až po väzbu bunky a NČ, internalizáciu, vnútrobunečný transport, vaskulárnu distribúciu, extravazáciu a difúziu cez tkanivo, čím priamo ovplyvňuje účinnosť dodania liečiva. Z tohto dôvodu vznikla potreba vyvinutia metód pre kontrolu veľkosti a uniformity NČ pripravovaných zo širokej škály materiálov. Keďže molekulárne sily riadia formuláciu NČ, kontrola veľkosti a distribúcie veľkosti cez stavbu polymérnych jednotiek a aktívnej zložky vyžaduje ich pochopenie. Fyzikálno-chemické vlastnosti komponentov, kinetika prechodu fáz, dynamika kvapalín, výrobné procesy, to všetko vplýva na veľkosť NČ. Tvorba NČ s úzkou distribúciou veľkosti je kritické pri skúmaní efektu veľkosti na transport, biologickú a terapeutickú efektívnosť. **Chyba! Záložka nie je definovaná.**

1.1.1.1.3 Agregácia a degradácia

Veľkosť častíc vplýva aj na ich degradáciu, pretože sa zmenšovaním objemu NČ zvyšuje ich povrch, na ktorý pôsobí okolité prostredie a enzýmy, a teda zmenšovaním veľkosti rastie rýchlosť degradácie.^{9,10}

Napriek snahám zabrániť agregácii, NČ budú interagovať z dôvodu zníženia voľnej energie medzi sebou, aj s proteínmi v biologickom prostredí. Čím menšie častice, čiže väčšie povrchové energie, tým vyššia snaha častíc naväzovať proteíny.¹¹

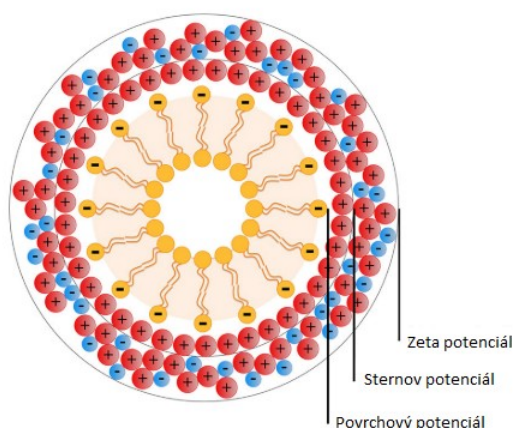
Menšia veľkosť častíc je žiaduca kvôli výhode v biologickom prostredí, avšak takéto častice sa vyznačujú vyššou voľnou povrchovou energiou.¹² Na rozhraní častice s prostredím pôsobí súhra elektrostatických, solvatačných a Van der Waalsových síl, ktoré vedú k zníženiu medzypovrchového napätia, napríklad vzájomným naväzovaním NČ, čoho výsledkom je vznik agregátu.¹³ Agregácii je možné zabrániť pridaním inertného polyméru alebo elektrostatickým nabitím NČ.³

1.1.1.1.4 Veľkosť ako premenlivý parameter

Veľkosť NČ môže byť premenlivá na základe pôsobenia vonkajšieho prostredia. Napríklad zmenou pH, teploty alebo svetla je možné vyvolať nabobtnanie častice.¹⁴ Táto vlastnosť by mohla mať potencionálne využitie v špecifickom transporte. NČ by po dosiahnutí cieľového tkaniva pôsobením stimulu vonkajšieho prostredia zväčšila svoj objem a zostala v tkanive. **Chyba! Záložka nie je definovaná.**

1.1.1.2 Zeta potenciál

Veľmi zásadnou vlastnosťou čo sa týka stability vytvorených NČ je ich zeta potenciál. K meraniu tohto parametru sa využíva mikroelektroforéza.¹⁵ Stabilné častice majú viac negatívne alebo pozitívne hodnoty zeta potenciálu, čo podmieňuje vznik väčších odporových síl medzi časticami, teda zníženie tendencie ich agregácie.¹⁶



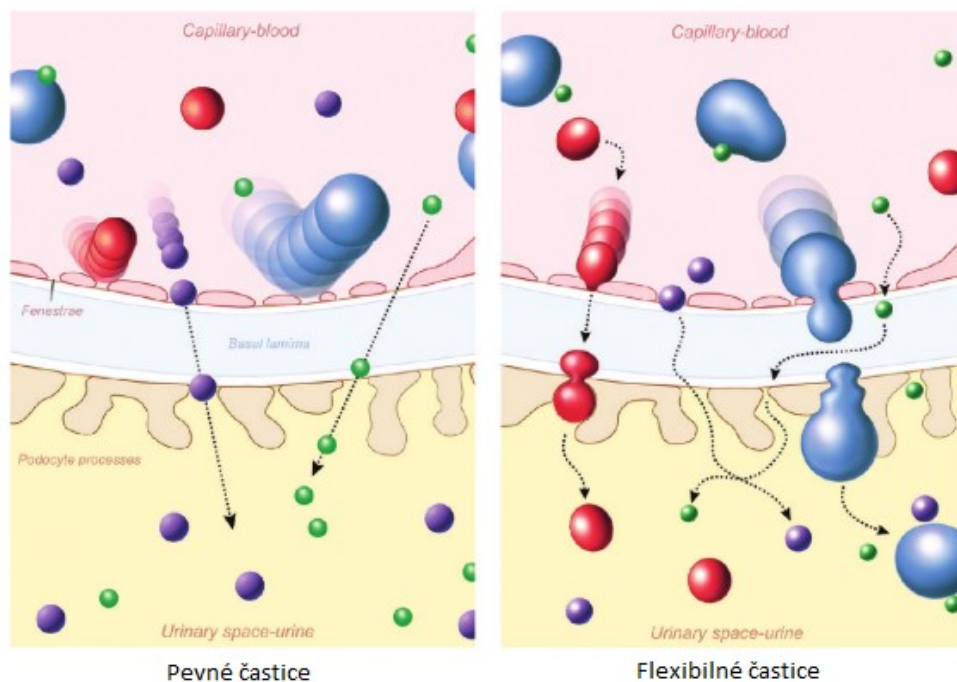
Obrázok I. Schéma dvojvrstvy nanočastice²

Zeta potenciál je štandardným analytickým parametrom, ktorý charakterizuje povrch NČ. Je definovaný ako potenciál na hydrodynamickom rozhraní (klzná vrstva),

charakterizuje stabilitu NČ, cirkulačné časy, proteinové interakcie a biokompatibilitu.¹⁷ Avšak, pre získanie plnohodnotných záverov z týchto dát je nevyhnutné poznať limitácie techniky a jasne definovať podmienky merania. Zeta potenciál závisí na teplote, pH, konduktivite (iónová sila) a viskozite. Malé zmeny v týchto parametroch môžu pôsobiť dramatickým efektom na hodnoty zeta potenciálu, čo poukazuje na vysokú citlivosť zeta potenciálu. Zmena potenciálu je funkciou vzdialenosti od povrchu NČ. Ak by sme predpokladali prípad, v ktorom povrch NČ je negatívne nabitý, najväčší potenciál bude na povrchu NČ a nazýva sa povrchový potenciál. Tento potenciál exponenciálne slabne smerom od povrchu NČ. Okolo častice vzniká vrstva asociovaných iónov opačného náboja (vzhľadom k náboju povrchu častice) nazývaná Sternova vrstva. Potenciál v tomto mieste sa teda nazýva Sternov potenciál. Za Sternovou vrstvou nasleduje druhá difúzna vrstva pozostávajúca z voľne spojených iónov. Hranica tejto vrstvy, klzná vrstva, značí kde NČ a asociované ióny fungujú ešte ako jeden celok. Napríklad, pod vplyvom elektrického prúdu, ióny za hranicou klznej vrstvy, smerom k NČ, by sa pohybovali s NČ, naopak tie smerom k prostrediu nie. Potenciál na tejto hranici sa nazýva zeta potenciál. Súhrnný názov pre tieto dve vrstvy je elektrická dvojvrstva. Zeta potenciál môže byť použitý k opisu povrchových vlastností NČ kationického, anionického alebo neutrálneho charakteru. Zeta potenciál je jedným z parametrov NČ, ktoré majú kľúčový vplyv na stabilitu nanosuspenzie. Hodnota 30 mV sa udáva ako dostatočná pre tvorbu koloidne stabilizovanej formulácie. Avšak táto hodnota je závislá aj na materiáli a napr. zlaté NČ sú stabilné aj pri hodnotách blízkych 0 mV.¹⁸

1.1.1.3 Mechanické vlastnosti

Elasticita NČ, čiže schopnosť ich deformácie, ovplyvňuje prechod biologickými bariérami, čoho výsledkom môže byť rozdielna biologická odpoveď a biodistribúcia.^{19, 20} Tento znak sa zatiaľ nepovažuje za príliš zásadný, aj keď vplyv na kontakt s tkanivami je jednoznačný. Zvýšená adaptabilita častice zabezpečuje intramolekulárnu flexibilitu. U flexibilnejších častíc sa zistila zvýšená renálna clearance.²¹



Obrázok I. Schéma glomerulárnej filtrácie pevných a flexibilných nanočastíc²⁰

1.1.2 Ligandy

Cielená liečba môže byť pasívneho alebo aktívneho charakteru. Pasívnou targetizáciou sa enkapsulované liečivo dostáva do cieľového orgánu vďaka fyzikochemikálnym vlastnostiam nosiča, kým aktívna targetizácia sa vyznačuje špecifickou derivatizáciou povrchu NČ prostredníctvom ligandov.¹³

Ligandy môžu byť charakteru proteínov (protilátky a ich fragmenty), peptidov, nukleových kyselín (aptaméry), malých molekúl a ďalších (vitamíny, karbohydráty). Cielená liečba našla svoje uplatnenie pri liečbe rôznych typov rakoviny alebo zápalov (kardiovaskulárne ochorenia, reumatoidná artritída, zápal centrálného nervového systému, hepatálneho parenchýmu). Ligandy sa viažu k cieľovým štruktúram kovalentnými alebo nekovalentnými väzbami. Medzi nekovalentné väzby patria aj hydrofóbne a elektrostatické interakcie.⁷ Najčastejšie sa využíva kovalentná konjugácia, konkrétne reakcie skupín karbonylových, aminových, sulfhydrylových alebo reakcie ortogónálne.²² Cieľom pôsobenia NČ s naviazanými ligandmi môže byť angiogenéza tumorov ligandom VEGFR²¹⁹, jeho naviazaním na receptor VEGFR, u kolorektálneho karcinómu sa využívajú bakteriálne enterotoxíny a ich väzba na

guanylcykláza C receptory, účinok v mozgu vzniká naviazaním ligandu manóza²³⁶ na receptory GLUT alebo ďalším príkladom je väzba Sialyl Lewis X²³³ ligandu na selektíny u revmatoidnej artritídy.⁷

K dosiahnutiu minimalizácie absorpcie proteínu na NČ a ich pohltienia fagocytmi je možné naviazanie polyetylén glykolu (PEG) na povrch NČ. PEG je hydrofilná látka, ktorá vďaka vodíkovým väzbám dokáže vytvoriť ochrannú bariéru z molekúl vody.²³ Avšak ani táto bariéra nedokáže absolútne zabrániť naviazaniu proteínov.

V prípade funkcionalizácie NČ špecifickými ligandmi je hustota PEG na NČ limitovaná, kvôli zachovaniu funkcií ligandov, a teda aj efektívnosti zacielenia liečby. **Chyba! Záložka nie je definovaná.**

1.1.3 Metódy prípravy nanočastíc

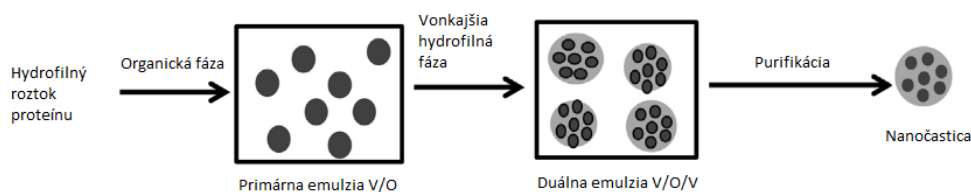
Metódy prípravy nanoemulzií sa delia na metódy vysokoenergetické a metódy nízkoenergetické. Medzi vysokoenergetické metódy patrí vysokotlaká homogenizácia, mikrofluidná homogenizácia, ultrasonifikácia, tlaková dispergácia a vysokoamplitodová ultrazvuková metóda. Spontánna emulgácia, fázová inverzia a odstraňovanie rozpúšťadla patria medzi nízkoenergetické metódy.

Prípravu NČ je tiež možné rozdeľovať na „top to bottom“ alebo „bottom to top“ metódy, pričom v prvom type dochádza k redukcii veľkosti častíc, naopak „bottom to top“ metódy sú založené na emulznej polymerizácii.

Medzi najčastejšie využívané metódy patrí emulzná odparovacia metóda, nanoprecipitácia (NP), vysolovanie, ionická gelácia a sprejové sušenie.²⁴

1.1.3.1 Emulgačné metódy

V prípade emulgačných metód je možné hovoriť o jednoduchej alebo o duálnej emulgácii (DE). Jednoduché emulzie, ako v / o a o / o, pripravené odparovaním rozpúšťadla sú relatívne vhodné pre enkapsuláciu biologicky aktívnych substancií do mikrosfér, ale sú sprevádzané zložitou odstraňovaním veľkých objemov rozpúšťadiel z disperzií. Inovatívnejšou metódou enkapsulácie hydrofilných liečiv je DE, u ktorej problémy týkajúce sa v / o a o / o sú eliminované. V každom prípade, formulácia musí byť adaptovaná chemickej podstate použitého polyméru, chemickej stabilite aktívnej molekuly a podmienkam enkapsulácie.²⁵



Obrázok II. Schéma duálnej emulgácie pre enkapsuláciu proteínov²⁵

Najčastejšie používaná technika DE pre prípravu nano a mikročastíc je duálna emulgačná metóda spojená s odparovaním rozpúšťadla. Pôvodne bola touto technikou prevádzaná mikroenkapsulácia.²⁵ Môžeme ju definovať termínom „emulzia emulzie“, čiže komplexný systém, v ktorom kvapôčky dispergovanej fázy samotné obsahujú dispergovanú fázu. Kvapky duálnej emulzie sú väčšinou veľkostne polydisperzné. V niektorých prípadoch sú tieto kvapky dostatočne veľké, aby obsiahli až 50-100 kvapiek emulzie, ale môžu mať taktiež veľkosť, ktorou obsiahnu len niekoľko kvapiek vnútornej fázy.

Dva základné typy dvojkrokových procesov DE sú voda-olej-voda (v/o/v) a olej-voda-olej (o/v/o). Pri príprave duálnej emulzie v/o/v, vnútorná vodná fáza (V1) obsahujúca liečivo je dispergovaná v olejovej fáze obsahujúcej lipofilný emulgátor. V prvom kroku, ktorý je nasledovaný dispergáciou primárnej emulzie do vonkajšej vodnej fázy (V2) obsahujúcej hydrofilný emulzifikátor. Duálna emulzia umožňuje modifikované uvoľňovanie aktívnych zložiek rozpustných vo vnútornej hydrofilnej zložke alebo dispergovaných v polymérnej matrix častíc.

Za jej najprednejšiu funkciu je považované vytváranie interného rezervoáru aktívnych zložiek, v podstate akejkolvek podstaty, čo ich dokáže ochrániť pred svetlom, enzymatickou degradáciou alebo oxidáciou. Taktiež to umožňuje pomalé a postupné uvoľňovanie aktívnych zložiek do vonkajšieho disperzného média. Jej najväčší význam spočíva v jej schopnosti enkapsulovať vo vode rozpustné látky. Medzi jej nedostatky patrí komplexnosť a termodynamická nestabilita. Ďalej heterogenita pripravených častíc a senzitivita veľkosti na rôzne parametre techniky. DE je jedinečný proces s výhodou enkapsulácie lipofilných aj hydrofilných molekúl

do polymérnych NČ. Nevýhodou je, že vyžaduje dodanie energie pre homogenizáciu a z toho plynúce problémy so stabilitou a únikom liečiva behom prípravy.

Enkapsulácia hydrofóbných a hydrofilných látok

Selekcia špecifickej techniky pre efektívnu enkapsuláciu liečiva je závislá na hydrofilite či hydrofobicite liečiva. Napriek faktu, že veľa techník bolo opísaných a aj úspešne aplikovaných k enkapsulácii hydrofóbných látok do biodegradovateľných NČ, v prípade hydrofilných liečiv enkapsulácia nie je jednoduchá. Je to spôsobené hydrofilnou povahou molekúl liečiva, ktoré sú vytesnené z hydrofóbnej matrix do dispergujúcej vodnej fáze počas tvorby častíc.

1.1.3.1.1 Funkcia stabilizátorov

Stabilizátory umožňujú zachovať fyzikochemikálny stav disperzie dvoch a viacerých nemiešateľných fáz a predísť separácii týchto fáz, čím umožňujú vyššiu stabilitu emulzného systému. Najčastejšie používané stabilizátory v DE zahŕňajú polyvinylalkohol, polysorbáty, poloxamery a estery sorbitanu.²⁵

1.1.3.2 Nanoprecipitácia

Nanoprecipitačnú techniku pre prípravu NČ pro medicínske účely prvýkrát popísal Fessi a jeho spolupracovníci v roku 1989. Výhodou metódy je jej priamočiarosť, rýchle a jednoduché prevedenie. Celý proces prípravy prebieha v jednom kroku, takže NČ vznikajú okamžite.²⁶

Využíva sa najčastejšie pre enkapsuláciu hydrofóbných liečiv, no napriek tomu je možná enkapsulácia aj hydrofilných látok.¹⁶ Základom sú dve miešateľné rozpúšťadlá.²⁶ Polymér a liečivo sú rozpustené v polárnom rozpúšťadle miešateľnom s vodou (acetón, acetonitril). Následne sa zmieša s vodným roztokom surfaktantu. Okamžite vznikajú NČ prostredníctvom difúzie rozpúšťadla do vody. Pre formáciu a stabilizáciu NČ sa využívajú rôzne anionické, kationické a neionické surfaktanty. Veľké využitie majú surfaktanty typu poloxamérov a poloxamínov.¹⁶

1.1.3.3 Mikrofluidické metódy

U týchto metód je výhodou, že umožňujú precízne zaobchádzanie s tekutinami (na škále nanolitrov až pikolitrov) použitím mikrokánalov. Vďaka čomu vzniká

vysoký pomer povrch-objem, rýchle a kontrolovane mikromiešanie a teda homogénny prenos hmoty. Navyše, kontinuálna produkcia zmierňuje variabilitu šarží, čo je dôležitý faktor pri tendenciách využitia vo výrobe. Veľkosť NČ môže byť ľahko ovládaná. Nevýhodou je, že kanáliky sú najčastejšie vyrobené z materiálov, ktoré sú veľmi citlivé na organické rozpúšťadlá, čo vedie k zväčšeniu ich objemu, zničeniu bioaktívnych látok alebo dokonca k agregácii polymérov. Riešením by bolo nanosenie vrstvy chemicky rezistentných materiálov na povrch mikrokanálikov, ale výhodnejšou alternatívou je využitie chemicky rezistentných materiálov ako sklo a nerezová oceľ. **Chyba! Záložka nie je definovaná.**

1.1.3.4 Flash nanoprecipitácia (FNP)

Flash nanoprecipitácia je jednoduchý a kontinuálny proces využiteľný na produkciu blokových kopolymérov NČ. Využíva rapídne mikromixovanie k dosiahnutiu homogénnej supersaturácie a kontrolovanej precipitácie hydrofóbných látok spolu so sústavou blokového kopolyméru. Organický prúd, ktorý obsahuje aktívnu zložku a stabilizujúci blokový polymér, a antisolventné prúdy sú zlúčené v spoločnej dutine, kde prebehne homogénna a rapídna precipitácia, teda vzniknú hydrofilným komponentom kopolyméru stabilizované NČ. FNP, ponúka prípravu NČ s dobre definovanou hustotou ligandov a skvelú efektivitu v enkapsulácii hydrofóbných látok. **Chyba! Záložka nie je definovaná.**

1.1.3.5 Template-assisted metódy

„Layer-by-layer (LbL) self-assembly“ je metóda založená na samostatnom postupnom ukladaní vrstiev polymérov alebo biologických molekúl (DNA alebo RNA) na veľkostne kontrolované jadrové NČ (vytvorené pomocou Au, Si, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a PLGA). Umožňuje prípravu NČ s dobre definovanou veľkosťou od 40 do 50 nm. Nevýhodou je potreba centrifugácie k odstráneniu prebytku polymérov, čo môže viesť k agregácii NČ. **Chyba! Záložka nie je definovaná.** „Particle Replication In Nowetting Templates“ (PRINT) patrí medzi „top-down“ metódy a využíva fluórovany perfluoropolyéter (PFPE), elastomér s nízkym povrchovým napätím. Vďaka nemu je možná kontrola veľkosti častíc, tvaru, chemickej kompozície a podmienok prípravy. Pripravené NČ sú vysoko monodisperzné, uniformné a ich veľkosť zodpovedá 100 – 500 nm. **Chyba! Záložka nie je definovaná.**

1.2 Polyestery

Výhodou syntetických polymérov je vysoká čistota, reprodukovateľnosť, biokompatibilita a biodegradovateľnosť. Polyméry odvodené od polyesteru (i.e., poly(mliečna kyselina) (PLA), poly(ϵ -kaprolaktón) (PCL), poly(glykolová kyselina) (PGA)), či kopolymér poly(mliečna-ko-glykolová kyselina) (PLGA) sú biokompatibilné a biodegradabilné, vďaka čomu sú využívané v biomedicíne.¹⁶

1.2.1 PLGA

Počas enkapsulácie je prvým a veľmi kritickým krokom výber správneho polyméru, ktorý závisí na chemickej podstate liečiva, polyméru aj na ich zamýšľanej aplikácii. PLGA poly(mliečno-ko-glykolová kyselina) je jedno z mnohých biokompatibilných a biodegradabilných polymérov často sa vyskytujúcich v DE technikách.²⁷ Potom ako ju FDA odsúhlasila pre použitie u ľudí, stala sa veľmi populárnou voľbou pre prípravu NČ.²⁵

V tele sa postupne odbúrava na biokompatibilné zložky, mliečnu a glykolovú kyselinu, hydrolýzou, a tým sa pomaly a dlhodobo (týždne až mesiace) uvoľňujú enkapsulované aktívne zložky. Tento polymér je dostupný v rôznych PLGA/PLA pomeroch. Mliečna kyselina je hydrofóbnejšia ako kyselina glykolová, preto PLGA kopolyméry bohaté na mliečnu kyselinu sú viac hydrofóbne, a teda degradujú veľmi pomaly.²⁸ Z hľadiska enkapsulácie proteínov, peptidov, nukleových kyselín a pripojených ligandov pre ciele terapiu a zobrazovanie špecifických tkanív sa PLGA stále skúma.²⁹

1.3 Mechanizmy uvoľnenia liečiv z biodegradovateľných nanočastíc

Čím vyššia je koncentrácia proteínu vo vodnej fáze, tým sa zvyšuje aj koncentrácia proteínu a úspešnosť naplnenia mikrosfér, taktiež to znamená väčšiu veľkosť týchto mikrosfér. Predpokladá sa, že uvoľnenie proteínu z biodegradabilnej PLGA mikrosféry prebieha kombináciou difúzie cez vodné kanály a difúzneho uvoľnenia zo systému eróziou a degradáciou polyméru. Prvotné uvoľnenie proteínu z PLGA mikrosféry je charakterizované iniciálnym rapídny uvoľnením, čo je

zapríčinené buď umiestnením liečiva tesne pri povrchu mikrosféry alebo na jej povrchu.³²

Na iniciálnu difúziu vplývajú hlavne parametre ako pomer proteín/polymér, veľkosť častíc a máčanlivosť nosiča.³⁰

Na fázu oneskorenia a erózie vplýva hlavne degradácia polyméru. Vo fáze erózie vplýva na uvoľnenie liečiva krystalinita, distribúcia molekulárnej hmotnosti a ko-monomér kompozícia. Na vlastnosti proteín-enkapsulovaných biodegradabilných mikrosfér vplývajú rozličné faktory formulácie, medzi ktoré patrí rýchlosť miešania, veľkosť mikrosfér, koncentrácia polyméru, viskozita roztoku polyméru, vnútorná vodná fáza, objemový pomer olejovej k vodnej fáze, koncentrácia proteínu alebo distribúcia proteínu v mikrosférach.³¹

Čím vyššia je koncentrácia proteínu vo vodnej fáze, tým sa zvyšuje aj koncentrácia proteínu a úspešnosť naplnenia mikrosfér, taktiež to znamená väčšiu veľkosť týchto mikrosfér. V mikrosférach s nízkou koncentráciou proteínu sa prenáša proteín rovnomerne, kým pri vyšších koncentráciách proteínu sa objavuje agregácia alebo vznik väčších pórov v mikrosférach. Vnútorná vodná fáza, vo forme kvapiek, obsahujúca vysokú koncentráciu proteínu, môže jednoducho splynúť a vytvoriť kanáliky, čo spôsobí zvýšenie rýchlosti uvoľnenia proteínu. Platí, že mikrosféry s vyššou koncentráciou proteínu majú vyššiu hladinu uvoľnenia liečiva. U sfér s najvyššou koncentráciou proteínu sa ukazuje pulzné uvoľnenie počas prvých desiatich dní, naopak u mikrosfér s nízkou koncentráciou proteínu dochádza k relatívne postupnému uvoľňovaniu. Koncentračný gradient je jeden z hnacích síl pre difúziu liečiva.³²

1.4 Význam nanočastíc

NČ sú široko používané v biomedicínskych vedách pre účely rôznych terapií kvôli ich vysokej biokompatibilite a chemickej stabilite. Tieto NČ môžu niesť vlastnú aktivitu alebo môžu slúžiť na enkapsuláciu slaboz rozpustných liečiv, poprípade povrchovú inkorporáciu.

Najznámejším príkladom sú NČ magnetické, s kovovým jadrom obsahujúcim Zn, Ni, Cu, Ag alebo Au, ktoré môžu byť získané synteticky alebo prirodzene izolované.³³

U niektorých sa dokázala antimikrobiálna aktivita, považovali sa preto za perfektného kandidáta pre zobrazovacie techniky ako je magnetická rezonancia, kde by zastávali dvojitú funkciu: terapeutickú a diagnostickú.³⁴

Z nanoformulácií antibiotík preukázali zvýšenú aktivitu napr. gentamicín a streptomycín. Využitie v bandážach, implantátoch alebo protézach je dnes už bežné, ale nadprodukcia reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS) pri dlhodobom použití vyvolala znepokojenie z hľadiska toxicity magnetických NČ. Vysoké dávky po dlhšiu dobu zvyšujú cytotoxické a genotoxické efekty na makrofágy, dokonca sa to týka aj polymérov pokrytých magnetickými NČ, ktoré boli považované za menej toxické ako tie neobalené. Aktivita NČ závisí na ich fyzikochemikálnych vlastnostiach, ako je veľkosť, tvar, povrch alebo aj toxicita. Riešením pre zvládnutie týchto prekážok sa stal vývoj rozličných typov NČ, zahrňujúcich polymérne NČ, micely alebo lipozómy, ktorých výhodou je možnosť obmeny ich vlastností pre zvýšenie účinnosti v zacielení alebo v dodaní liečiva.

S cieľom zníženia toxicity bez zníženia aktivity NČ bola ďalšou stratégiou inkorporácia alebo derivatizácia povrchu s rôznymi ligandmi, ako sú protilátky, malé organické molekuly, alebo proteíny, či peptidy.³⁵

Takto sa dosiahlo zníženie toxicity, zlepšenie peptidovej aktivity a zvýšenie rozpustnosti, čo viedlo k celkovému zlepšeniu farmakokinetického profilu a terapeutického indexu. S bohatými možnosťami povrchovej modifikácie, tieto proteínové NČ sa rapídne vyvinuli v peptidové NČ kvôli jednoduchšiemu výrobnému procesu a redukovanej cene výroby. Terapia peptidmi by mala obrovský potenciálny prínos v zdravotníctve. S rastúcou rezistenciou u rozličných ochorení, počnúc infekčnými chorobami a rakovinou, rastie potreba pre nové alternatívy, zlepšenia účinnosti peptidov ako liečiv alebo látok v diagnostických technikách. Schopnosť NČ mať vo svojom jadre kov disponujúci elektrostatickými interakciami podporuje ich väzbu na bakteriálne membrány, čo vedie k strate integrity a smrti baktérií.²

U vysokého množstva systémov bola zistená aktivita voči patogénom, ktoré používajú molekuly konjugované buď na povrchu alebo enkapsulované do NČ. NČ so striebrom konjugované s polymixinom B alebo NČ so zlatom konjugované s vankomycinom, oba so synergistickým efektom a vyššou aktivitou predstavujú významný príklad.^{36, 33}

Ďalšia štúdia zistila výhody použitia NČ citlivých na zmeny pH ako fúzných systémov. NČ boli formulované vzhľadom na ich cieľové bunky a fyzikochemikálne vlastnosti. Aplikácia nanolipidických systémov (ako lipozómy a micely) alebo polymérnych NČ (na základe chitosanu alebo PEG) mala veľký úspech, kvôli ich výhodnej vyššej biokompatibilite, zníženého efektu voči zdravým bunkám a zlepšenej cieľovej aktivity.³⁷ Vyvinuli sa PLGA NČ k doručeniu plektasínu, špecifického antibiotika na infekciu dýchacích ciest baktériou *Staphylococcus aureus*.

Ďalším príkladom je kombinácia micel s TAT (Trans-Activator of Transcription) a HIV-derived CPP (Cell-penetrating peptide) s antimikrobiálnou aktivitou, konjugované s cholesterolom a šiestimi argininovými zvyškami. Výhodou týchto micel, okrem zvýšenej aktivity a nízkej toxicity, je schopnosť prieniku cez hematoencefalickú bariéru, čo ponúka obrovskú výhodu pri infekciách mozgu.³⁸ Jedným z cieľov nanotechnológie je vyriešiť problém rezistencie v liečbe rakoviny vylepšením farmakokinetiky a farmakodynamiky chemoterapeutik. Štúdie sa týkali doxorubicínu, antracyklínu a daunorubicínu.³⁹

Rozvoj chemoterapeutik sa zameriava na diferenciáciu liečby v prípade tumorov a rakovinových buniek v krvnom riečišti. Najväčšia pozornosť sa venuje lipidovým NČ, ako sú lipozómy, lipid-polymér hybridné NČ, nanokapsuly, nanoemulzie, či pevné lipidové NČ. Vývoj smeruje k peptidmi funkcionalizovaným lipidovým NČ.⁴⁰

Najrozšírenejšími epidémiami dnešnej doby sú kardiovaskulárne ochorenia, ktoré spôsobujú viac úmrtí ako rakovina, AIDS alebo malária. Prístroje na detekciu aterosklerotického plátu a ruptúry plaku stále zlyhávajú, pretože podávajú len morfológickú informáciu bez priblíženia stavu zápalu a funkčných zmien.⁴¹ NČ obsahujúce kontrastné látky a peptidy sa vyvíjali práve z tohto dôvodu. V detekcii a hodnotení mikrotrombu predviedli veľký pokrok.⁴²

2 Experimentálna časť

2.1 Použité suroviny

A2 PLGA (2% kyselinou polyakrylovou vetvená poly(mliečna-ko-glykolová kyselina), syntéza na KFT FaF UK doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

A4 PLGA (4% kyselinou polyakrylovou vetvená poly(mliečna-ko-glykolová kyselina), syntéza na KFT FaF UK doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Acetonitril, Penta spol. s.r.o., Chrudim

BSA (bovinný sérový albumín)

Čistená voda, KFT FaF UK

Dichlormetán (Penta spol. s.r.o., Chrudim)

FITC-dextran (Sigma-Aldrich s.r.o)

FITC-albumín (Sigma-Aldrich s.r.o)

Kopolymér kyseliny DL-mliečnej a kyseliny glykolovej (PLGA 3:7), syntéza na KFT FaF UK, doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Kopolymér kyseliny DL-mliečnej a kyseliny glykolovej (PLGA 5:5), syntéza na KFT FaF UK doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Kopolymér kyseliny DL-mliečnej a kyseliny glykolovej s vyššou molárnou hmotnosťou (PLGA 5:5 3/12), syntéza na KFT FaF UK doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Poloxamer, Kolliphor® P 188, Sigma-Aldrich s.r.o.

Poloxamer, Pluronic® F-127, Sigma-Aldrich s.r.o.

Rhodamin B, Sigma-Aldrich s.r.o

Sorbitan monolaurát, Span 20®, Sigma-Aldrich s.r.o

T3 (3% tripentaerytroleom vetvený kopolymér kyseliny DL-mliečnej, kyseliny glykolovej, syntéza na KFT FaF UK, doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.)

Polysorbát 20, Tween® 20

2.2 Použité prístroje

Analytické váhy Ohaus discovery (Ohaus, Greifensee, Švajčiarsko), max. 210 g, d= 0,1 mg

Centrifuga Micro 7 (Fischer Scientific, Hampton, USA)

Fluorescenčný plate reader Synergy 2 (BioTek Instruments, USA)

Magnetická miešačka IKA-WERKE RT 5 power, (IKA, Staufen, Nemecko) 100-1000 ot./min.,

Spektrofotometer Specord 205, Analytik Jena (Jena, Nemecko)

Ultrazvuková sonda Microspitze MS73, Bandelin Electronic (Berlín, Nemecko)

Váhy Kern 440-53N (Kern, Balingen, Nemecko), max. 400 g, d= 0,01 g

Zetasizer ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK)

2.3 Použité metódy

K príprave NČ sa využívali dve metódy, a to duálna emulgácia a nanoprecipitačná metóda.

2.3.1 Duálna emulgácia

Emulgácia stále vyžaduje dve fázy, preto by prvým krokom bola príprava vodnej a organickej fáze. Keďže sa prevádza DE v / o / v, je potrebné pripraviť dve vodné fázy a jednu organickú.

- **Vnútoraná vodná fáza** – roztok:
 1. Rodamínu B
 2. FITC-dextranu
 3. FITC-albumínu
- **Vonkajšia vodná fáza** - hydrofilné prostredie so stabilizátormi
- **Organická fáza** – roztok polyméru s možnosťou pridania stabilizátorov, pracovalo sa so stabilizátorom Span 20.

Príprava vodnej fáze

Vnútoraná vodná fáza

Vodný roztok obsahujúci enkapsulovanú látku s objemom 200 µl sa pripravil s koncentráciou 25 µg/ml. Tento roztok predstavoval vnútornú fázu emulzie

a enkapsulovaná látka zastávala funkciu liečiva. Roztok sa pripravil navážením 1,25 mg Rodamínu B, FITC-dextranu alebo FITC-albumínu a rozpustením v čistenej vode do 50 ml. Väčšie množstvo roztoku sa pripravilo z dôvodu získania zásobného roztoku, z ktorého sa následne odpipetovalo 200 μ l k príprave NČ.

Vonkajšia vodná fáza

Navážením 0,05 g Pluronicu do banky a jeho rozpustením v 50 ml čistenej vody sa pripravil 0,1% zásobný roztok vonkajšej vodnej fáze. K samotnej príprave NČ je potrebných 10 ml tohto roztoku.

Príprava organickej fáze

Predstaviteľom organickej fáze bol roztok polyméru v DCM, ktorý sa pripravil navážením 25,0 mg polyméru a následne jeho rozpustením v 1 ml DCM. Polyméry sa teda rozpúšťali v DCM samotnom alebo v roztoku DCM s kostabilizátorom Span 20. Navážil sa kostabilizátor a objem sa doplnil na 50 ml DCM. Kostabilizátor sa v organickom rozpúšťadle rozpustil a vznikol takto zásobný roztok, z ktorého sa po rozpúšťaní polyméru odobralo po 2 ml na prípravu NČ..

Príprava nanočastíc duálnou emulgáciou

Po pripravení jednotlivých potrebných roztokov sa pristúpilo k samotnej tvorbe NČ. K roztokom polymérov s DCM o objemu 2 ml (popr. aj s kostabilizátorom) sa pripipetovalo 200 μ l vodného roztoku enkapsulovanej látky.

V neskorších experimentoch sa používal ľadový kúpeľ. Pred prevádzaním DE sa mikroskúmavky s roztokmi ochladzovali po dobu 5 minút a v kúpeli ostávali aj počas emulgovania.

Emulgácia sa previedla využitím ultrazvukovej sondy, pôsobením prístroja po dobu 30 sekúnd a na výkone prístroja asi 35 %. Po tomto kroku vznikla jednoduchá emulzia, pretože sa vodná fáza s enkapsulovanou látkou preniesla do organickej, ktorá v tejto fáze zastupovala funkciu vonkajšej fáze v sústave v / o. Aby vznikla dvojitá emulzia, ku vzniknutej emulzii sa pridalo 10 ml vodného roztoku so stabilizátorom (Pluronic) vonkajšej vodnej fáze. Ultrazvuková sonda pôsobila 60 sekúnd na maximálnom výkone 70 %. Keďže ale sústava obsahovala organické rozpúšťadlo,

ktoré je v liekovej forme nežiaduce, nasledovalo jeho odparovanie v prostredí digestora v časovom úseku 2 hodín.

2.3.2 Nanoprecipitácia

Pomocou NP sa pripravovali NČ štyroch typov (PLGA 5/5, A2, A4, T3). Po navážení 30,0 mg polyméru a 1,25 mg FITC-dextranu do jednej mikroskúmavky, sa pridalo rozpúšťadlo (acetón) o objeme 1 ml. K uľahčeniu rozpustenia sa použil ultrazvuk. Vodnú fázu predstavovalo 10 ml 0,1% roztoku Pluronicu. Samotná tvorba NČ prebehla napipetovaním organickej fáze do vodnej fáze a následným miešaním na magnetickej miešačke za odparenia acetónu.

Tabuľka I. Súhrn zloženia formulácií

vzorka	metóda prípravy	polymér	enkapsulovaná l.	stabilizátor	kostabilizátor
1	DE	PLGA5/5	Rodamín B	Pluronic 0,1%	Span 20
2	DE	PLGA5/5	Rodamín B	Pluronic 0,1%	-
3	DE	A2	Rodamín B	Pluronic 0,1%	-
4	DE	PLGA5/5	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	Span 20
5	DE	PLGA5/5	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
6	DE	A2	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	Span 20
7	DE	A2	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
8	DE	PLGA7/3	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	Span 20
9	DE	PLGA7/3	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
10	DE	A2	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
11	DE	A4	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
12	NM	PLGA 5/5	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
13	NM	A2	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
14	NM	A4	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
15	NM	T3	FITC-dextran	Pluronic 0,1%	-
16	DE	PLGA 7/3	FITC-albumín	Pluronic 0,1%	Span 20
17	DE	PLGA 7/3	FITC-albumín	Tween 0,1%	Span 20
18	DE	PLGA 7/3	FITC-albumín	Tween 1%	Span 20
19	DE	PLGA 7/3	FITC-albumín	Kolliphor 1%	Span 20
20	DE	PLGA 5/5 3/12	FITC-albumín	Pluronic 1%	Span 20
21	DE	PLGA 5/5 3/12	FITC-albumín	Tween 0,1%	Span 20

22	DE	PLGA 5/5 3/12	FITC-albumín	Tween 1%	Span 20
23	DE	PLGA 5/5 3/12	FITC-albumín	Kolliphor 1%	Span 20
24	DE	PLGA 5/5	FITC-albumín	Pluronic 0,1%	Span 20
25	DE	PLGA 5/5	FITC-albumín	Pluronic 1%	Span 20
26	DE	PLGA 5/5	FITC-albumín	Tween 0,1%	Span 20
27	DE	PLGA 5/5	FITC-albumín	Tween 1%	Span 20
28	DE	PLGA 5/5	FITC-albumín	Kolliphor 1%	Span 20

2.3.3 Purifikácia surovej nanosuspenzie

Po ukončení odparovania sa obsah vzoriek kvantitatívne preniesol do mikroskúmaviiek, aby bolo možné previesť centrifugáciu. Prebiehala v 3 cykloch po 15 minútach s výkonom centrifugy 7,2 rcf. Supernatant sa oddelil od NČ, ktorý sa následne odpipetoval. Centrifugácia prebehla teda zakaždým trikrát, pričom objem zmenšený o odobraný supernatant sa doplnil 1 ml čistenej vody. Výnimkou bol posledný cyklus.

Pri NČ s FITC-albumínom trval jeden cyklus centrifugácie 5, 10 alebo 15 minút. S cieľom zníženia straty NČ purifikáciou sa skúšal vplyv skrátenej doby centrifugácie na tento jav.

Výsledné vzorky obsahovali purifikované NČ s enkapsulovanou látkou, vytvorené daným polymérom.

Keďže boli NČ premývané počas centrifugácie, jediné farbivo vyskytujúce sa v systéme sa nachádzalo v NČ, tým sa zabránilo falošne pozitívnym výsledkom.

2.4 Analýza

2.4.1 Dynamic light scattering (DLS) a zeta potenciál

Metóda:

Pomocou DLS sa určovala veľkosť častíc, distribúcia veľkosti a zeta potenciál. Technika využíva princíp fotón-korelačnej spektroskopie. Monochromatický lúč sa po dopade na látku rozptyľuje, čo následne vyhodnocuje detektor. Kvôli Brownovmu pohybu častíc dochádza k fluktuácii intenzity svetla, ktorú DLS dokáže zachytiť.

Zeta potenciál bol meraný elektroforeticky za pomoci kyviek opatrených pozlátenými elektródami, na ktoré bol aplikovaný jednosmerný elektrický prúd. K meraniu zeta potenciálu a veľkosti častíc bol použitý Zetasizer ZS 90.

Vyhodnocovanie NČ obsahujúcich Rodamín B, FITC-dextran a FITC-albumín

Z mikroskúmaviek sa odobrali vzorky po 100 μ l, ktoré sa preniesli do kyvety Zeta-sizeru, objem sa doplnil 3,9 ml čistenej vody a previedlo sa meranie zeta potenciálu, veľkosti a distribúcie veľkosti vzniknutých NČ.

2.4.2 Spektrofotometria

Vyhodnocovanie NČ obsahujúcich Rodamín B

Pre umožnenie prevedenia spektrofotometrie na zistenie množstva enkapsulovaného Rodamínu B v NČ sa po centrifugácii v prípade NČ pridalo do mikroskúmaviek 0,5 ml ACN (acetonitril), ktorého funkciou bolo rozvoľnenie polyméru a uvoľnenie farbiva z NČ.

Kalibračná krivka

- Rozpúšťadlo: ACN
- Vlnová dĺžka: 556 nm
- Objem vzorky: 4,5 ml
- Rovnica kalibračnej krivky:

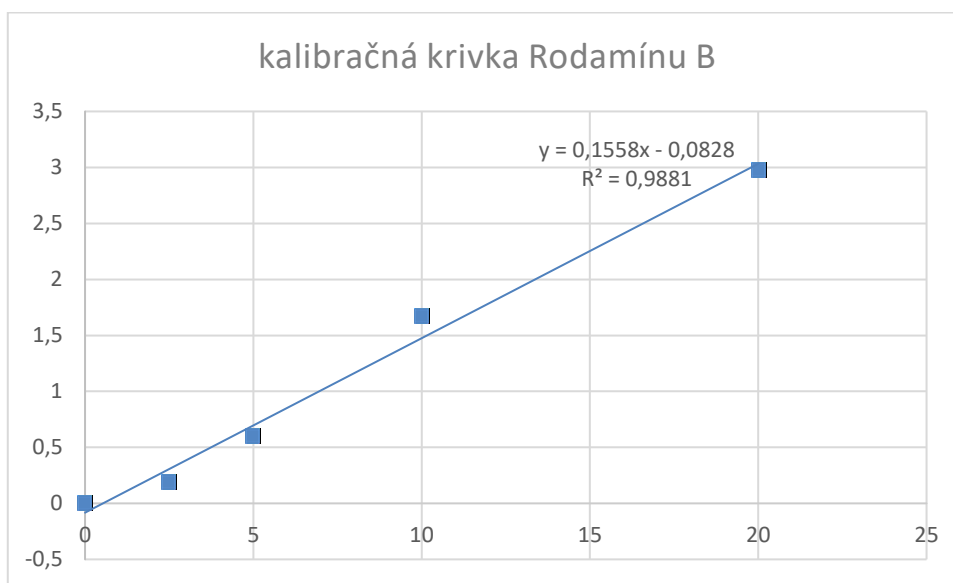
$$y = 0,1558x - 0,082 \tag{2.1}$$

$$x = \frac{y + 0,082}{0,1558} \tag{2.2}$$

(x predstavuje koncentráciu liečiva, y predstavuje absorpciu)

Tabuľka II. Tabuľka koncentrácií roztokov a nameraných absorpcií k vytvoreniu kalibračnej krivky

c (µg/ml)	A
20,02	2,97795
10,01	1,6722
5,005	0,5976
2,5025	0,18565



Graf I. Kalibračná krivka k vyhodnoteniu množstva enkapsulovaného Rodamínu B

2.4.3 Fluorescenčná spektroskopia

Vyhodnocovanie NČ obsahujúcich FITC-dextran

Kalibračná krivka:

- Blank: čistená voda
- Excitačné maximum: 485/20
- Emisné maximum: 528/20
- Objem vzorky: 150 µl
- Plató: biela 96 jamková doštička s nepriehľadným dnom
- Rovnica kalibračnej krivky:

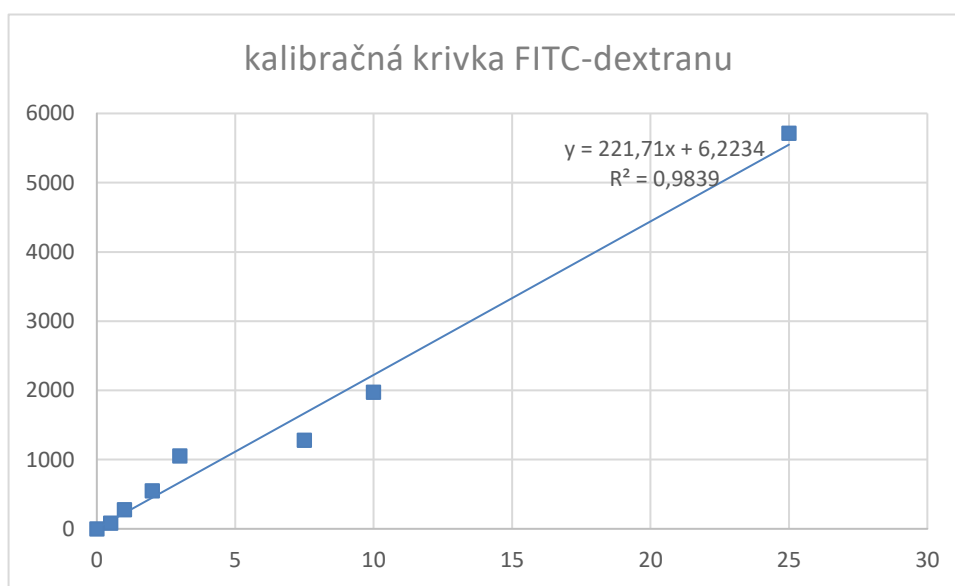
$$y = 199,23x - 342,21 \quad (2.3)$$

$$x = \frac{y + 342,21}{199,23} \quad (2.4)$$

(*x* predstavuje koncentráciu obsiahnutého liečiva v NČ, *y* predstavuje intenzitu žiarenia vzorku)

Tabuľka III. Tabuľka koncentrácií roztokov a ich nameraných fluorescencií k vytvoreniu kalibračnej krivky

µg/ml	0	0,5	1	2	3	7,5	10	25
fluorescencia	130	209	404,5	677,5	1180	1409	2101	5842,5
fluorescencia-blank	0	79	274,5	547,5	1050	1279	1971	5712,5



Graf II. Kalibračná krivka k vyhodnoteniu množstva enkapsulovaného FITC-dextranu

Vyhodnocovanie NČ s FITC-albumínom

Kalibračná krivka:

- Blank: BSA
- Excitačné maximum: 485/20
- Emisné maximum: 528/20
- Objem vzorky: 150 µl
- Plató: biela 96 jamková doštička s nepriehľadným dnom

- Rovnica kalibračnej krivky:

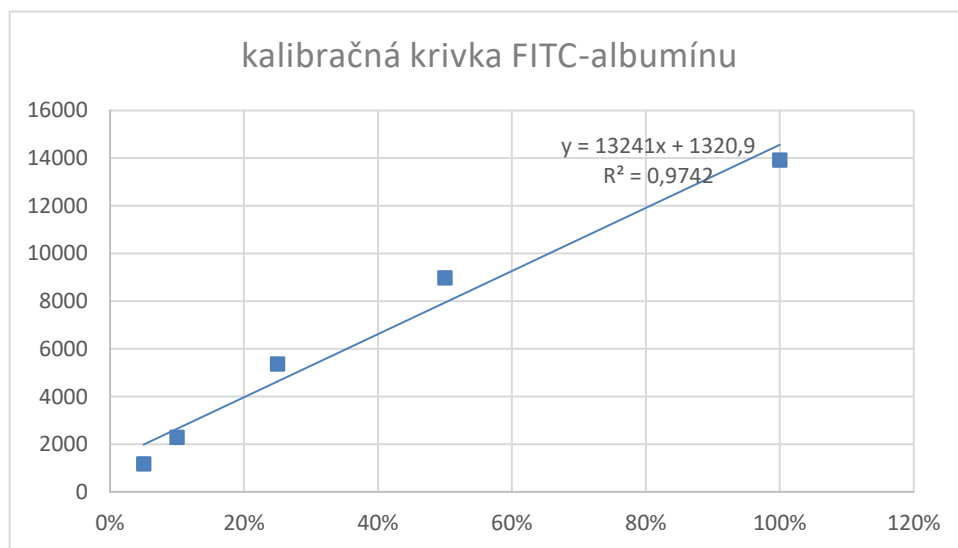
$$y = 13241x + 1320,9 \quad (2.5)$$

$$x = \frac{y - 1320,9}{13241} \quad (2.6)$$

(*x predstavuje koncentráciu, y predstavuje intenzitu žiarenia*)

Tabuľka IV. Tabuľka koncentrácií roztokov a ich nameraných fluorescencií k vytvoreniu kalibračnej krivky

	5.	4.	3.	2.	1.
	5%	10%	25%	50%	100%
fluorescencia	1355	2469	5539	9162	14102
fluorescencia -blank	1182	2296	5366	8989	13929



Graf III. Kalibračná krivka pre vyhodnotenie množstva enkapsulovaného FITC-albumínu

2.4.4 Porovnanie RY

Kontrolovala sa tiež hmotnosť vzoriek pred a po sušení. Sušením sa dosiahlo úplné odstránenie rozpúšťadiel a vodného prostredia, v ktorom sa vzorky nachádzali. Mikroskúmvky sa zväžili v prázdnom stave, následne s obsahom NČ vo vodnom prostredí a nakoniec aj po vysušení vzoriek.

$$m_{vzorka} = m_{mikroskúmvka+vzorka} - m_{mikroskúmvka} \quad (2.7)$$

$$RY(\%) = \frac{m_{N\check{c} \text{ po vysušení}}}{m_{\text{navážka polyméru}}} \times 100$$

(2.8)

(m představuje hmotnost)

3 Výsledky a diskusia

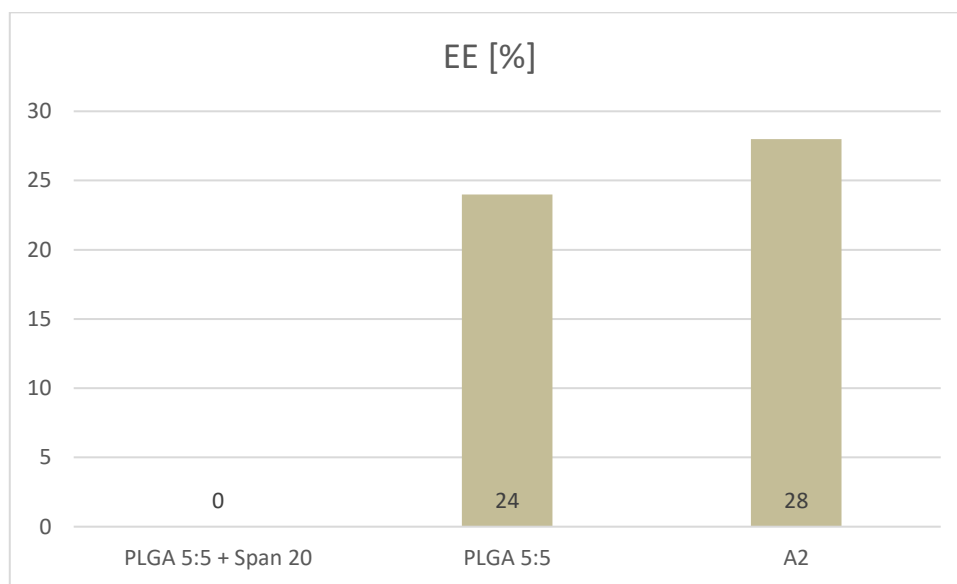
Výsledky EE, veľkosti častíc, zeta potenciálu a polydisperzít sú uvedené v tabuľkách V.-XI. a grafoch IV.-XXVII.

3.1 Vyhodnotenie výsledkov nanočastíc s Rodamínom B

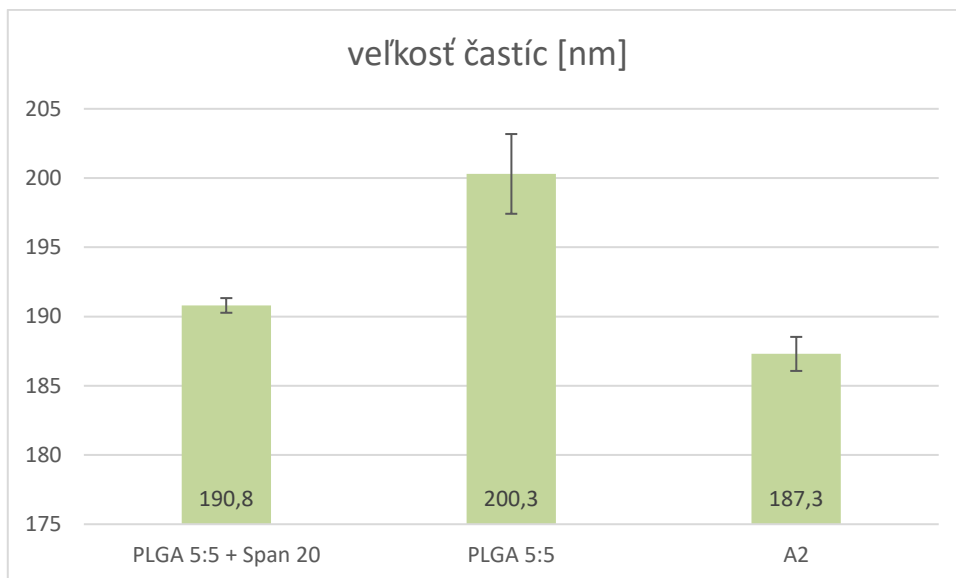
3.1.1 Duálna emulgácia

Tabuľka V. Porovnanie výsledkov NČ vytvorených duálnou emulgáciou polymérmi PLGA 5/5 a A2

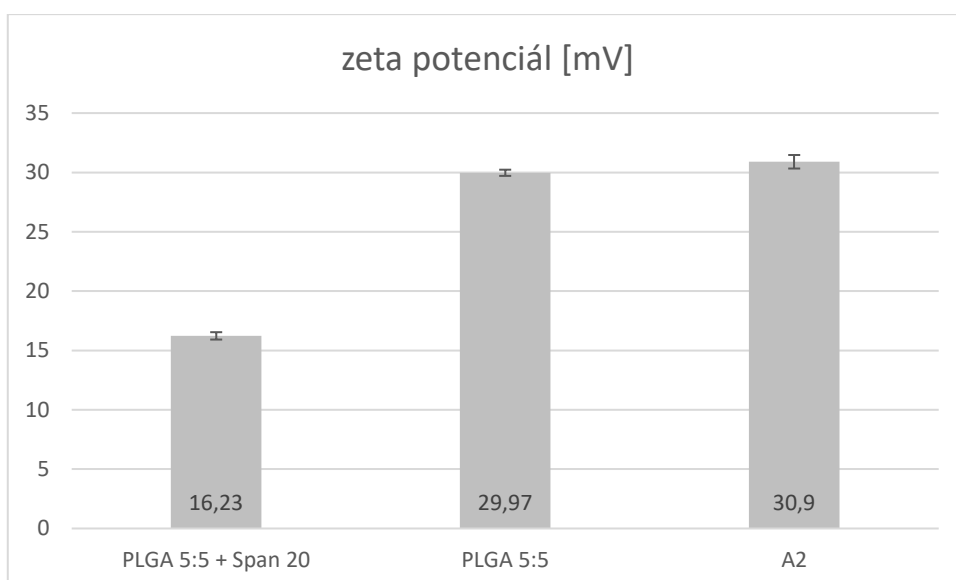
Typ polyméru	Stabilizátor	Kostabilizátor	konc. [µg/ml]	EE [%]	veľkosť častíc [nm]	zeta potenciál [mV]	pdi
PLGA 5/5	Pluronic 0,1%	Span 20	-	-	190,8	-16,23	0,251
PLGA 5/5	Pluronic 0,1%	-	3,95	24	200,3	-29,97	0,197
A2	Pluronic 0,1%	-	6,81	28	187,3	-30,9	0,152



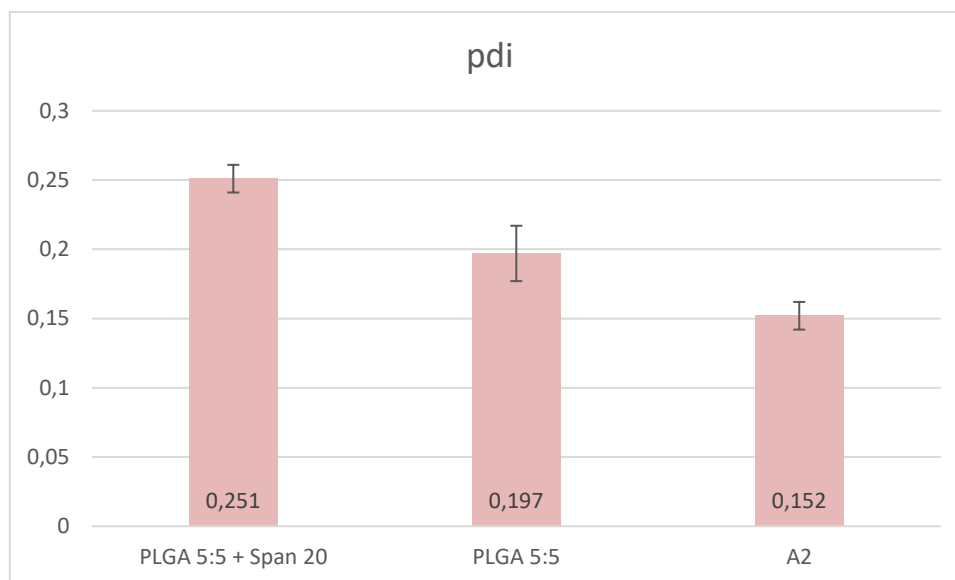
Graf IV. Porovnanie EE Rodamínu B v NČ vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2



Graf V. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2



Graf VI. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2



Graf VII. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérami PLGA 5/5 a A2

Príprava NČ s Rodamínom B, ako úvodná príprava, slúžila hlavne k preskúšaniam metódy a nastaveniu podmienok. Potvrdila sa správnosť zvolených množstiev jednotlivých komponentov, a teda polymérov, stabilizátorov a rozpúšťadiel. V tejto príprave sa pracovalo s dvoma polymérami, čím bolo PLGA 5/5 a A2. Išlo o úvodné merania, preto cieľom nebolo porovnávanie stabilizátorov, a ani samotných polymérov. Funkčnosť metódy sa potvrdila a NČ sa úspešne pripravili.

Častice pripravené pomocou polyméru PLGA 5/5 bez použitia kostabilizátoru boli veľké okolo 200 nm, teda v porovnaní s NČ vytvorenými polymérom A2 väčšie o 10 nm, ale nie je možné hovoriť o zásadnom rozdiel. Z porovnania častíc pripravených polymérom PLGA 5/5, ale s rozdielom v prítomnosti alebo neprítomnosti stabilizátoru Span 20 je vidieť znovu nepatrnú veľkostnú odlišnosť. Je teda možné usúdiť, že NČ vytvorené pomocou polyméru PLGA 5/5, či už s použitím kostabilizátoru alebo bez neho, a A2 sú, čo sa týka veľkosti, na jednej úrovni.

Celková úspešnosť enkapsulácie Rodamínu B bola u polyméru A2 (EE = 28 %) o niečo vyššia, ale výrazne sa hodnoty nelíšili.

Zeta potenciál, ktorý charakterizuje povrch NČ dosiahol u polymérov PLGA 5/5 a A2 hodnoty okolo -30 mV, kým u PLGA 5/5 za použitia stabilizátoru Span 20 to bolo len -16 mV.

Nižšia polydisperzita bola u NČ vytvorených pomocou polyméru A2.

3.1.2 Výt'aznosť (recovery yield: RY)

Tabuľka VI. Porovnanie RY(%)

RY[%]	A2	PLGA5/5
	57,6	39,2

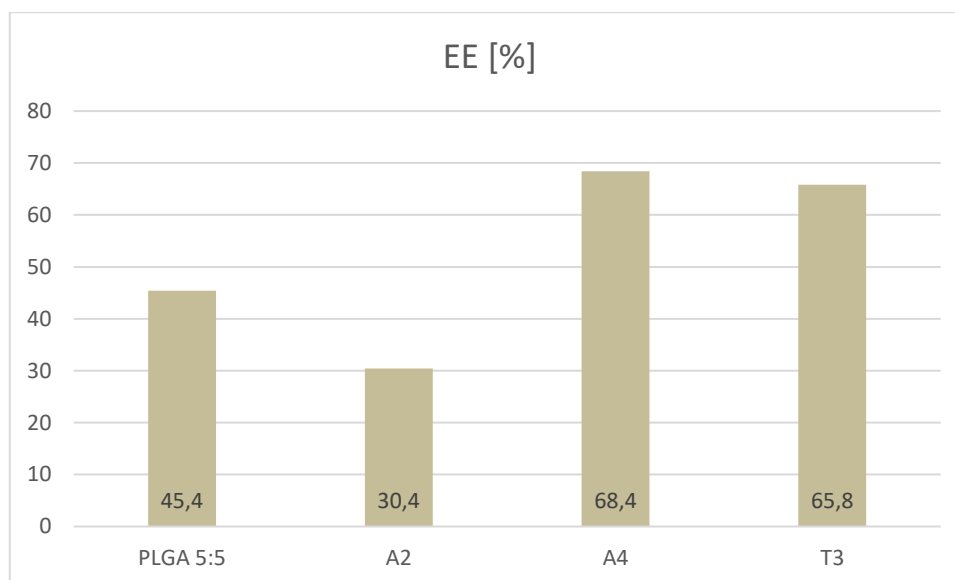
Finálna hmotnosť predstavuje hmotnosť polyméru a enkapsulovanej látky, pričom pôvodná navážka polymérov bola 25,0 mg a obsah Rodamínu B v mikroskúmvke bol 5 µg. Recovery yield bol u A2 vyšší.

3.2 Vyhodnotenie výsledkov NČ s FITC-dextranom

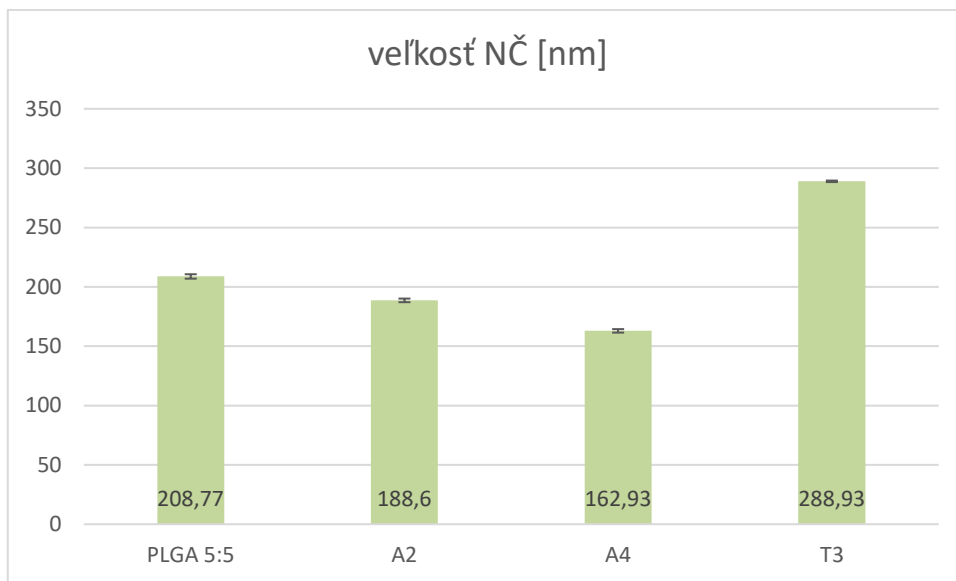
3.2.1 Nanoprecipitácia

Tabuľka VII. Porovnanie výsledkov NČ pripravených nanoprecipitačnou metódou použitím polymérov PLGA 5/5, A2, A4 a T3

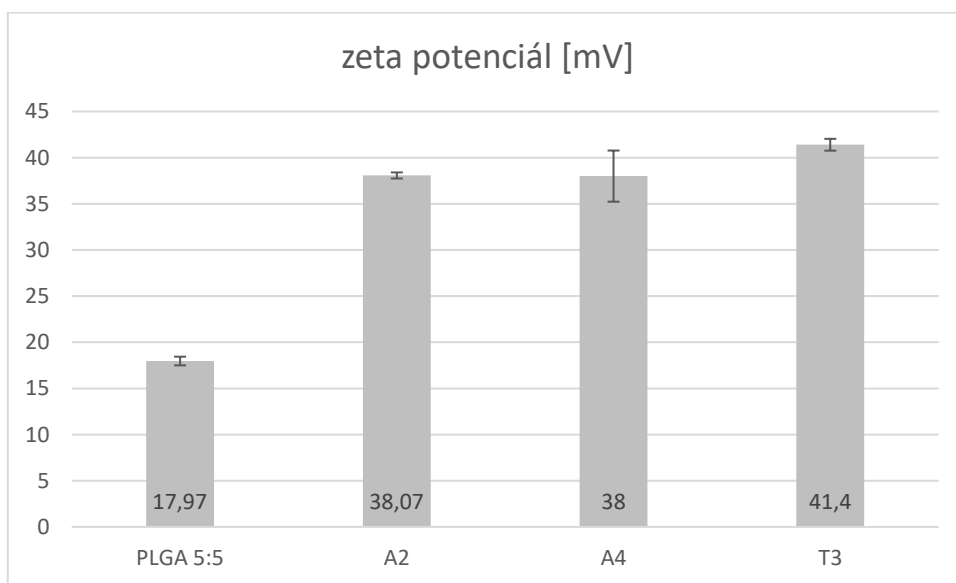
Typ polyméru	Stabilizátor	Kostabilizátor	konc. [µg/ml]	EE [%]	veľkosť častíc [nm]	zeta potenciál [mV]	pdi
PLGA 5/5	Pluronic 0,1%	-	3	45,4	208,77	-17,97	0,075
A2	Pluronic 0,1%	-	2	30,4	188,6	-38,07	0,072
A4	Pluronic 0,1%	-	4,6	68,4	162,93	-38	0,047
T3	Pluronic 0,1%	-	4,4	65,8	288,93	-41,4	0,228



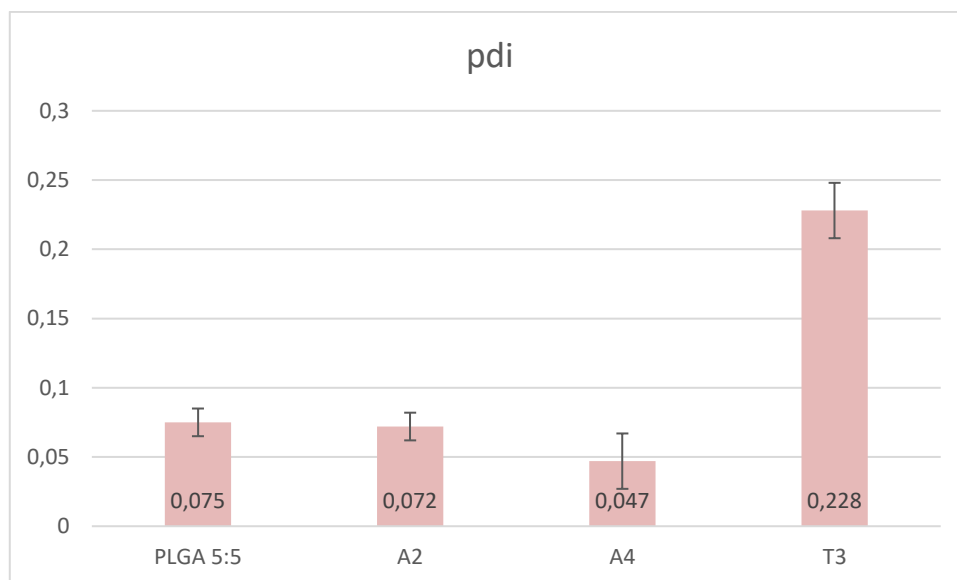
Graf VIII. Porovnanie EE FITC-dextranu v NČ vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3



Graf IX. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3



Graf X. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3



Graf XI. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérami PLGA 5/5 a A2

NP sa využila napriek odlišnej príprave NČ k ich porovnaniu s NČ vytvorenými pomocou DE. NČ pripravené touto metódou použitím polymérov PLGA 5/5, A2, A4 a T3 mali veľkosť v rozpätí od 160-300 nm, pričom najväčšie častice vznikli použitím polyméru T3, takmer 290 nm. Vychádzajúc z vysokej polydisperzity u NČ vytvorených týmto polymérom, dochádzalo pravdepodobne ku zhlukovaniu častíc vo vzorke. Naopak, najmenšie tvoril polymér A4 s časticami veľkými na úrovni 160 nm. Utvrdili sa tak predpoklady, podľa ktorých NP vznikajú malé častice, teda v rozpätí od 100 do 300 nm. Polyméry A2 a A4 tvorili častice s podobnou veľkosťou (189 nm, 163 nm), čo je neprekvapujúci výsledok vzhľadom na ich štrukturálnu podobnosť. PLGA 5/5 s hodnotou 208 nm nijak nevybočuje z veľkostného rozmedzia pripravených NČ.

Čo sa ale týka množstva enkapsulovaného FITC-dextranu, najúspešnejším polymérom bol A4, pretože EE má hodnotu 68,4 %, snáď na jednej úrovni s polymérom T3 s hodnotou 65,8 %. Menej ako polovičnú efektivitu ukázal polymér A2, a rovnako aj u PLGA 5/5 častíc bola nižšia EE. Výsledky ukazujú na vyššiu efektivitu využitím polyméru A4 oproti často využívanému polyméru PLGA 5/5. Čo je pravdepodobne dané ich zvýšenou hydrofilitou danou väčším počtom voľných koncových skupín.

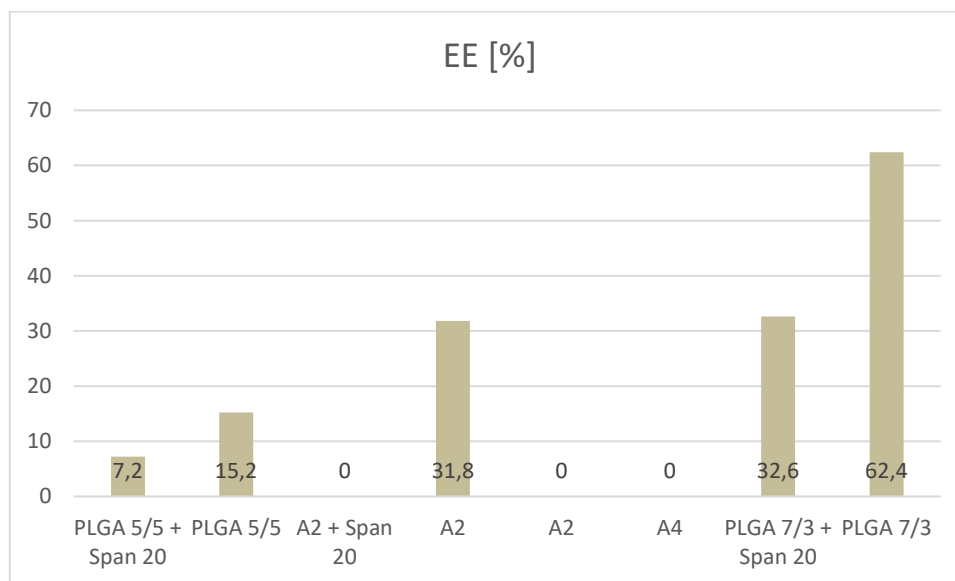
Z porovnania hodnôt zeta potenciálu vyplýva, že u polymérov A2, A4 a T3 sa hodnoty tohto parametru pohybujú od - 38 až - 42 mV, kým u PLGA 5/5 to bolo len približne - 18 mV.

Najnižšia polydisperezita sa dosiahla u NČ vytvorených polymérom A4, naopak najvyššia u T3.

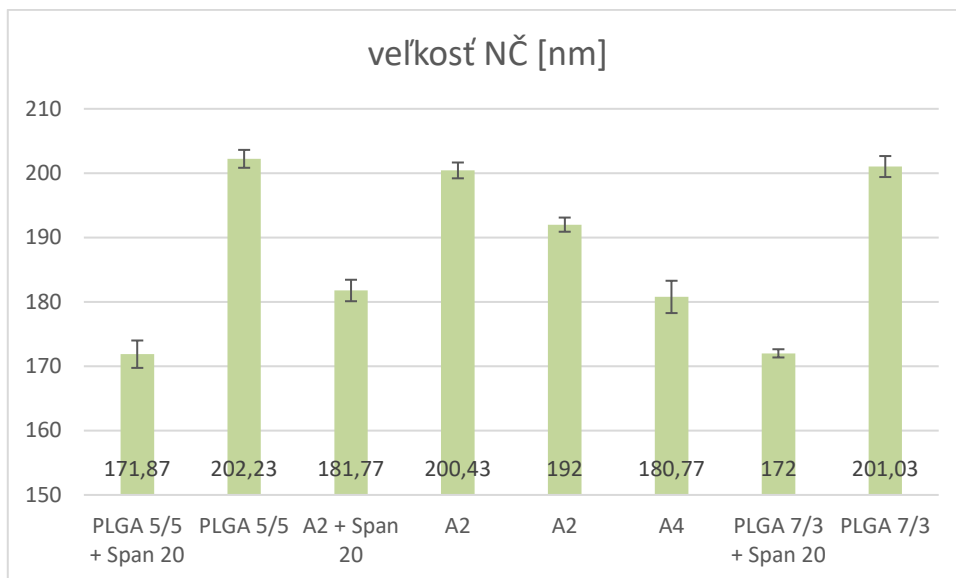
3.2.2 Duálna emulgácia

Tabuľka VIII. Porovnanie výsledkov NČ vytvorených duálnou emulgáciou použitím polymérov PLGA 5/5, PLGA 7/3, A2 a A4

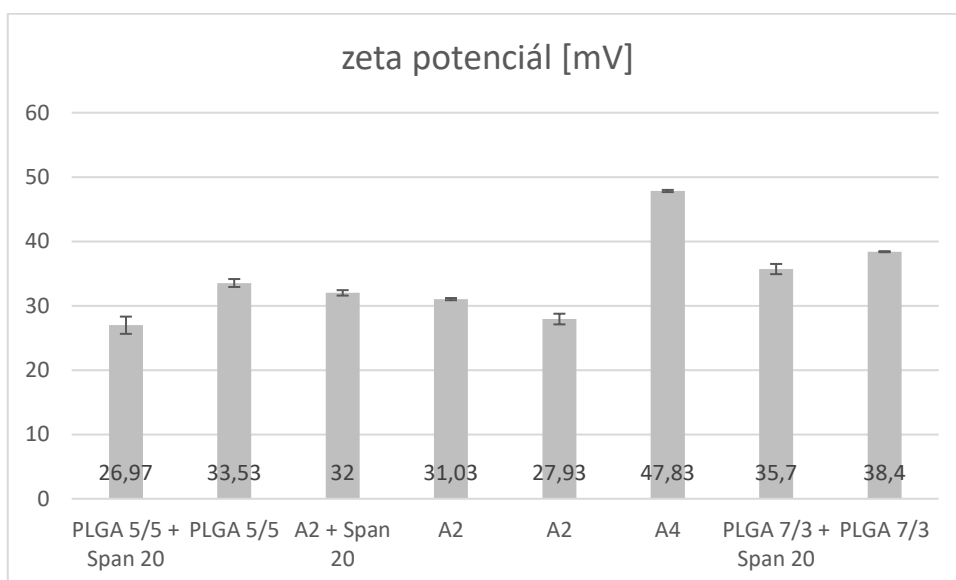
Typ polyméru	Stabilizátor	Kostabilizátor	konc. [µg/ml]	EE [%]	veľkosť častíc [nm]	zeta potenciál [mV]	pdi
PLGA 5/5	Pluronic 0,1%	Span 20	0,6	7,2	171,87	-26,97	0,224
PLGA 5/5	Pluronic 0,1%	-	1,3	15,2	202,23	-33,53	0,202
A2	Pluronic 0,1%	Span 20	0	0	181,77	-32	0,246
A2	Pluronic 0,1%	-	2,1	31,8	200,43	-31,03	0,222
A4	Pluronic 0,1%	-	0	0	180,77	-47,83	0,144
PLGA 7/3	Pluronic 0,1%	Span 20	2,2	32,6	172	-35,7	0,214
PLGA 7/3	Pluronic 0,1%	-	4,2	62,4	201,03	-38,4	0,218



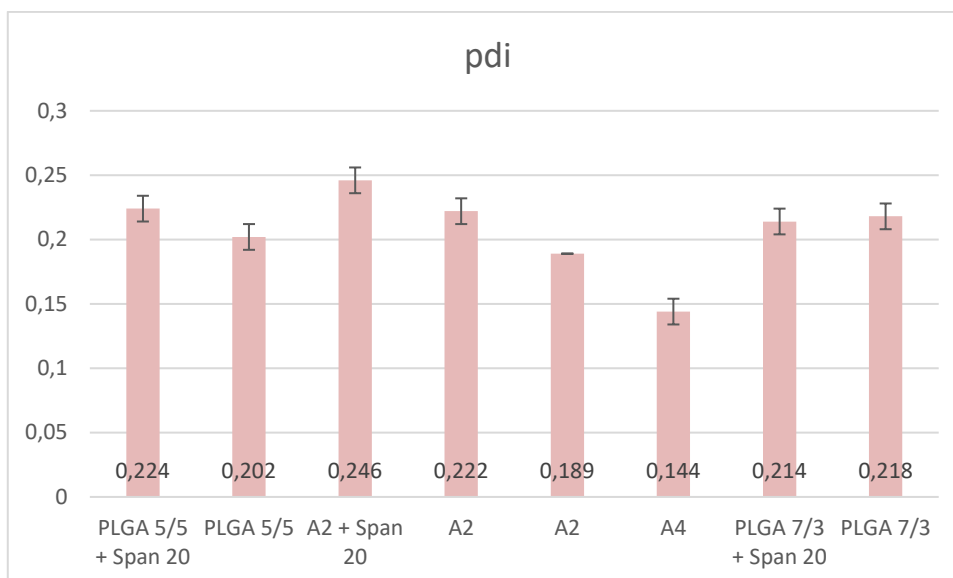
Graf XII. Porovnanie EE FITC-dextranu v NČ vytvorených polymérmi PLGA 5/5, PLGA 7/3, A2 a A4



Graf XIII. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, PLGA 7/3, A2 a A4



Graf XIV. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3



Graf XV. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 7/3, PLGA 5/5, A2 a A4

Tento experiment obsahuje porovnanie výsledkov troch polymérov. Ďalším faktorom, ktorý sa sledoval, bola prítomnosť kostabilizátoru Span 20. Enkapsuloval sa FITC-dextran.

Všeobecne bola veľkosť u všetkých troch polymérov skoro úplne totožná, či už s kostabilizátorom alebo bez neho. Najefektívnejším polymérom je podľa výsledkov PLGA 7/3, ktorý mal EE 62,4 %, pričom A2 mal polovičné hodnoty a PLGA 5/5 až o dve tretiny menšie. Obecne platí, že vhodnejšími polymérmi pre prípravu nanočastíc DE sú polyméry lineárne. Kľúčová je zrejme rola hydrofobicity materiálu, pretože hydrofóbnejší z oboch použitých materiálov (PLGA 7/3) bol schopný enkapsulovať vyššie množstvo modelovej látky než PLGA 5/5.

Prítomnosť kostabilizátoru jasne ukázal vplyv či už na veľkosť vytvorených NČ, ako aj na EE. Častice vytvorené bez použitia Span 20 boli podľa výsledkov zhruba o 20-30 nm väčšie, čo nie je možné považovať za výrazný rozdiel, ale je jasne badateľný a opakujúci sa u všetkých troch polymérov. Vplyv sa ukázal rovnakou mierou na všetkých troch typoch NČ. Čo sa týka množstva enkapsulovaného FITC-dextranu, je možné vidieť pri použití kostabilizátoru u polymérov až o polovicu nižšiu efektívnosť. U polyméru A2 to bola dokonca nulová úspešnosť. Celkovo je možné jednoznačne stanoviť, že kostabilizátory síce umožnia pripraviť o niečo menšie NČ, ale na druhej strane znížia aj množstvo enkapsulovaného FITC-dextranu.

V porovnaní s NP sa v DE ukázali rozličné polyméry rozdielne efektívne. Kým u NP bol najefektívnejším A4 a T3, v DE to bolo PLGA 7/3. Sledoval sa tiež zeta potenciál, ktorý dosahoval podobné hodnoty skoro u všetkých polymérov, a to od - 30 po - 40 mV. U častíc vytvorených polymérom PLGA 5/5 za použitia kostabilizátoru dosiahol potenciál len hodnotu - 27 mV. Hodnoty v rozpätí od - 31 do - 34 mV sa objavili u polymérov PLGA 5/5 bez Spanu 20, A2 so Spanom 20 a A2 bez kostabilizátoru. U PLGA 7/3, či už bez alebo za použitia Spanu 20, zeta potenciál dosiahol hodnoty od - 36 do - 38 mV.

Polyméry A2 a A4 majú kvôli podobnej štruktúrálnej stránke podobné výsledky. Veľkosť častíc je medzi polymérmi veľmi podobný a jednoznačne by sa mohli zaradiť do jednej veľkostnej kategórie. V prípade týchto dvoch polymérov, bola EE veľmi nízka. Prístroj bol síce schopný vyhodnotiť veľkosť častíc minimálne sa vyskytujúcich v roztoku, to ale nevyvracia skutočnosť, že v prípade týchto dvoch polymérov pravdepodobne enkapsulácia neprebehla, alebo teda len v zanedbateľnom množstve. Ďalšou možnosťou je, že k strate NČ došlo pri centrifugácii, ktorá sa prevádzala v troch cykloch, ale je možné, že prístroj nemusel byť schopný oddeliť príliš malé NČ od supernatantu.

Ak by sa ale porovnávali výsledky tohto pokusu s predchádzajúcimi, kde sa využívala NP, výsledky jasne poukazujú na vhodnosť použitia polyméru A4 k príprave NČ práve prostredníctvom tejto metódy oproti DE.

Ďalšou sledovanou vlastnosťou NČ bol zeta potenciál, ktorý dosiahol u A2 hodnotu - 28 mV a u A4 - 48 mV.

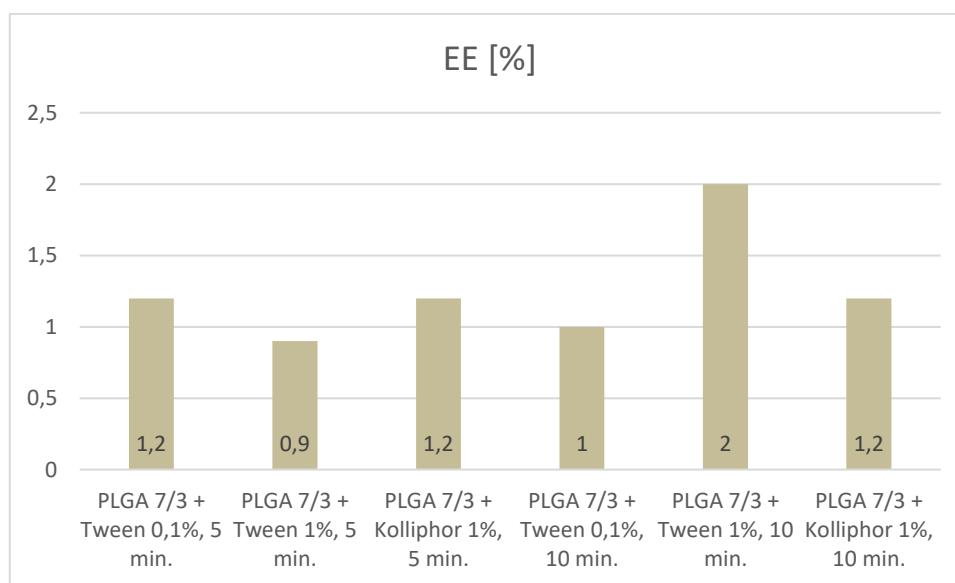
Najnižšie hodnoty polydisperzity (0,144) sa dosiahli u NČ s polymérom A4, kým u zvyšných polymérov boli relatívne jednotné, s hodnotami okolo 0,220.

3.3 Vyhodnotenie výsledkov NČ s FITC-albumínom

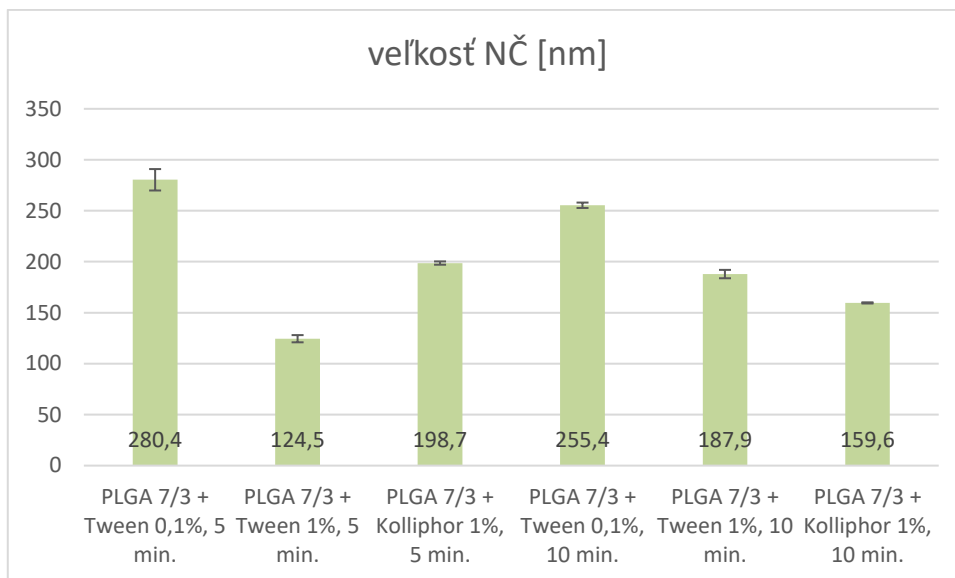
3.3.1 Duálna emulgácia

Tabuľka IX. Porovnanie výsledkov NČ pripravených duálnou emulgáciou použitím polyméru PLGA 7/3 a rôznych stabilizátorov, po 5 a 10 minútach centrifugácie

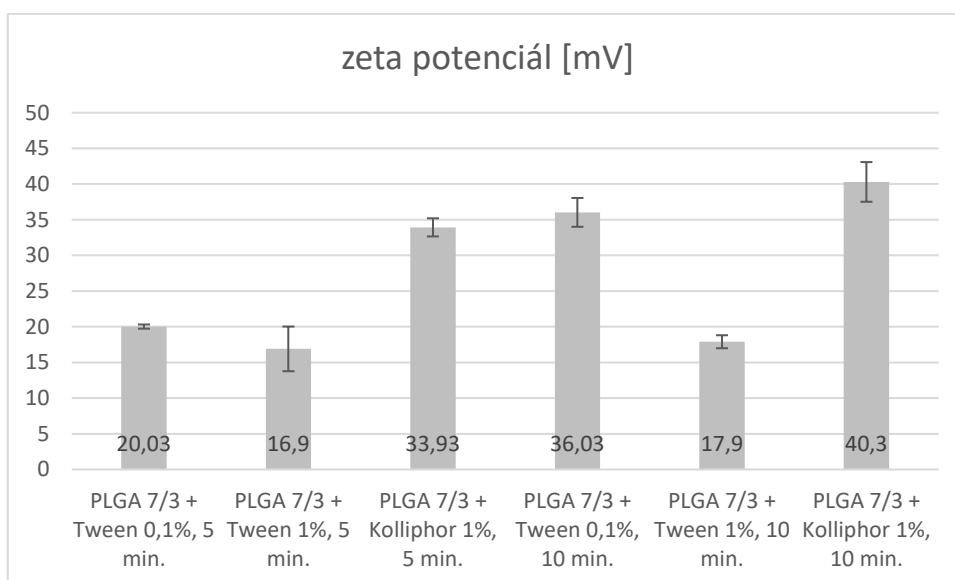
Typ polyméru	Stabilizátor	Kostabilizátor	konc. [μg/ml]	EE [%]	veľkosť častíc [nm]	zeta potenciál [mV]	pdi
<i>5 min. centrifugácie</i>							
PLGA 7/3	Tween 0,1%	Span 20	0,007	1,2	280,4	-20,03	0,497
PLGA 7/3	Tween 1%	Span 20	0,006	0,9	124,5	-16,9	0,585
PLGA 7/3	Kolliphor 1%	Span 20	0,007	1,2	198,7	-33,93	0,131
<i>10 min. centrifugácie</i>							
PLGA 7/3	Tween 0,1%	Span20	0	1,0	255,4	-36,03	0,573
PLGA 7/3	Tween 1%	Span20	0,013	2,0	187,9	-17,9	0,357
PLGA 7/3	Kolliphor 1%	Span20	0,007	1,2	159,6	-40,3	0,074



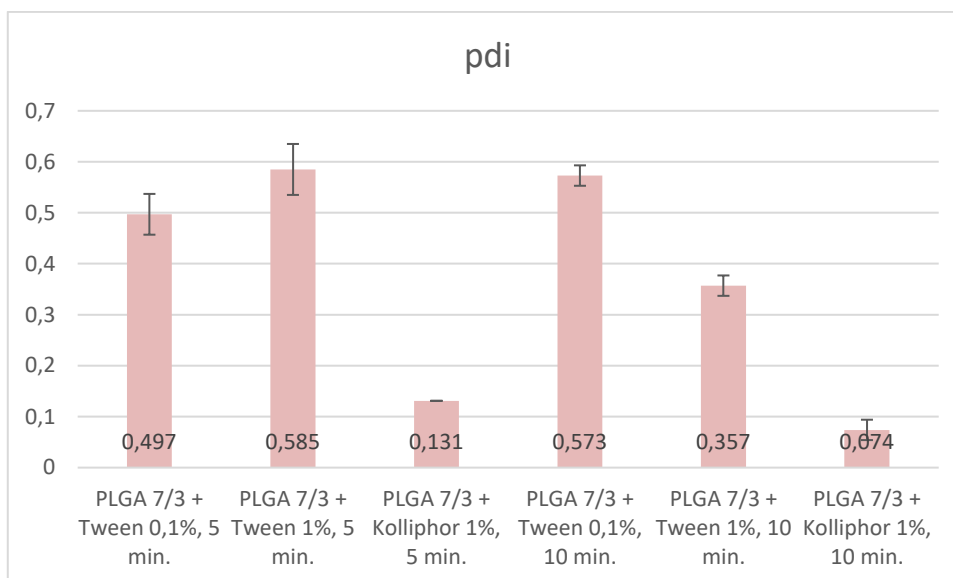
Graf XVI. Porovnanie EE FITC-albumínu v NČ vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie



Graf XVII. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie



Graf XVIII. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie



Graf XIX. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie

K možnosti najlepšieho porovnania vplyvu rozličných stabilizátorov sa zvolilo prevedenie prípravy NČ jedným typom polyméru. Vďaka tomu sa dosiahlo rozlíšenie vlastností stabilizátorov.

Porovnanie výsledkov po 5 minútovej centrifugácii

EE dosahovala nízke hodnoty (0,9 a 1,2 %), pričom enkapsulácia bola úspešnejšia (s hodnotami 1,2 %) u stabilizátorov Tween 0,1% a Kolliphor 1% ako za použitia 1% Tweenu.

Čo sa týka veľkosti NČ je možné vidieť výrazné rozdiely v jednotlivých hodnotách. S hodnotou 280 nm boli najväčšie častice vytvorené pomocou stabilizátoru Tween 0,1%, následne častice s 1% Kolliphorom s veľkosťou približne 200 nm a nakoniec častice s 1% Tweenom, ktorých veľkosť bola okolo 125 nm.

Najmenší potenciál mali častice vytvorené s 1% Tweenom a to s hodnotou - 17 mV, naopak najväčší z tejto trojice častice s 1% Kolliphorom - 40,3 mV. Najvhodnejšia polydisperzita NČ bola dosiahnutá použitím stabilizátoru Kolliphor 1% (0,074).

Keďže sa v počiatočných prípravách narážalo na nežiaducu tvorbu neroztrepatelného sedimentu, skúšalo sa skrátenie doby centrifugácie pre vyriešenie problému, alebo aspoň pre jeho obmedzenie. Zistilo sa ale, že skrátením doby v centrifuge nedošlo k dostatočnému oddeleniu NČ od supernatantu a tak dochádzalo

k veľkým stratám. Z tohto dôvodu sa následne znovu predĺžila doba, ale nie na 15 minút ako v počiatočných experimentoch, ale na 10 minút. Dĺžka doby centrifugácie zapríčinila zmeny výsledkov vo veľkosti častíc a rovnako aj v celkovom množstve enkapsulovaného albumínu z hľadiska množstva získaných NČ. Napriek týmto opatreniam stále dochádzalo centrifugáciou a premývaním NČ k určitým stratám a určitej precipitácii. Prílišným centrifugovaním vzniká precipitát a naopak nedostatočným zostanú NČ v supernatante. Sú to dva negatívne javy dvoch protiľahlých extrémov, ktorým sa snažilo vyhnúť prispôbením dĺžky času. Zmenou času sa menila aj škála získaných NČ.

Porovnanie výsledkov po 10 minútovej centrifugácii

EE dosahovala hodnoty od 1 do 2 %. Najmenej úspešný bol 0,1% Tween, najvyššiu EE mal 1% Tween.

V prípade veľkosti, častice pripravené pomocou stabilizátoru Tween 0,1% boli najväčšie a to s hodnotou približne 250 nm. Následne nasledovali častice s Tween 1% s veľkosťou asi 190 nm. Najmenšie NČ (160 nm) sa pripravili využitím stabilizátoru Kolliphor 1%.

Súhrnné porovnanie výsledkov

EE po dlhšej dobe centrifugácie bola u 0,1% Tweenu a 1% Kolliphoru podobná (1 % a 1,2 %) rovnako ako za 5 minútovej centrifugácie. Naopak, EE u stabilizátoru Tween 1% bola v porovnaní s kratšou dobou centrifugácie takmer dvojnásobná (2 %).

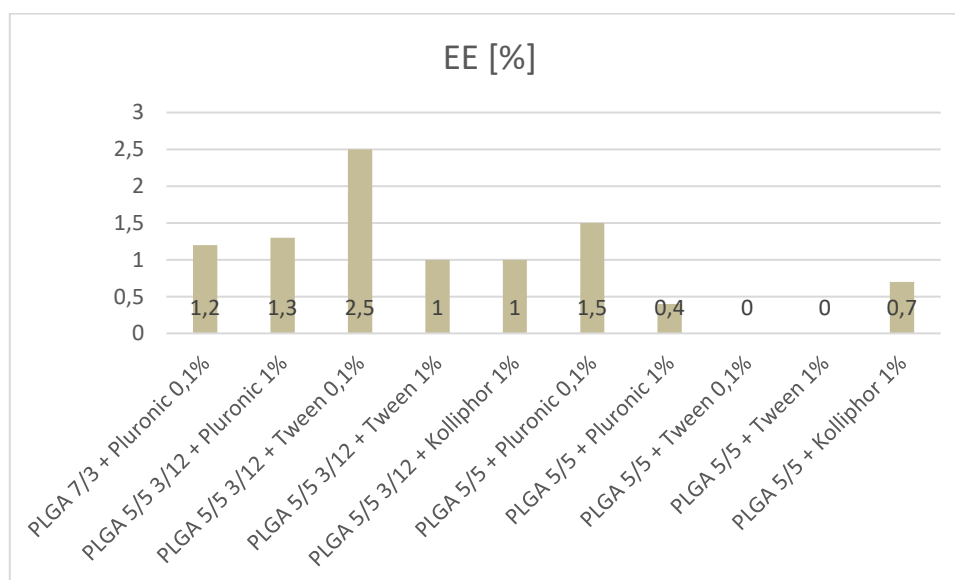
Čo sa týka veľkosti NČ, v porovnaní s polovičnou dobou centrifugácie si prvenstvo zachovali NČ s 0,1% Tweenom s rozdielom 30 nm. U ostatných dvoch stabilizátorov došlo ku zmenám. Častice s 1% Kolliphorom boli veľké asi 200 nm, kým v tomto pokuse len 160 nm a častice s 1% Tweenom boli veľkosti okolo 125 nm, teda menšie ako NČ získané po 10 minútovej centrifugácii (190 nm).

Na zeta potenciál dĺžka doby centrifugácie vplyv nemala a hodnoty tejto vlastnosti častíc sa ukázali ako zhodné s časticami z predošlého experimentu s 5 minútovým odstredovaním, čo predstavuje pre 1% Kolliphor -34 mV, 0,1% Tween - 20 mV a ako posledný 1% Tween – 17 mV.

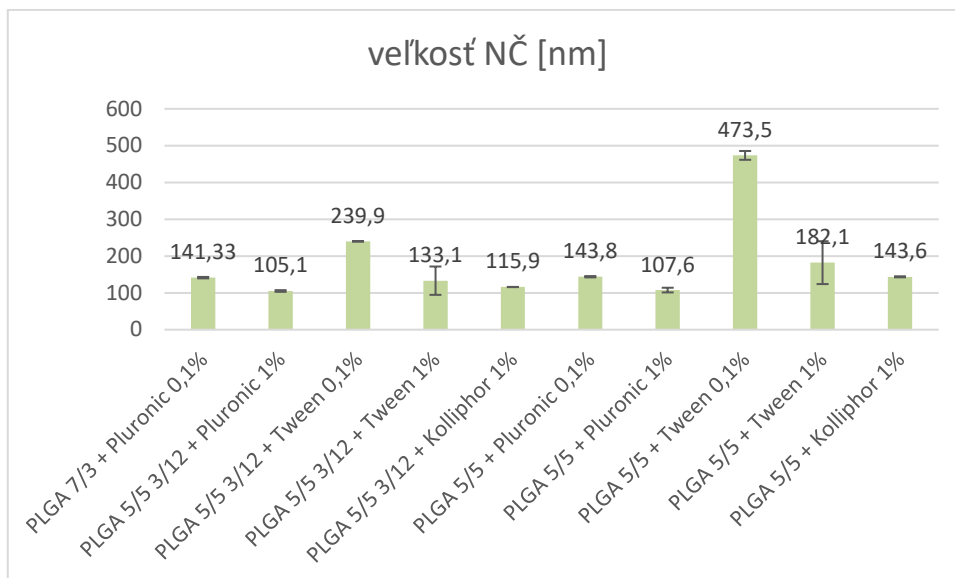
Najnižšia polydisperzita sa objavovala u PLGA 7/3 s hodnotou 0,074 po 10 minútovej centrifugácii, a po 5 minútovej 0,131. U ostatných polymérov p*di* predstavovalo hodnoty od 0,4 do 0,6.

Tabuľka X. Porovnanie výsledkov NČ pripravených duálnou emulgáciou použitím polymérov dvoch typov PLGA 5/5, PLGA 7/3 a rôznych stabilizátorov, po 10 minútach centrifugácie

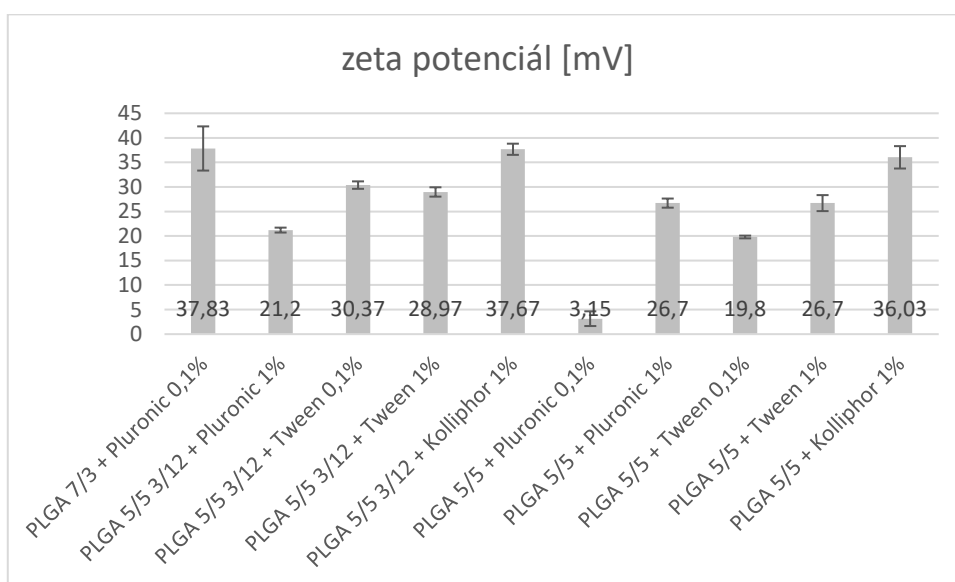
Typ polyméru	Stabilizátor	Kostabilizátor	konc. [µg/ml]	EE [%]	veľkosť častíc [nm]	zeta potenciál [mV]	pdi
PLGA 7/3	Pluronic 0,1%	Span 20	0,007	1,2	141,33	-37,83	0,238
PLGA 5/5 3/12	Pluronic 1%	Span 20	0,009	1,3	105,1	-21,2	0,457
PLGA 5/5 3/12	Tween 0,1%	Span 20	0,018	2,5	239,9	-30,37	0,415
PLGA 5/5 3/12	Tween 1%	Span 20	0,007	1,0	133,1	-28,97	0,628
PLGA 5/5 3/12	Kolliphor 1%	Span 20	0,007	1,0	115,9	-37,67	0,249
PLGA 5/5	Pluronic 0,1%	Span 20	0,011	1,5	143,8	-3,15	0,232
PLGA 5/5	Pluronic 1%	Span 20	0,003	0,4	107,6	-26,7	0,549
PLGA 5/5	Tween 0,1%	Span 20	0	0	473,5	-19,8	0,407
PLGA 5/5	Tween 1%	Span 20	0	0	182,1	-26,7	0,418
PLGA 5/5	Kolliphor 1%	Span 20	0,005	0,7	143,6	-36,03	0,165



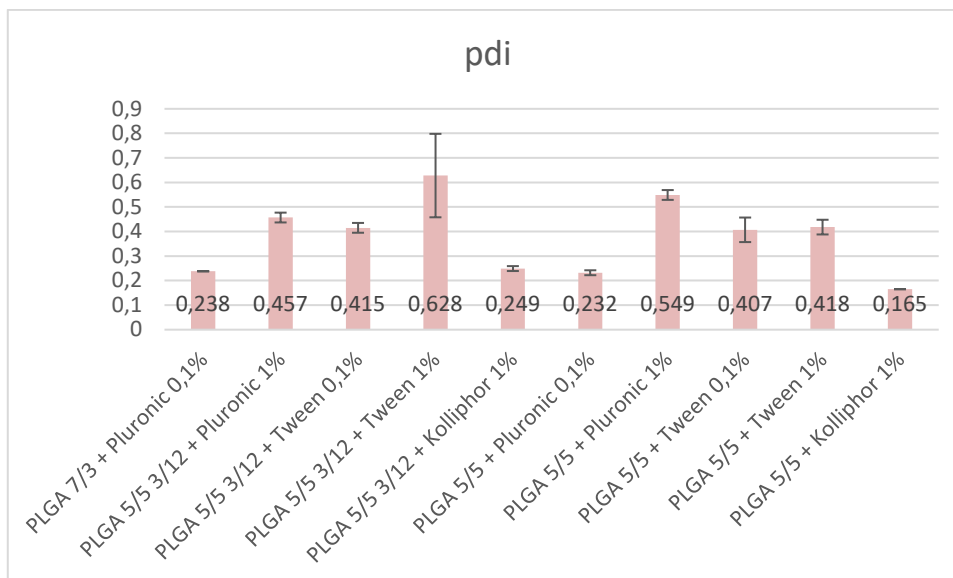
Graf XX. Porovnanie EE FITC-albumínu v NČ vytvorených polymérmi PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii



Graf XXI. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom vytvorených polymérmi PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii



Graf XXII. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérmi PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii



Graf XXIII. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérami PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii

S ohľadom na výsledky predchádzajúcich experimentov, ktoré ukázali na vhodnosť lineárnych polymérov pre DE, boli pre túto sériu experimentov vybrané tieto 3 polyméry (PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12, PLGA 5/5). V tomto experimente sa zisťovali rozdiely medzi tromi PLGA, ktoré pozostávajú z rozdielnych pomerov kyseliny mliečnej a glykolovej a líšia sa molárnou hmotnosťou.

Žiaľ, úspešnosť enkapsulácie FITC-albumínu bola relatívne nízka. Najvyššia EE (2,5 %) sa dosiahla použitím 0,1% Tweenu u PLGA 5/5 3/12, kým u rovnakého polyméru za použitia 1% Tweenu mala EE len 1 %. Najnižšia enkapsulácia sa dosiahla u polyméru PLGA 5/5 so stabilizátormi Tween 0,1% a 1%. V oboch prípadoch bola enkapsulácia neúspešná (0 %), teda kombinácia prípravy NČ polymérom PLGA 5/5 a Tweenu, či už s koncentráciou 1 % alebo 0,1 %, sa ukázala ako nevhodná. Druhým najúspešnejším sa ukázalo použitie 0,1% Pluronicu s polymérom PLGA 5/5. Ale podobné hodnoty sa dosiahli aj za použitia PLGA 5/5 3/12 a 1% Pluronicu (1,3 %), a u PLGA 7/3 s 0,1% Pluronicom (1,2 %). V prípade použitia 1% Pluronicu EE klesla až na 0,4 %. V porovnaní polymérov PLGA 5/5 a PLGA 5/5 3/12, bolo všeobecne úspešnejšie PLGA 5/5 3/12.

Hodnotiac veľkosť vytvorených NČ sa dá usúdiť, že NČ tvorené polymérom PLGA 5/5 a PLGA 7/3 sú na tom rovnako.

Najlepším stabilizátorom sa pre polymér PLGA 5/5 zdá 0,1% Pluronic, následne Kolliphor 1%, pretože sa do NČ neenkapsuloval žiaden FITC-albumín. Kým Tween 0,1% bol pre PLGA 5/5 3/12 najfunkčnejším stabilizátorom, naopak pre druhé PLGA 5/5, bol najhoršou alternatívou.

Pri pohľade na predchádzajúci experiment je vidieť, že rovnako bol najúčinnnejším Tween, no s vyššou koncentráciou. Používal sa ale polymér PLGA 7/3. Ďalšou sledovanou vlastnosťou bola veľkosť častíc, pričom v tejto kategórii sa NČ pohybovali u oboch polymérov v škále 100-190 nm. Výnimkou sú častice s PLGA 5/5 a 0,1% Tweenom, ktoré dosahujú až skoro 475 nm, a častice s PLGA 5/5 3/12 rovnako s 0,1% Tweenom, ktorých veľkosť odpovedá 240 nm. Spoločným znakom pre väčšiu veľkosť sa teda ukázalo použitie stabilizátoru Tween 0,1%. Najmenšie častice, s veľkosťou 105 nm, sa podarilo vytvoriť polymérom PLGA 5/5 3/12 a 1% Pluronicom.

U NČ vytvorených polymérom PLGA 7/3 a 0,1% Tweenom bola hodnota veľkosti okolo 255 nm, čo je hodnota blízka k 240 nm u častíc s PLGA 5/5 3/12 a 0,1% Tweenom. Vznikli teda relatívne rovnako veľké NČ pri rôznych polyméroch, ale tom istom stabilizátore.

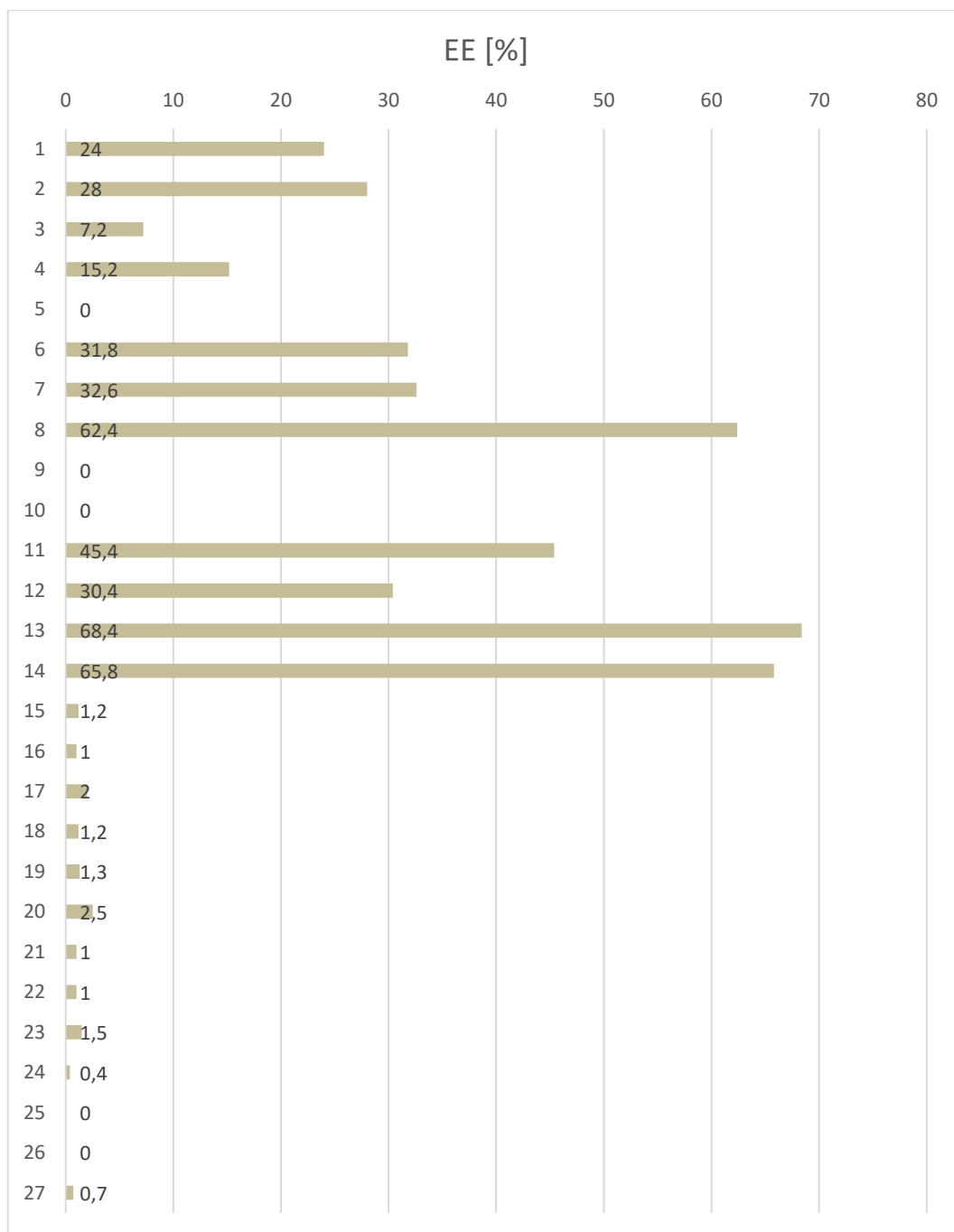
Podobne ako v predchádzajúcich experimentoch, aj v tomto sa najväčšie potenciály ukázali za použitia stabilizátoru Kolliphor 1%, a to u oboch polymérov PLGA 5/5, aj PLGA 5/5 3/12, s hodnotami – 36 mV a – 38 mV. U PLGA 7/3 so stabilizátorom Pluronic 0,1% mal zeta potenciál rovnako – 38 mV. O niečo menšie potenciály, - 27 mV až – 30 mV, mali častice s 1% a 0,1% Tweenom pri polyméri PLGA 5/5 3/12 a u polyméru PLGA 5/5 s 1% Tweenom a 1% Pluronicom. Hodnoty potenciálu okolo – 20 mV dosiahli NČ tvorené pomocou PLGA 5/5 3/12 s 1% Pluronicom a PLGA 5/5 s 0,1% Tweenom.

Hodnoty polydisperzity sa pohybujú v rozpätí od 0,16-0,63. Z tohto hľadiska sa najvýhodnejším stabilizátorom ukázal Kolliphor 1%. Najvyššiu polydisperzitu dosiahli NČ s PLGA 5/5 3/12 a 1% Tweenom.

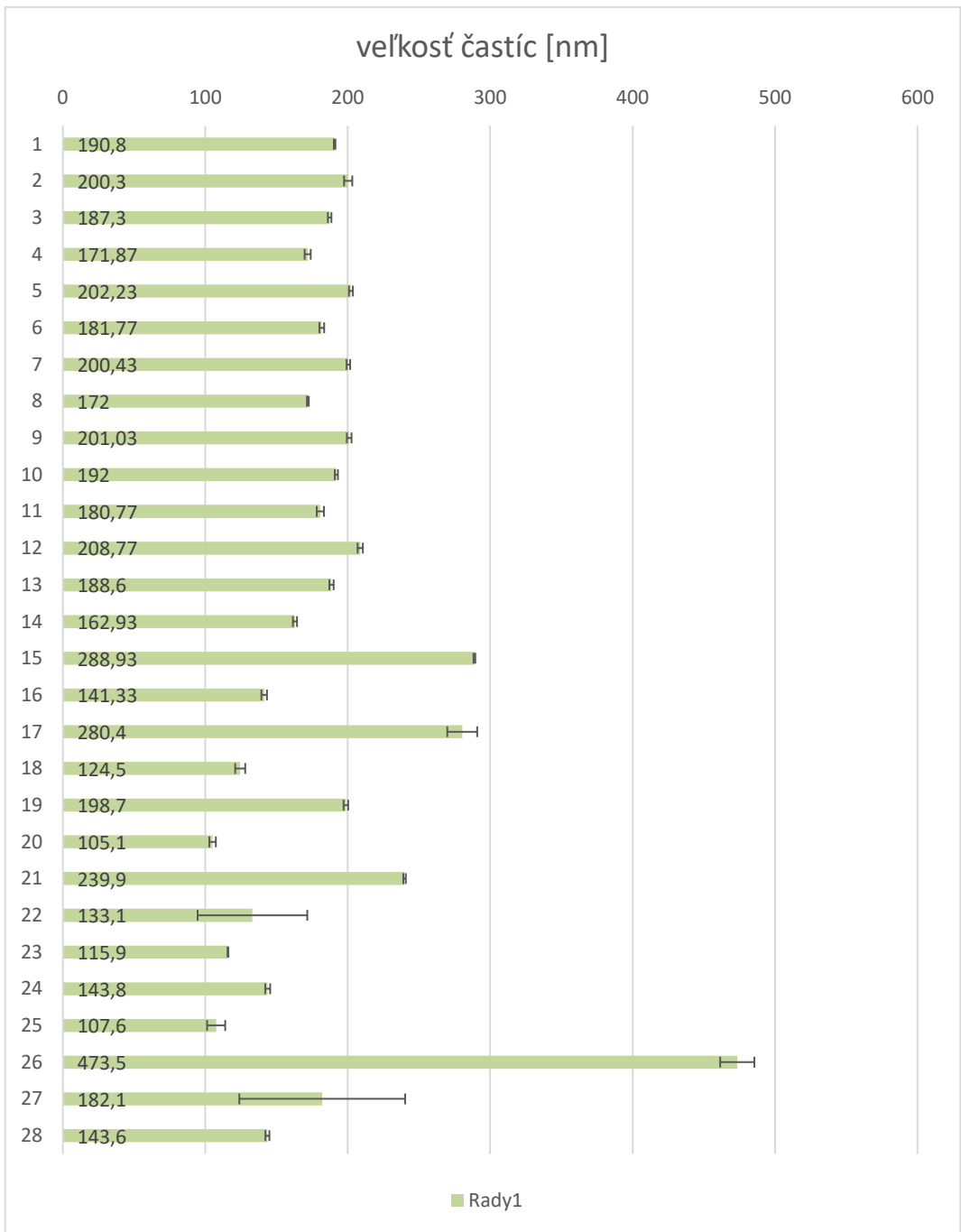
3.4 Celkový prehľad výsledkov

Tabuľka XI. Súhrn hodnôt EE, veľkosti častíc, zeta potenciálu a pdi získaných v experimente

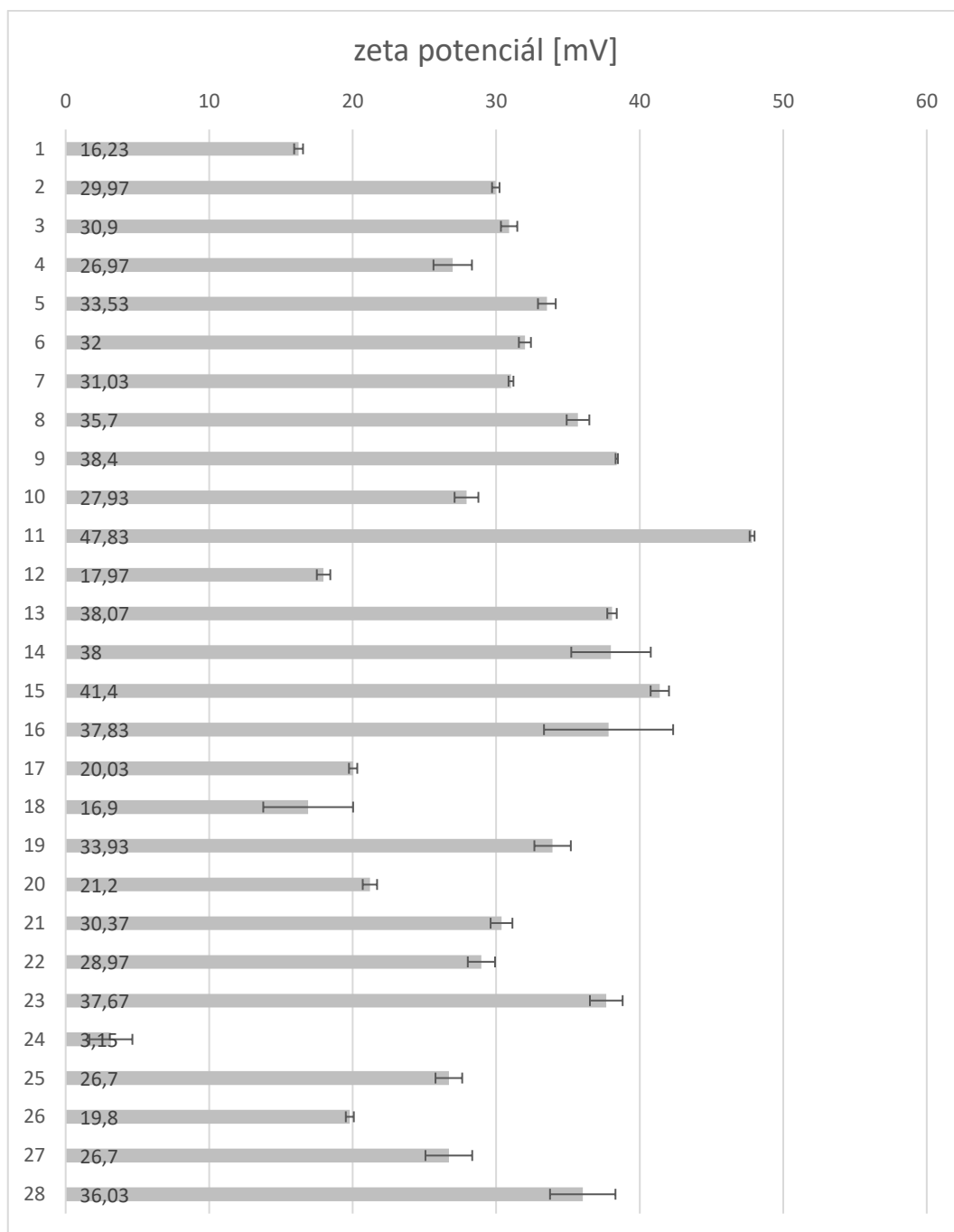
vzorka	EE [%]	veľkosť častíc [nm]	zeta potenciál [mV]	pdi
1	-	190,8	-16,23	0,251
2	24	200,3	-29,97	0,197
3	28	187,3	-30,9	0,152
4	7,2	171,87	-26,97	0,224
5	15,2	202,23	-33,53	0,202
6	0	181,77	-32	0,246
7	31,8	200,43	-31,03	0,222
8	32,6	172	-35,7	0,214
9	62,4	201,03	-38,4	0,218
10	0	192	-27,93	0,189
11	0	180,77	-47,83	0,144
12	45,4	208,77	-17,97	0,075
13	30,4	188,6	-38,07	0,072
14	68,4	162,93	-38	0,047
15	65,8	288,93	-41,4	0,228
16	1,2	141,33	-37,83	0,238
17	1	280,4	-20,03	0,497
18	2	124,5	-16,9	0,585
19	1,2	198,7	-33,93	0,131
20	1,3	105,1	-21,2	0,457
21	2,5	239,9	-30,37	0,415
22	1,0	133,1	-28,97	0,628
23	1,0	115,9	-37,67	0,249
24	1,5	143,8	-3,15	0,232
25	0,4	107,6	-26,7	0,549
26	0	473,5	-19,8	0,407
27	0	182,1	-26,7	0,418
28	0,7	143,6	-36,03	0,165



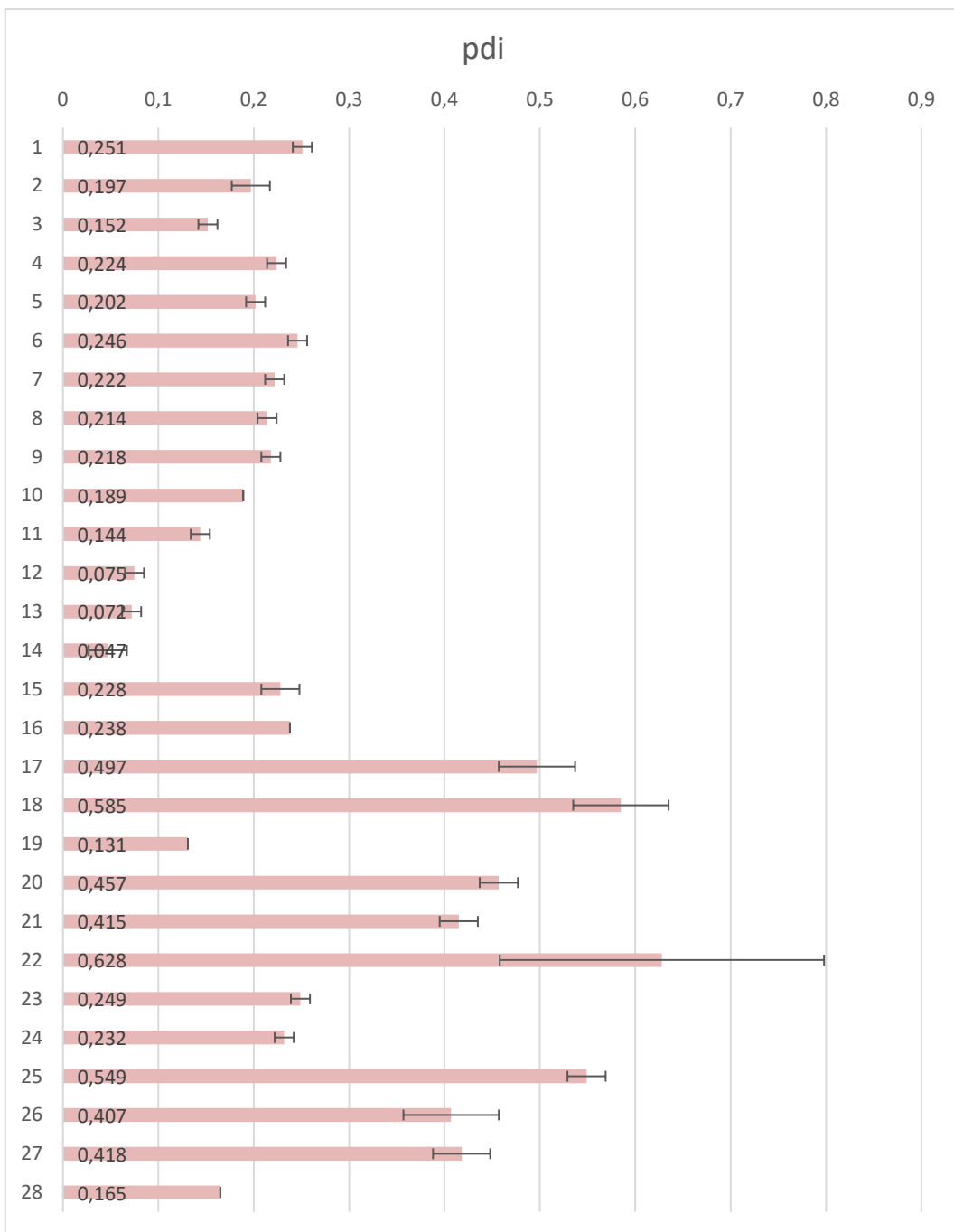
Graf XXIV. Celkový přehled EE



Graf XXV. Celkový prehľad veľkostí NČ



Graf XXVI. Celkový prehľad zeta potenciálu NČ



Graf XXVII. Celkový prehľad pdi NČ

4 Zhrnutie

Výsledky práce poukazujú na obrovský potenciál NČ ako liekovej formy pre hydrofilné látky, a to hlavne použitím polyméru PLGA.

Liečivo reprezentovali tri rôzne látky: Rodamín B, FITC-dextran a FITC-albumín. Základným cieľom bolo vytvorenie NČ s albumínom, teda reálnym proteínom, ktorý predstavoval najvhodnejší model liečiva. Lenže najskôr bolo nevyhnutné čo najpresnejšie nastavenie metódy a overenie analytických postupov, aj na tieto účely sa použil Rodamín B a FITC-dextran.

V prvej fáze sa teda používal Rodamín B a polyméry PLGA a A2. Zistila sa potreba použitia ľadového kúpeľa pre zvýšenie stability častíc. Toto riešenie bolo nevyhnutné z dôvodu zohrievania sa fáz pri samotnom procese DE prevádzaním sonifikácie. Pôsobenie ultrazvuku na vzorku spôsobovalo jej prehrievanie, čo je negatívnym javom pre stabilitu NČ. Ľadový kúpeľ sa následne využíval počas celého priebehu vykonávania experimentálnej časti práce, čiže pri jednotlivých pokusoch sa chladili fázy pred samotnou emulgáciou, aj priamo počas jej prevádzania.

NČ vytvorené pomocou PLGA 5/5 a A2 boli nezávisle od typu metódy prípravy veľkostne v jednej kategórii, teda 180 až 210 nm, pričom A2 NČ boli stále približne o 20 nm menšej veľkosti. V DE bol obsah enkapsulovaného Rodamínu B v A2 NČ a v PLGA 5/5 NČ veľmi podobný, EE predstavovala hodnoty 24 a 28 %. Z výsledkov RY vzorku NČ vytvorených pomocou polyméru A2 a PLGA 5/5 a enkapsulovaného Rodamínu B vyplýva, že na tvorbe častíc sa zúčastnilo 57,6 % (A2) a 39,2 % (PLGA 5/5) pôvodného materiálu, pričom pôvodné množstvo použitého polymérov bolo 25,0 mg a rodamínu 5 μ g.

Celá práca sa zakladá na využití metódy DE, ktorej úspešnosť sa porovnávala s NP prostredníctvom FITC-dextranu. NP sa pripravovali častice použitím štyroch rozličných polymérov, a to PLGA 5/5, A2, A4 a T3. Najviac FITC-dextranu sa podarilo uzatvoriť do častíc pomocou polymérov A4 a T3. EE mala hodnoty 68,4 % a 65,8 %. Následne sa tieto výsledky týkajúce sa polyméru A4 overovali prevedením druhej metódy, DE, kde sa naopak nepodarilo enkapsulovať takmer žiaden FITC-dextran, z čoho je možné vyvodiť, že polymér A4, ale aj A2, sú vhodné hlavne pre NP, v prípade enkapsulácie hydrofilných molekúl. NP sa v našom prípade ukázala ako veľmi efektívna metóda, pričom DE u polymérov A2 a A4 sa efektívnou

neukázala. Hodnoty množstva enkapsulovaného značeného FITC-dextranu boli nulové. Keďže sa ale narážalo na problém precipitácie alebo naopak nedostatočného oddelenia NČ od supernatantu prostredníctvom centrifugácie, existuje možnosť, že častice boli vytvorené, ale nepodarilo sa ich získať a analyzovať.

Pri enkapsulovaní FITC-dextranu DE bol najúspešnejší polymér PLGA 7/3 s hodnotou EE 62,4 %. V porovnaní s A2 to boli hodnoty EE dvojnásobné. Hydrofobicita polyméru má pravdepodobne významnú úlohu, keďže hydrofóbnejší polymér (PLGA 7/3) mal vyššiu EE než menej hydrofóbne PLGA 5/5.

Zisťoval sa tiež vplyv kostabilizátoru Span 20 na veľkosť NČ a množstvo enkapsulovaného FITC-dextranu. Výsledky poukazujú na zmeny týkajúce sa oboch vlastností NČ. Bez použitia kostabilizátoru vznikli častice približne o 20-30 nm väčšie, a to u všetkých troch skúšaných polyméroch (PLGA 5/5, A2, PLGA 7/3). Efektivita enkapsulácie sa u polymérov PLGA znížila až o polovicu. Z toho teda vyplýva, že použitím kostabilizátoru Span 20 je možné získať o pár desiatok nm menšie častice, ale znížia sa aj hodnoty množstva enkapsulovaného FITC-dextranu. Dôvodom vplyvu kostabilizátoru Span 20 na veľkosť častíc a EE je pravdepodobne jeho schopnosť redukcie povrchového napätia a jeho destabilizujúceho účinku.

Preskúšaním rozličných polymérov a rozličných enkapsulovateľných látok sa dostalo až k enkapsulácii proteínu. V záverečných experimentoch sa porovnávali polyméry ale aj ďalšie stabilizátory s cieľom dosiahnutia čo najvyššej efektivity. Hodnoty enkapsulovaného FITC-albumínu nemali sľubnú výpovednú hodnotu. Prekážkou mohli byť destabilizujúce povrchové vlastnosti samotného albumínu alebo taktiež nedostatočná efektivita centrifugácie. Vplyv albumínu sa prejavil na povrchových vlastnostiach nanočastíc, ktoré sa tým stali veľmi náchylné k agregácii. Žiaduce by tiež bolo prevedenie experimentov bez kostabilizátoru, čo nebolo možné z dôvodu nedostatku FITC-albumínu.

Následne sa skúmali rozličné stabilizátory využitím polyméru PLGA 7/3. Príprava NČ sa teda líšila jedine typom stabilizátoru (Tween 0,1%, Tween 1,0%, Kolliphor 1%). Z dôvodu nežiaducej precipitácie sa znížila doba centrifugácie na 5 minút. Veľkosť sa NČ vytvorené jednotlivými stabilizátormi výrazne líšili, pomocou 0,1% Tweenu vznikli 280 nm, následne s 1% Kolliphorom 200 nm a najmenšie častice sa pripravili 1% Tweenom, s veľkosťou 125 nm. U všetkých stabilizátorov bola EE

približne rovnaká. Keďže išlo o nízku hodnotu celkového finálneho množstva enkapsulovaného proteínu v časticiach, čo mohlo byť spôsobené jednoduchou stratou NČ z dôvodu nedostatočného scentrifugovania, a nie neúspešnosťou používanej metódy, preto v nasledujúcom experimente sa predĺžila doba centrifugácie na 10 minút oproti predchádzajúcim 5 minútam.

Z porovnania výsledkov NČ pripravených DE, využitím FITC-albumínu, PLGA 7/3 a rôznych stabilizátorov po 10 minútach a po 5 minútach centrifugácie, vyplýva, že u stabilizátoru Tween 1% sa množstvo enkapsulovaného albumínu zdvojnásobilo.. Zmena dĺžky doby centrifugácie spôsobila, že sa u 0,1% Tweenu po 5 minútach získali častice veľké 280 nm, následne po 10 minútach 255 nm, u 1% Tweenu 125 nm a potom 190 nm, a u 1% Kolliphoru to bolo najprv približne 200 nm a neskôr 160 nm. Teda u 1% Kolliphoru a 0,1% Tweenu sa zvýšenou dobou v centrifuge podarilo izolovať menšie častice.

Všeobecne porovnaním dvoch typov PLGA, a to 5/5 a 5/5 3/12, využitím rozličných stabilizátorov, bolo PLGA 5/5 3/12 úspešnejšie v množstve enkapsulovaného FITC-albumínu. Spomedzi všetkých stabilizátorov sa podarilo uzatvoriť najviac albumínu pomocou 0,1% Tweenu. Pomocou PLGA 5/5 vznikli častice len s nepatrným množstvom albumínu, pričom najúspešnejším sa zdá pre tento polymér použitie 0,1% Pluronicu, vďaka ktorému bola EE najvyššia. Najlepšou alternatívou bolo pre PLGA 5/5 3/12 použitie 0,1% Tweenu, kým pre PLGA 5/5 najhoršou.

Z hľadiska veľkosti častíc sa ukázalo použitie stabilizátoru Tween 0,1% čo sa týka polymérov PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5 ako faktor pre vytvorenie väčších NČ.

4.1 Bariéry v príprave nanočastíc s hydrofilným liečivom

Dĺžka doby centrifugácie viedla ku zmenám vo veľkosti častíc aj celkového výsledného množstva enkapsulovaného FITC-albumínu, kvôli rozdielu v získaných NČ. Zmenou dĺžky času centrifugácie sa mení veľkostný druh NČ vďaka ich odlišnej hmotnosti. To znamená, že čím dlhšie trvá centrifugácia, tým viac častíc sa oddelí od supernatantu, ale tým viac hrozí aj vznik precipitátu, preto je zásadné správne nastavenie centrifugácie. Narážalo sa na problém nežiaducej precipitácie ale aj strát

NČ nedostatočným scentrifugovaním. K zabráneniu precipitácie a dosiahnutiu akceptovateľného množstva získaných NČ je nutné vylepšiť spôsob oddeľovania vytvorených častíc od supernatantu.

Záver

V tejto práci sme sa pokúsili pripraviť NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, FITC-dextranom a FITC-albumínom. Využívala sa metóda DE a NP. Zistila sa potreba použitia ľadového kúpeľa pre zvyšovanie stability NČ počas prípravy. Podarilo sa úspešne pripraviť NČ s modelovou látkou FITC-dextran, čo poukazuje na potenciál tejto metódy. S ohľadom na podobnú veľkosť molekuly by tieto metódy mohli byť vhodné pre prípravu formulácií nukleových kyselín. V prípade enkapsulácie hydrofilných molekúl sa pri NP ukázali ako najvhodnejšie polyméry A4 a A2. Naopak tieto polyméry sa ukázali ako nevhodné v použití DE. V DE sa najvhodnejším ukázal polymér PLGA 7/3, preto sa využíval aj v príprave NČ s FITC-albumínom. Žiaľ, hlavný cieľ práce, teda úspešná enkapsulácia proteínu, nebola príliš úspešná, preto je žiaduca ďalšia pozornosť tejto problematike. Zistil sa tiež vplyv kostabilizátoru na veľkosť a EE. Na bariéry sa narážalo v oblasti oddeľovania NČ od supernatantu, teda efektívnosť centrifugácie je veľmi zásadná a je potrebné sa jej taktiež nadalej venovať. Ďalšou možnosťou by bolo využitie inej metódy separácie napr. gélovej chromatografie alebo dialýzy.

Zoznam grafov

Graf I. Kalibračná krivka k vyhodnoteniu množstva enkapsulovaného Rodamínu B	
30	
Graf II. Kalibračná krivka k vyhodnoteniu množstva enkapsulovaného FITC-dextranu	31
32	
Graf III. Kalibračná krivka pre vyhodnotenie množstva enkapsulovaného FITC-albumínu	32
Graf IV. Porovnanie EE Rodamínu B v NČ vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2	34
Graf V. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2.....	35
Graf VI. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2.....	35
Graf VII. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2.....	36
Graf VIII. Porovnanie EE FITC-dextranu v NČ vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3	38
Graf IX. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3	39
Graf X. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3	39
Graf XI. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným Rodamínom B, vytvorených polymérmi PLGA 5/5 a A2.....	40
Graf XII. Porovnanie EE FITC-dextranu v NČ vytvorených polymérmi PLGA 5/5, PLGA 7/3, A2 a A4	41
Graf XIII. Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, PLGA 7/3, A2 a A4	42
Graf XIV. Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 5/5, A2, A4 a T3	42
Graf XV. Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným FITC-dextranom, vytvorených polymérmi PLGA 7/3, PLGA 5/5, A2 a A4	43

Graf XVI.	Porovnanie EE FITC-albumínu v NČ vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie	45
Graf XVII.	Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie	46
Graf XVIII.	Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie	46
Graf XIX.	Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérom PLGA 7/3 a stabilizátormi 0,1% Tween, 1% Tween a 1% Kolliphor, po 5 a 10 minútach centrifugácie	47
Graf XX.	Porovnanie EE FITC-albumínu v NČ vytvorených polymérm PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii	50
Graf XXI.	Porovnanie veľkosti NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom vytvorených polymérm PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii	51
Graf XXII.	Porovnanie zeta potenciálu NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérm PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii	51
Graf XXIII.	Porovnanie polydisperzity NČ s enkapsulovaným FITC-albumínom, vytvorených polymérm PLGA 7/3, PLGA 5/5 3/12 a PLGA 5/5, a s rôznymi stabilizátormi, po 10 minútovej centrifugácii	52
Graf XXIV.	Celkový prehľad EE	55
Graf XXV.	Celkový prehľad veľkostí NČ	56
Graf XXVI.	Celkový prehľad zeta potenciálu NČ	57
Graf XXVII.	Celkový prehľad pdi NČ	58

Zoznam tabuliek

Tabuľka I. Súhrn zloženia formulácií.....	27
Tabuľka II. Tabuľka koncentrácií roztokov a nameraných absorpcií k vytvoreniu kalibračnej krivky	30
Tabuľka III. Tabuľka koncentrácií roztokov a ich nameraných fluorescencií k vytvoreniu kalibračnej krivky	31
Tabuľka IV. Tabuľka koncentrácií roztokov a ich nameraných fluorescencií k vytvoreniu kalibračnej krivky	32
Tabuľka V. Porovnanie výsledkov NČ vytvorených duálnou emulgáciou polymérmi PLGA 5/5 a A2.....	34
Tabuľka VI. Porovnanie RY(%).....	37
Tabuľka VII. Porovnanie výsledkov NČ pripravených nanoprecipitačnou metódou použitím polymérov PLGA 5/5, A2, A4 a T3	38
Tabuľka VIII. Porovnanie výsledkov NČ vytvorených duálnou emulgáciou použitím polymérov PLGA 5/5, PLGA 7/3, A2 a A4	41
Tabuľka IX. Porovnanie výsledkov NČ pripravených duálnou emulgáciou použitím polyméru PLGA 7/3 a rôznych stabilizátorov, po 5 a 10 minútach centrifugácie	45
Tabuľka X. Porovnanie výsledkov NČ pripravených duálnou emulgáciou použitím polymérov dvoch typov PLGA 5/5, PLGA 7/3 a rôznych stabilizátorov, po 10 minútach centrifugácie.....	50
Tabuľka XI. Súhrn hodnôt EE, veľkosti častíc, zeta potenciálu a p _{di} získaných v experimente	54

Použitá literatúra

- ¹ SILVERA BATISTA, C. A., LARSON, R. G., KOTOV, N. A.: Nonadditivity of nanoparticle interactions. *Science*. 2015, 350 (6257), s. 176. ISSN 0036-8075.
- ² CARVALHO, P. M., FELÍCIO, M. R., SANTOS, N. C., GONÇALVES, S., DOMINGUES, M.M.: Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Front. Chem.*, 2018, 6 (237), s. 1-6. ISSN 2296-2646.
- ³ HICKEY, J. W., SANTOS, J. L., WILLIFORD, J., MAO, H.: Control of Polymeric Nanoparticle Size to Improve Therapeutic Delivery. *J. Controll. Rel.*, 2015, 219, s. 6-13, 2-6. ISSN 0168-3659.
- ⁴ YUN, Y.H., LEE, B. K., PARK, K.: Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *J. Controll. Rel.*, 2015, 219, s. 12-13, 2, 3, 9. ISSN 0168-3659.
- ⁵ TIMKO, B.P., WHITEHEAD, K., GAO, W., KOHANE, D.S., FAROKHZAD, O., ANDERSON, D., LANGER, R.: Advances in drug delivery. *Annu. Rev. Mater. Res.*, 2011, 41, s. 1–20. ISSN 1545-4118.
- ⁶ ANSELMO, A.C., MITRAGOTRI, S.: An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *J. Control. Release*. 2014, 190, s. 15–28. ISSN 1873-4995.
- ⁷ TAMMAM, S. N., AZZAZY, H. M. E., LAMPRECHT, A.: Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2015, 11, s.557, 564. ISSN 1550-7041.
- ⁸ MANOLOVA, V., FLACE, A., BAUER, M., SCHWARZ, K., SAUDAN, P., BACHMANN, M.F.: Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.*, 2008, 38, s.1404–1413. ISSN 1521-4141.
- ⁹ DUNNE, M., CORRIGAN, O., RAMTOOLA, Z.: Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 2000, 21(16), s. 1659-1668. ISSN 0142-9612.
- ¹⁰ WU, L., ZHANG, J., WATANABE, W.: Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, 63, s. 456–469. ISSN 1872-8294.
- ¹¹ TENZER, S., DOCTER, D., KUHAREV, J., MUSYANOVYCH, A., FETZ, V., HECHT, R., SCHLENK, F., FISCHER, D., KIOUPTSI, K., REINHARDT, C.: Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.*, 2013, 8, s. 772–781. ISSN 1748-3395.
- ¹² RABINOW, BE.: Nanosuspensions in drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, 3, s. 785–796. ISSN 1474-1784.
- ¹³ NEL, AE., MÄDLER, L., VELEGOL, D., XIA, T., HOEK, EM., SOMASUNDARAN, P., KLAESSIG, F., CASTRANOVA, V., THOMPSON, M.: Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.*, 2009, 8, s. 543–557. ISSN 1476-4660.
- ¹⁴ YOO, J-W., DOSHI, N., MITRAGOTRI, S.: Adaptive micro and nanoparticles: temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, 63, s. 1247–1256. ISSN 1872-8294.

-
- ¹⁵ CSABA, N., CAAMANO, P., SANCHEZ, A., DOMINGUEZ, F., ALONSO, M.: PLGA: Poloxamer and PLGA: poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery. *Biomacromolecules*, 2005, 6 (1), s. 271-278. ISSN 1526-4602.
- ¹⁶ ASTETE, C. E., SABLIOV, C. M.: Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomat. Sci. - Polym. E.*, 2006, 17, s. 283, 285, 265, 267, 247. ISSN 0920-5063.
- ¹⁷ ALBANESE, A., TANG, P.S., CHAN, W.C.W.: The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2012, 14, s. 1–16. ISSN 1545-4274.
- ¹⁸ SMITH, M. C., CRIST, R. M., CLOGSTON, J. D., MCNEIL, S. E.: Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, 409 (24), s. 1-2. ISSN 1618-2642.
- ¹⁹ TOMALIA, D.A.: In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience. *J. Nanopart. Res.*, 2009, 11, s. 1251–1310. ISSN 1572-896X.
- ²⁰ LONGMIRE, M.R., OGAWA, M., CHOYKE, P.L., KOBAYASHI, H.: Biologically optimized nanosized molecules and particles: more than just size. *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, s. 993–1000. ISSN 1520-4812.
- ²¹ LONGMIRE, M. R., OGAWA, M., CHOYKE, P. L., KOBAYASHI, H.: Biologically Optimized Nanosized Molecules and Particles: More than Just Size. *Bioconjug. Chem.*, 2011, 22 (6), s. 995. ISSN 1520-4812.
- ²² FRIEDMAN, A. D., CLAYPOOL, S. E., LIU, R.: The Smart Targeting of Nanoparticles. *Curr. Pharm. Des.*, 2013, 19(35), s. 6315–6329. ISSN 1873-4286.
- ²³ Riley, T., Stolnik, S., Heald, C., Xiong, C., Garnett, M., Illum, L., Davis, S., Purkiss, S., Barlow, R., Gellert, P.: Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid)- poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymers as drug delivery vehicles. *Langmuir*, 2001, 17, s. 3168–3174. ISSN 1520-5827.
- ²⁴ PAL, S. L., JANA, U., MANNA, P. K., MOHANTA, G. P., MANAVALAN, R.: Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2011, 01 (06), s. 228-234. ISSN: 2231-3354.
- ²⁵ IQBAL, M., ZAFAR, N., FESSI, H., ELAISSARI, A.: Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int. J. Pharm.*, 2015, 496, s. 5-7, 3. ISSN 0378-5173.
- ²⁶ BILATI, U., ALLÉMANN, E., DOELKER, E.: Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, 24(1), s.67. ISSN 1879-0720.
- ²⁷ TAKAI, C., HOTTA, T., SHIOZAKI, S., MATSUMOTO, S., FUKUI, T.: Key techniques to control porous microsphere morphology in S/O/W emulsion system. *Colloids Surf. A Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, 373 (1-3), s.152-157. ISSN 0927-7757.
- ²⁸ DINARVAND, R., SEPEHRI, N., MANOOCHEHRI, S., ROUHANI, H., ATYABI, F.: Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomedicine.*, 2011, 6, s.878-879. ISSN 1178-2013.
- ²⁹ MCCALL, R.L., SIRIANNI, R.W.: PLGA nanoparticles formed by single- or double- emulsion with vitamin E-TPGS. *J. Vis. Exp.*, 2013, (82), s. 1. ISSN 1940-087X

-
- ³⁰ SIEGEL, R. A., LANGER, R.: Mechanistic studies of macromolecular drug release from macroporous polymers. II. Models for the slow kinetics of drug release. *J. Controll. Rel.*, 1990, 14 (2), s. 153-167. ISSN 0168-3659.
- ³¹ CHO, S. W., SONG, S. H., CHOI, Y. W.: Effects of Solvent Selection and Fabrication Method on the Characteristics of Biodegradable Poly(lactide-co-glycolide) Microspheres Containing Ovalbumin. *Arch. Pharm. Res.*, 2000, 23 (4), s. 385-390. ISSN 1976-3786.
- ³² SUN, S.-W., JEONG, Y.-I., JUNG, S.-W., KIM, S.-H.: Characterization of FITC-albumin encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres and its release characteristics. *J. Microencapsul.*, 2003, 20 (4), s. 479-480, 482, 486. ISSN 1464-5246.
- ³³ BILAL, M., RASHEEDB, T., IQBAL, H. M. N., HUA, H., WANGA, W., ZHANGA, X.: Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, 103, s. 569. ISSN 1879-0003.
- ³⁴ NIEMIROWICZ, K., PROKOP, I., WILCZEWSKA, A. Z., WNOROWSKA, U., PIKTEL, E., WĄTEK, SAVAGE, P. B., BUCKI, R.: Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells. *Int. J. Nanomedicine.*, 2015, 10, s. 3846, 3849. ISSN 1178-2013.
- ³⁵ CHEN, C., GUNAWAN, P., WEN, X. D., LOU, XU, R.: Silver Nanoparticles Deposited Layered Double Hydroxide Nanoporous Coatings with Excellent Antimicrobial Activities. *Adv. Funct. Mater.* 2012, 22 (4), s. 780-786. ISSN 1616-3028.
- ³⁶ FAYAZ, A. M., GIRILAL, M., MAHDY, S. A., SOMSUNDAR, S.S., VENKATESAN, R., KALACHELVAN, P.T.: Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: A different perspective for development of anti VRSA agents. *Process Biochemistry*, 2011, 46 (3), s. 637-640. ISSN 1359-5113.
- ³⁷ PAOLINO, D., ACCOLLA, M. L., CILURZO, F., CRISTIANO, M.C., COSCO, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., FRESTA, M., CELIA, C.: Interaction between PEG lipid and DSPE/DSPC phospholipids: An insight of PEGylation degree and kinetics of de-PEGylation. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2017, 155, s. 266-275. ISSN 1873-4367.
- ³⁸ LIU, L., XU, K., WANG, H., TAN, P. K. J., FAN, W., VENKATRAMAN, S. S., LI, L., YANG, Y.-Y.: Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4 (7), s. 457-463. ISSN 1748-3395.
- ³⁹ PINEDO, H. M., SMORENBURG, C. H.: *Drugs Affecting Growth of Tumours*. 2006. Basel: Birkhäuser, 237 s., ISBN 3-7643-2196-2.
- ⁴⁰ PEARCE, T.R., SHROFF, K., KOKKOLI, E.: Peptide targeted lipid nanoparticles for anticancer drug delivery. *Adv. Mater.*, 2012, 24 (28), s. 4, 7-10. ISSN 1521-4095.
- ⁴¹ PARK, K., HONG, H.-Y., MOON, H. J., LEE, B.-H., KIM, I.-S., KWON, I. C., RHEE, K.: A new atherosclerotic lesion probe based on hydrophobically modified chitosan nanoparticles functionalized by the atherosclerotic plaque targeted peptides. *J. Controll. Rel.*, 2008, 128 (3), s.217-218. ISSN 0168-3659.
- ⁴² PAN, D., SENPAN, A., CARUTHERS, S. D., WILLIAMS, T. A., SCOTT, M. J., GAFFNEY, P. J., WICKLINE, S. A., LANZAA, G. M.: Sensitive and efficient detection of thrombus with fibrin-specific manganese nanocolloids. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2009, (22), s. 1-3. ISSN1359-7345.