

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutickej technológie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**ŠTÚDIUM VPLYVU POVRCHOVO AKTÍVNYCH LÁTKOK
NA PARAMETRE POLYMÉRNÝCH NANOČASTÍC**

Hradec Králové, 2021

Katarína Kostíková

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

V Hradci Králové

.....

Katarína Kostíková

Chcela by som sa na tomto mieste poďakovať PharmDr. Ondřejovi Holasovi PhD. za odborné vedenie, cenné rady, priateľský prístup, trpezlivosť a ochotu pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Zároveň sa chcem veľmi pekne poďakovať Daniele Širajovej za pomoc v laboratóriu a psychickú podporu.

Obsah

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | ABSTRAKT | 7 |
| 2 | ABSTRACT | 8 |
| 3 | ÚVOD A CIEĽ PRÁCE | 9 |
| 4 | TEORETICKÁ ČASŤ | 10 |
| 4.1 | Nanotechnológia a nanomedicína..... | 10 |
| 4.2 | Nanonosičové systémy | 10 |
| 4.3 | Klasifikácia časticových systémov..... | 11 |
| 4.3.1 | Lipozómy | 11 |
| 4.3.2 | Dendriméry..... | 11 |
| 4.3.3 | Polymérne micely | 12 |
| 4.3.4 | Polymérne častice..... | 13 |
| 4.3.4.1 | Mikročastice | 13 |
| 4.3.4.2 | Nanočastice | 13 |
| 4.3.4.2.1 | PLGA nanočastice..... | 14 |
| 4.3.5 | Príprava nanočastíc..... | 15 |
| 4.3.5.1 | Polymerizačné metódy..... | 15 |
| 4.3.5.1.1 | Emulzná polymerizácia..... | 15 |
| 4.3.5.1.2 | Interfáciálna polymerizácia | 16 |
| 4.3.5.2 | Príprava z vopred pripraveného polyméru..... | 16 |
| 4.3.5.2.1 | Emulzne – difúzna odparovacia metóda | 16 |
| 4.3.5.2.2 | Metóda vysolovania..... | 17 |
| 4.3.5.2.3 | Nanoprecipitácia | 18 |
| 4.4 | Cielená distribúcia liečiv | 19 |
| 4.4.1 | Pasívny targeting | 19 |
| 4.4.2 | Aktívny targeting..... | 20 |
| 4.5 | Rola povrchovo aktívnych látok | 20 |
| 4.5.1 | Povrchovo aktívne látky | 21 |
| 4.5.1.1 | Cholát sodný | 21 |
| 4.5.1.2 | Poloxamér – Pluronic F-127..... | 22 |
| 4.5.1.3 | PVA..... | 23 |
| 4.5.1.4 | Cetrimid-bromid | 23 |
| 4.5.1.5 | Sorbitan monosterarát..... | 23 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.5.1.6 | Polysorbát 20..... | 24 |
| 4.6 | Fyzikálne – chemická charakterizácia nanočastíc..... | 24 |
| 4.6.1 | Stanovenie veľkosti nanočastíc | 24 |
| 4.6.1.1 | Dynamický rozptyl svetla..... | 25 |
| 4.6.1.2 | SEM a TEM..... | 26 |
| 4.6.2 | Stanovenie povrchového náboja | 27 |
| 4.6.2.1 | Zeta potenciál | 27 |
| 4.6.2.2 | Elektroforetický rozptyl svetla | 28 |
| 5 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 29 |
| 5.1 | Použité suroviny | 29 |
| 5.2 | PLGA..... | 29 |
| 5.3 | Rozpúšťadlá..... | 29 |
| 5.4 | Povrchovo aktívna látka..... | 29 |
| 5.5 | Stabilizátory..... | 30 |
| 5.6 | Použité prístroje | 30 |
| 5.7 | Použité metódy | 31 |
| 5.7.1 | Príprava nanočastíc..... | 31 |
| 5.8 | Meranie parametrov nanočastíc | 32 |
| 6 | VÝSLEDKY A DISKUSIA | 33 |
| 6.1 | Veľkosť častíc | 33 |
| 6.2 | Index polydisperzity..... | 33 |
| 6.2.1 | Cholát sodný | 34 |
| 6.2.2 | Cholát sodný + 0,1% Pluronic F-127..... | 35 |
| 6.2.3 | Cholát sodný + 0,1% Tween 20..... | 37 |
| 6.2.4 | Cholát sodný + 0,1% PVA | 38 |
| 6.2.5 | Cholát sodný + 0,1% Cetrimid-bromid | 40 |
| 6.2.6 | Cholát sodný + 0,01% SP 60 | 41 |
| 6.3 | Zeta potenciál..... | 43 |
| 6.3.1 | Cholát sodný | 43 |
| 6.3.2 | Cholát sodný + Pluronic F-127 0,1%..... | 44 |
| 6.3.3 | Cholát sodný + Tween 20 0,1%..... | 45 |
| 6.3.4 | Cholát sodný + PVA 0,1% | 46 |
| 6.3.5 | Cholát sodný + Cetrimid-bromid 0,1%..... | 47 |

| | | |
|-------|-----------------------------------|----|
| 6.3.6 | Cholát sodný + Span 60 0,01%..... | 48 |
| 7 | ZÁVER | 50 |
| 8 | POUŽITÉ SKRATKY | 51 |
| 9 | ZOZNAM TABULIEK | 53 |
| 10 | ZOZNAM OBRÁZKOV | 54 |
| 11 | POUŽITÁ LITERATÚRA | 55 |

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutickej technológie

Školiteľ: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Poslucháč: Katarína Kostíková

Názov diplomovej práce: Štúdium vplyvu povrchovo aktívnych látok na parametre polymérnych nanočastíc

Cieľom tejto diplomovej práce bolo overiť či použitie rôznych stabilizátorov ovplyvní výslednú veľkosť pripravovaných nanočastíc a zároveň zistiť, ktorý typ stabilizátora je najvhodnejší z hľadiska prípravy nanočastíc požadovanej veľkosti a tiež primeranej polydisperzity a stability. Príprava nanočastíc bola založená na použití cholátu sodného ako povrchovo aktívnej látky a polyméru PLGA (kyselina poly (mliečna-co-glykolová)), ktorý pozostáva z monomérov kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej. Nanočastice boli pripravované prostredníctvom metódy nanoprecipitácie. Zakaždým bol pripravený roztok cholátu sodného vo vode v rôznych koncentráciách: 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%, 2%, a 5%. Ako stabilizátory boli použité: poloxamer 407, polyvinylalkohol, cetrimid-bromid, a polysorbát 20, všetky v koncentrácii 0,1% a sorbitan-monostearát v koncentrácii 0,01%.

Meranie veľkosti vzniknutých nanočastíc prebiehalo na prístroji Zetasizer pri teplote 25°C. Zároveň boli merané polydisperzita a zeta potenciál. Cholát sodný bol schopný ovplyvniť výslednú veľkosť nanočastíc aj v prítomnosti stabilizátorov. Najnižšie hodnoty boli zakaždým namerané pri koncentrácii 1% - 2%. Od tohto bodu smerom k vyšším koncentráciám začala veľkosť častíc opäť stúpať. Častice stabilizované cetrimid-bromidom vykazovali vysoké hodnoty veľkosti a polydisperzity. Najvyššia hodnota (723,67 nm) bola nameraná pri koncentrácii cholátu 0,3%. Polydisperzita činila v tomto prípade 0,34. Výhodným stabilizátorom sa zdá byť poloxamer 407, pri ktorom dosahovali častice pomerne pravidelnú závislosť veľkosti na koncentrácii cholátu a zároveň dosahovali polydisperzitu s priemernou hodnotou 0,11. Jeho prítomnosť však oproti samotnému cholátu zapríčinila mierny pokles absolútnej hodnoty zeta potenciálu. Najnižšiu priemernú hodnotu polydisperzity dosiahli častice stabilizované polyvinylalkoholom – 0,09. Hodnoty zeta potenciálu boli blízke neutrálnym hodnotám, čo ale hneď nemusí znamenať nestabilnú disperziu častíc. O niečo väčšie častice vznikli za použitia polysorbátu 20, tu však polydisperzita dosahovala priemernú hodnotu 0,18.

Kľúčové slová: nanočastice, nanoprecipitácia, polyestery, in vitro, povrchovo aktívne látky

2 ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Student: Katarína Kostíková

Title of thesis: Study of the surfactants effect on polymer nanoparticle parameters

The main aim of this Diploma thesis was to examine whether the use of various stabilizers has any effect on the resultant size of prepared nanoparticles and to find out which type of stabilizer is the most appropriate in terms of preparation of the nanoparticles of the necessary size, adequate polydispersity and steadiness. The preparation of nanoparticles was based on the use of sodium cholate as a surfactant and polymer PLGA (poly (lactid-co-glycolic acid)) consisting of monomers of lactic and glycolic acids. Nanoparticles were prepared by means of nanoprecipitation method. Sodium cholate solution has always been prepared in water in different concentration: 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, and 5%. The following have been used as stabilizers: poloxamer 407, polyvinyl alcohol, cetrimonium-bromide (CTAB), and polysorbate 20, all of them in concentration of 0.1% and sorbitan-monostearate in concentration of 0.01%.

Measurement of the size of created nanoparticles was performed using the device Zetasizer at the temperature of 25°C. At the same time polydispersity and zeta potential have been measured. Sodium cholate was able to influence the resultant size of nanoparticles even in the presence of stabilizers. The lowest values have always been measured at the concentration of 1% - 2%. Ascending from this point towards the higher concentrations, the size of particles began to increase. The particles stabilized by CTAB represented great values of size and polydispersity. The highest value (723.67 nm) was measured at the concentration of cholate 0.3% when polydispersity represented 0.34. Poloxamer 407 – Pluronic F-127 seems to be a really convenient stabilizer, using which the particles reached relatively regular dependence of size on the concentration of cholate and at the same time they reached the polydispersity with an average value of 0.11. The presence of this stabilizer caused a slight decrease in the absolute value of the zeta potential as opposed to the cholate itself. The lowest average value of polydispersity reached the particles stabilized by polyvinyl alcohol – 0.09. The values of zeta potential were close to neutral values, which does not have to imply unstable dispersion of particles though. Little bit bigger particles originated using polysorbate 20, however, the polydispersity reached the average value of 0.18 here.

Key words: nanoparticles, nanoprecipitation, polyesters, in vitro, surfactants

3 ÚVOD A CIEĽ PRÁCE

Nanočastice sú v súčasnosti široko používané v oblasti medicíny a farmácie najmä ako látky umožňujúce diagnostiku a liečbu rôznych ochorení. Slúžia ako nosiče liečiv do miesta pôsobenia a typická je pre nich vysoká stabilita a schopnosť predĺženej cirkulácie v krvnom riečisku. Významným spôsobom zlepšujú vlastnosti liečiva, znižujú riziko vzniku nežiaducich účinkov a umožňujú súčasné podanie liečivých látok, ktoré sú vzájomne inkompatibilné.

Na prípravu takýchto nosičov liečiv je možné využiť viaceré materiály, pomocné látky a rôzne typy metód, ktoré umožňujú dosiahnutie častíc s požadovanou veľkosťou a polydisperzitou. V tejto diplomovej práci boli nanočastice pripravené pomocou polyméru. Ich najväčšou výhodou je schopnosť úplného biologického rozkladu, vďaka čomu v organizme nedochádza k ich kumulácii. Navyše je možné upraviť ich povrch, čo zabezpečí cielený transport a uvoľnenie liečiva do miesta účinku. Stabilitu a veľkosť vzniknutých nanočastíc je možné ovplyvniť prídavkom povrchovo aktívnych látok a stabilizátorov.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo overiť hypotézu, že nízkomolekulárne surfaktanty, ako sú soli žlčových kyselín, môžu slúžiť ako stérické stabilizátory koloidných systémov, ich koncentrácia však bude ovplyvňovať výslednú veľkosť vzniknutých častíc. PLGA bola zvolená ako modelový polymér a rôzne koncentrácie cholátu sodného boli použité vo vodnej fáze v rámci nanoprecipitačnej prípravy nanočastíc. Cieľom práce bolo navyše overiť aj to či je možné cholát k modulácii veľkosti nanočastíc použiť samostatne, alebo aj v kombinácii s inými makromolekulárnymi surfaktantami.

4 TEORETICKÁ ČASŤ

4.1 Nanotechnológia a nanomedicína

Nanotechnológia predstavuje rozširujúcu sa výskumnú oblasť, ktorá sa dotýka mnohých vied, ako sú napr. fyzika, chémia, biológia, počítačové vedy alebo inžinierstvo. Na rozdiel od nanovedy, ktorá študuje javy a manipuláciu s materiálmi na úrovni atómov, molekúl a makromolekulárnych štruktúr, nanotechnológia sa zaoberá navrhovaním, charakteristikou, výrobou a samotným používaním takýchto štruktúr, ktorých veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 1-1000 nm. V posledných rokoch sa nanotechnológia uplatňuje aj v oblasti ľudského zdravia, pričom v tomto prípade ide o nanomedicínu. (1) (2)

4.2 Nanonosičové systémy

Nanotechnológia sa v medicíne uplatňuje predovšetkým v distribúcii liečiv do cieľových tkanív. Umožňuje nám zlepšiť transport liečiv, ktoré sú slabo rozpustné vo vode, zacieliť dodávku liečiva do špecifických buniek a tkanív, zaistiť prienik liečiv cez membrány v tele, spoločne podávať dve alebo viaceré liečivá v rámci kombinovanej terapie alebo si vizualizovať miesto účinku liečiva pomocou kombinácie terapeutických látok a zobrazovacích metód. (3)

Na to, aby liečivo v organizme správne fungovalo, je potrebná jeho absorpcia, distribúcia, metabolizmus a exkrécia. Počas týchto procesov prekonáva molekula liečiva rôzne membrány a bariéry najčastejšie pasívnym transportom, napr. jednoduchou difúziou. Existujú však situácie, kedy pasívny transport nestačí. V takýchto prípadoch vyžaduje transport cez membránu aj prítomnosť odpovedajúcich prenášačov. (4)

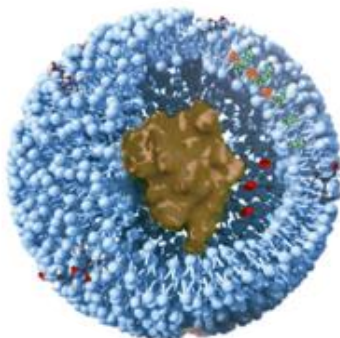
Transportéry majú významný vplyv nielen na farmakokinetiku, ale aj na samotný účinok liečiv. Nanonosičové systémy sľubujú veľký prínos do budúcnosti, pretože väčšina z nich disponuje veľkou stabilitou a predĺženou dobou cirkulácie. Absorpcia, distribúcia a exkrécia liečiv je totiž vo významnej miere ovplyvňovaná prítomnosťou efluxných púmp najmä v GIT alebo hematoencefalickej bariére. To má za následok zníženie schopnosť prieniku mnohých liečiv skrz membrány a ich účinok je zároveň obmedzený, pretože v mieste pôsobenia sa nevyskytujú v dostatočnej koncentrácii. Použitie takýchto nosičov zabráni rozpoznaníu transportovaných liečiv a ich následnému vylúčeniu z organizmu. Výsledkom je tak zvýšená biologická dostupnosť liečiv a znížená cytotoxicita. (4)

4.3 Klasifikácia časticových systémov

Časticové systémy môžu byť pripravené z rôznych materiálov. Často sú nimi napr. prírodné a syntetické polyméry, z ktorých sa pripravujú polymérne micely, dendriméry a polymérne nano- a mikročastice alebo lipidy používané na prípravu lipozómov. Je možné však využiť aj organokovové zlúčeniny, ktoré sú vhodné najmä na prípravu uhlíkových nanotrubičiek. (5)

4.3.1 Lipozómy

Lipozómy sú vezikuly o veľkosti 20nm - 5 μ m, ktoré sú výnimočné hlavne vďaka svojej fosfolipidovej dvojvrstve, ktorá je veľmi podobná fyziologickej membráne a tvorí vonkajší obal okolo vnútornej vodnej fázy. Ich štruktúra im tak umožňuje prepravovať hydrofilné, lipofilné a amfifilné liečivá. Vďaka vysokej kompatibilite s lipidovou vrstvou mozgovomiechovej bariéry umožňujú liečivám vo veľkej miere prestupovať aj do mozgu. (4) (7) (8)

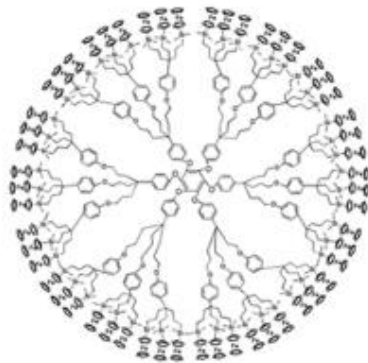


Obrázok č. 1 Štruktúra lipozómu (9)

4.3.2 Dendriméry

Dendriméry sú viacnásobne rozvetvené polyméry guľovitého tvaru, ktorých povrch je možné rôznymi spôsobmi modifikovať. Ide o makromolekuly, ktoré nevznikajú náhodnou polymerizáciou. Stavebné jednotky sa totiž na jadro viažu presne definovaným spôsobom až do vzniku pravidelnej štruktúry. Ich výhodou je možnosť konjugácie s liečivami alebo génmi, čo sa často využíva najmä v biomedicínskom odvetví, kde slúžia ako nosiče liečiv. Prítomnosť viacerých funkčných skupín na povrchu umožňuje vznik kovalentnej väzby s liečivom a vnútorná dutina poskytuje priestor pre

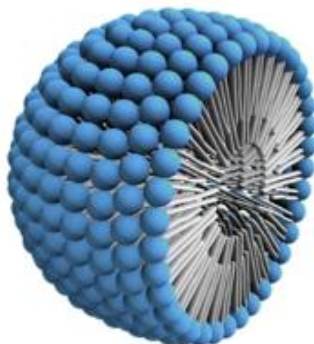
naviazanie hydrofóbných liečiv prostredníctvom elektrostatickej interakcie, vodíkovej alebo Van der Waalsovej väzby. Aj napriek tomu, že dendriméry majú vyššiu stabilitu ako lipozómy alebo vírusové nosiče, ich nevýhodou ostáva cytotoxicita a hemolytické vlastnosti, čo vo veľkej miere obmedzuje ich potenciálne využitie. (4) (8)



Obrázok č. 2 Štruktúra dendriméru (9)

4.3.3 Polymérne micely

V prípade polymérnych micel ide o koloidné častice, ktoré sa vo vodnom prostredí samovoľne vytvárajú z amfifilného polyméru. Ich veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 10 – 100 nm a disponujú veľkou stabilitou a schopnosťou viazať liečivá buď fyzikálnymi a chemickými väzbami, alebo aj elektrostatickými interakciami. Výhodou je ich schopnosť transportovať liečivá nerozpustné vo vode a v prípade protinádorových liečiv tiež zabezpečiť ich trvalé uvoľňovanie. Vďaka hydrofilnému charakteru vonkajšieho plášťa nie sú micely vychytávané prostredníctvom mononukleárneho fagocytického systému (MPS) a tým sa predlžuje doba ich cirkulácie v krvnom riečisku. Ich hlavné využitie spočíva v transporte liečiv, najmä chemoterapeutík, do miesta pôsobenia. (4)

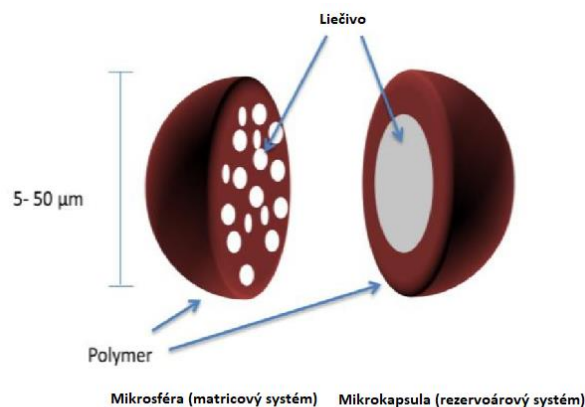


Obrázok č. 3 Štruktúra polymérnej micely (9)

4.3.4 Polymérne častice

4.3.4.1 Mikročastice

Mikročastice predstavujú systém, v ktorom sa veľkosť častíc pohybuje v intervale 1 až 250 μm . Vznikajú tak, že liečivo sa zapuzdri alebo rozptýli do polyméru, pričom ako materiál sa často využíva napr. PLGA (kyselina poly (mliečna – co – glykolová)), PLA (kyselina polymliečna), PGA (kyselina polyglykolová) alebo PEG (polyethylénglykol). Molekuly liečiva sú teda chránené, výsledkom čoho je zvýšená stabilita a znížené toxické pôsobenie na organizmus. Pri použití biologicky degradovateľného materiálu zároveň získame možnosť trvalého a riadeného uvoľňovania a samozrejme vyššiu bezpečnosť liečiva. (4) (7)



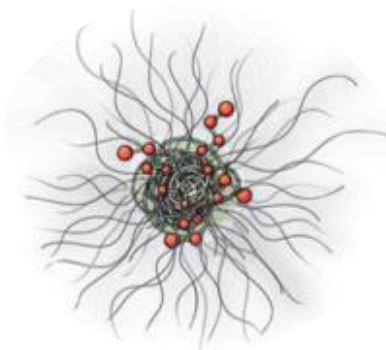
Obrázok č. 4 Mikrosféra a mikrokapsula (9)

4.3.4.2 Nanočastice

Nanočastice môžeme definovať ako pevné koloidné častice, ktorých veľkosť sa pohybuje v rozmedzí od 10 do 1000 nm. Vo všeobecnosti sa na označenie polymérnych nanočastíc používa termín PNP (polymer nanoparticles), ktorý pomenúva nanosféry aj nanokapsuly. Nanosféry sú pevné matricové častice, pre ktoré je typické, že liečivo môže byť naadsorbované na povrchu častice alebo je enkapsulované vo vnútri častice. Nanokapsuly sú vezikulárne útvary tvorené kvapalným jadrom, v ktorom je spravidla rozpustené liečivo, a pevným vonkajším plášťom. (10)

Polyméry používané pri tvorbe častíc za účelom cielej distribúcie liečiv majú často výhodu najmä v tom, že sú schopné rozložiť sa in vivo prostredníctvom pôsobenia enzýmov, neenzymatickej hydrolýzy alebo obidvomi cestami súčasne. Pri takomto

rozklade dochádza k tvorbe netoxických vedľajších produktov, ktoré sú zároveň biokompatibilné a z organizmu sú následne vylučované prirodzenými metabolickými cestami. Používané biologické materiály sa delia do dvoch základných skupín. Prvú skupinu tvoria prirodzene sa vyskytujúce polyméry, kde zaraďujeme napr. anorganické zlúčeniny typu hydroxyapatit, komplexné cukry ako je chitosan alebo ďalšie prírodné polyméry ako napr. heparín, želatína alebo kolagén. Ich charakteristickým znakom je nízka cena a skutočnosť, že nevykazujú toxicitu, na druhej strane však u nich dochádza k rýchlemu uvoľňovaniu liečivej látky. Druhú skupinu tvoria syntetické a zároveň biologicky rozložiteľné polyméry, ako napr. PLGA, PLA, PGA, alebo PCL (polykaprolaktón). Tie umožňujú uvoľňovanie liečivej látky dlhšie časové obdobie. (7) (12)



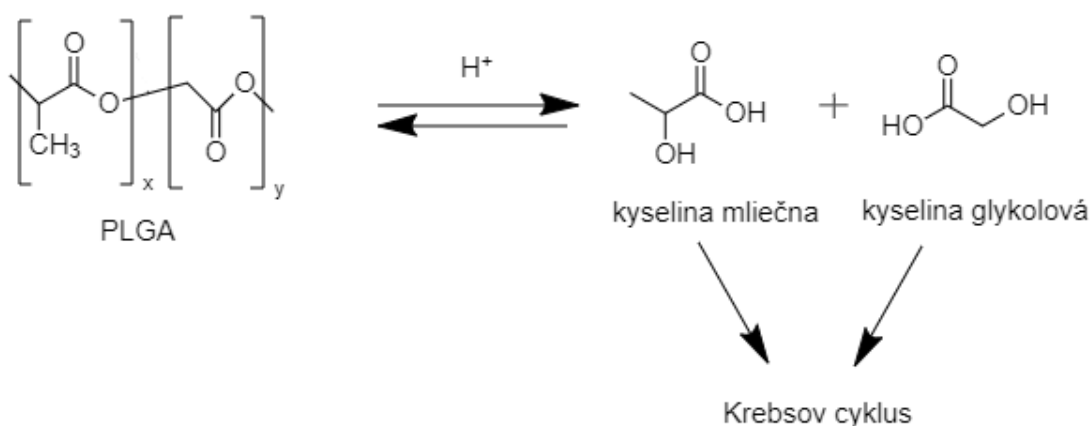
Obrázok č. 5 Štruktúra nanočastice (9)

4.3.4.2.1 PLGA nanočastice

PLGA sa zdá byť najslubnejšou zlúčeninou spomedzi všetkých materiálov používaných pri cielej distribúcii liečiv. Ide o kopolymér vytvorený z monomérov mliečnej a glykolovej kyseliny, pričom k syntéze dochádza za použitia cyklického laktidu a glykolidu prostredníctvom polymerizácie za otvorenia kruhu. Hlavnou výhodou je nepochybne schopnosť úplného biologického rozkladu v dôsledku hydrolýzy esterových väzieb vo vodnom prostredí na kyselinu mliečnu a kyselinu glykolovú. Tie sú následne v organizme metabolizované prostredníctvom Krebsovho cyklu a vylučované ako voda a oxid uhličitý, čo vyúsťuje do minimálnej systémovej toxicity. Ďalšie pozitívne vlastnosti zahŕňajú biokompatibilitu, možnosť navrhnutia liekovej formy s trvalým uvoľňovaním, možnosť povrchovej modifikácie za účelom účinných biologických interakcií, ochrana liečiva pred degradáciou a tiež zacielenie na konkrétnu bunku alebo orgán. (12) (17) (18) (19)

Existuje viacero faktorov, ktoré ovplyvňujú degradáciu a uvoľňovanie liečiva z polyméru vytvoreného na podklade PLGA. Patrí tu napr. počiatková molekulová hmotnosť M_w , monomérny pomer kyseliny mliečnej (LA) a kyseliny glykolvej (GA) v matrici PLGA, typ liečiva a aj metóda prípravy. Znalosť a súčasné dodržiavanie týchto faktorov nám umožňuje vytvoriť požadované nosičové systémy liečiv s vyššou efektivitou a vyššou účinnosťou na cieľové bunky. (18)

Jednotlivé formy PLGA sú rozlišované podľa pomeru monomérov, napr. PLGA 50:50 znamená, že kopolymér je zložený z 50 % kyselinou mliečnou a z 50 % kyselinou glykolvej. (17)



Obrázok č. 6 Hydrolýza PLGA (17)

4.3.5 Príprava nanočastíc

Na prípravu nanočastíc je možné využiť metódy, ktoré sa delia do dvoch hlavných skupín. Jednou z nich sú metódy bottom-up, pri ktorej dochádza k zostavovaniu častíc z menších stavebných jednotiek – monomérov. V tomto prípade ide teda o polymerizáciu. Druhá skupinu tvoria metódy top-bottom, pri ktorej častice vznikajú z vopred pripraveného polyméru. (20)

4.3.5.1 Polymerizačné metódy

Vo všeobecnosti je možné metódy polymerizácie, ktoré sú využívané pri príprave nanočastíc, rozdeliť na emulznú a interfaciálnu polymerizáciu.

4.3.5.1.1 Emulzná polymerizácia

Emulzná polymerizácia patrí medzi najrýchlejšie metódy prípravy nanočastíc. Existujú dva podtypy, prvý zahŕňa použitie organickej a ten druhý použitie vodnej kontinuálnej

fázy. Pri použití organickej kontinuálnej fázy dochádza k disperzii monoméru do emulzie alebo do prostredia, v ktorom sa monomér nerozpúšťa. Takto sa pripravujú napr. polyakrylamidové nanosféry. V prípade vodnej kontinuálnej fázy dochádza k rozpusteniu monoméru vo vodnom roztoku. Iniciačná polymerizácia je zahájená v momente, kedy sa molekula rozpusteného monoméru stretne s iniciátorom, teda iónom alebo voľným radikálom. Alternatívou môže byť premena molekuly monoméru na iniciálny radikál pomocou vysoko energetického žiarenia, ktorým je gama žiarenie alebo UV svetlo. Následne dochádza k rastu reťazca a naviazaniu ďalších molekúl monoméru podľa aniónového mechanizmu polymerizácie. (21)

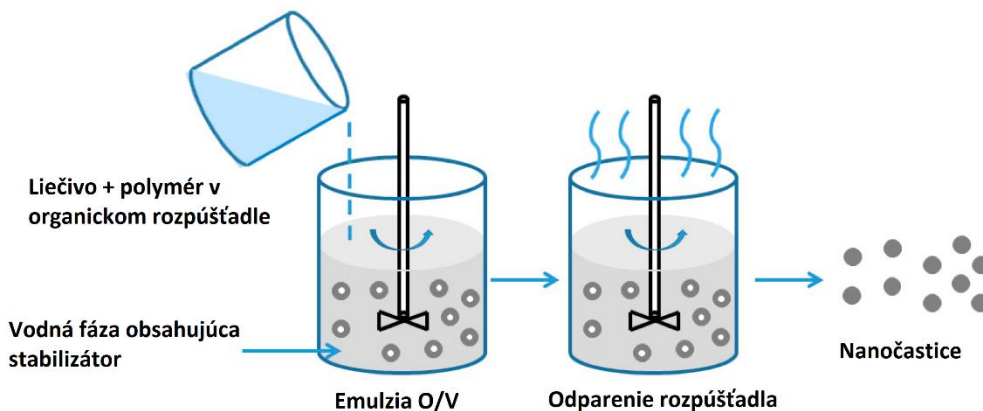
4.3.5.1.2 Interfáciálna polymerizácia

Interfáciálna polymerizácia patrí medzi najdôležitejšie metódy prípravy polymérnych nanočastíc. Ide o skokový typ polymerizácie, ktorá prebieha medzi dvomi nemiesiteľnými fázami, ktorými sú najčastejšie dve kvapaliny. Tento typ polymerizácie však môže prebiehať aj medzi kvapalinou a plynom. Vzniknuté častice majú jedinečné vlastnosti ako napr. duté štruktúry alebo anizometrické tvary. (23) (24)

4.3.5.2 Príprava z vopred pripraveného polyméru

4.3.5.2.1 Emulzne – difúzna odparovacia metóda

Táto metóda odparenia rozpúšťadla patrí medzi top-down metódy prípravy nanočastíc. Pri tejto metóde sú polymér a liečivo rozpustené v rozpúšťadle, ktoré je čiastočne miešateľné s vodou. Takýmto rozpúšťadlom je napr. dichlormethan alebo ethylacetát. Táto metóda zahŕňa dva kroky. V prvom kroku je organický roztok polyméru a rozpusteného liečiva emulgovaný do vodnej fázy, následkom čoho vznikne emulzia typu o/v a molekuly rozpúšťadla difundujú do vodnej fázy. Disperzné činidlo zabezpečí rozptýlenie organického roztoku do formy nanokvapôčok za pomoci vysoko energetickej homogenizácie. V druhom kroku dochádza k odpareniu organického rozpúšťadla za vzniku nanosfér, v ktorých je rovnomerne rozptýlené liečivo. K odpareniu dochádza za zvýšenej teploty, tlaku alebo prostredníctvom stáleho miešania. Veľkosť častíc je v tomto prípade možné ovplyvniť rýchlosťou miešania, viskozitou organickej a vodnej fázy, teplotou a tiež množstvom a typom disperzného činidla. (20) (21)



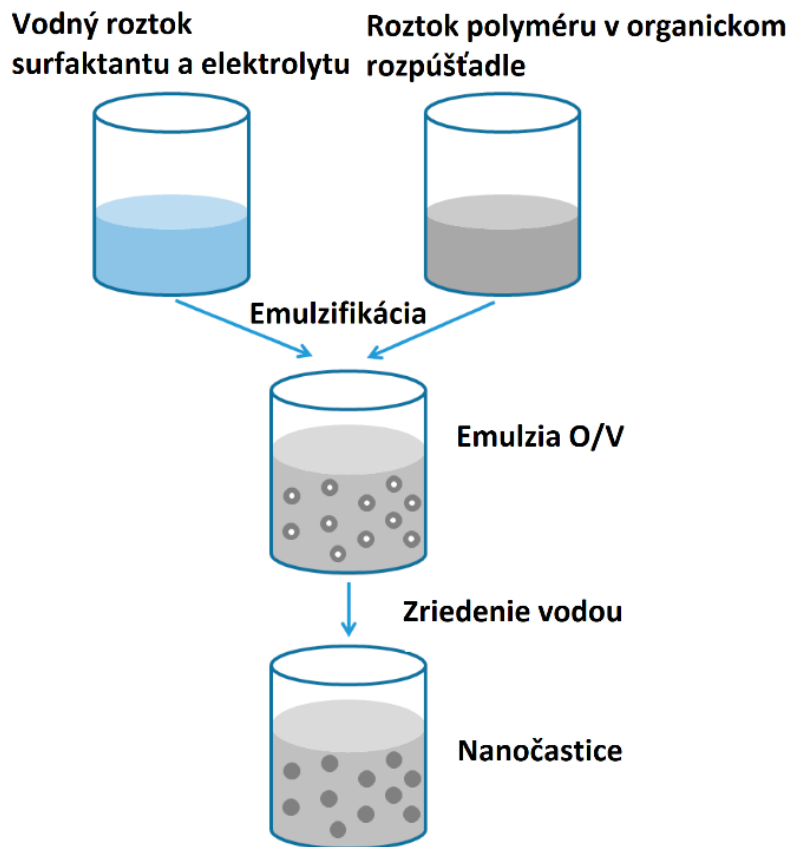
Obrázok č. 7 Emulzne-difúzna odparovacia metóda (25)

4.3.5.2.2 Metóda vysolovania

Ďalšou top-down metódou používanou pri príprave nanočastíc je metóda vysolovania. Princíp tejto metódy spočíva v tom, že liečivo a polymér sú rozpustené v polárnom rozpúšťadle, ktoré je miešateľné s vodou. Ako rozpúšťadlo sa najčastejšie využíva acetón. Organický roztok polyméru a liečiva sa následne emulguje do vody obsahujúcej elektrolyty, ako napr. chlorid vápenatý alebo horečnatý, resp. sacharóza ako neelektrolyt, ktoré v tomto prípade slúžia ako vysolovacie činidlá. Prítomné elektrolyty sú zodpovedné za spomalenie miešania vodnej fázy s organickým rozpúšťadlom. Ďalej sú vo vodnej fáze prítomné stabilizátory, najčastejšie polyvinylpyrrolidón alebo hydroxyethylcelulóza. (20) (21)

Následne je potrebné rýchle nariedenie emulzie o/v dostatočným množstvom vodného roztoku, aby sa umožnila difúzia acetónu do vodnej fázy. Tým sa začne tvorba nanosfér. K odstráneniu rozpúšťadla a vysolovacieho činidla dochádza prostredníctvom cross-flow filtrácie. (20) (21)

Táto metóda nevyžaduje zvýšenie teploty a preto sa s obľubou využíva pri enkapsulácii liečiv citlivých na teplo. Na druhej strane, nevýhodou je fakt, že je to použiteľné výhradne pre lipofilné liečivá. (21) Parametrami, ktoré majú vplyv na veľkosť vzniknutých častíc sú koncentrácia použitého polyméru, jeho molekulová hmotnosť a tiež použité rozpúšťadlá. (20)



Obrázok č. 8 Metóda vysolovania (25)

4.3.5.2.3 Nanoprecipitácia

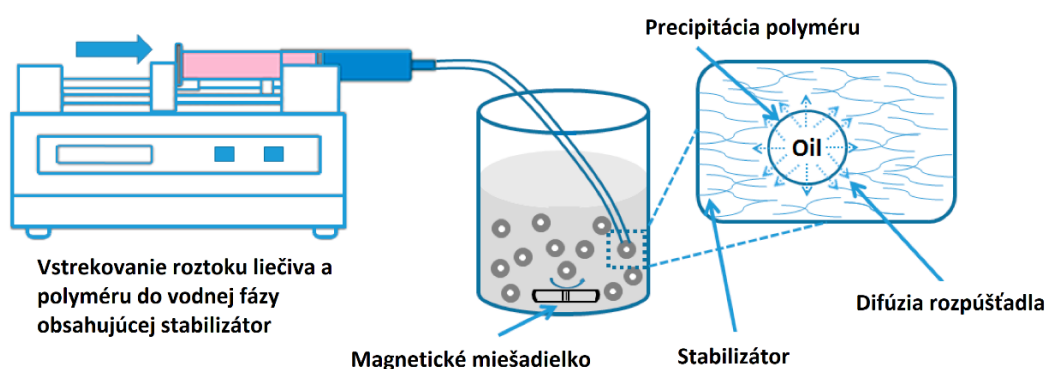
V prípade nanoprecipitácie ide o veľmi jednoduchú, rýchlu a dobre reprodukovateľnú metódu prípravy nanosfér a nanokapsúl. (10)

Je to proces, pri ktorom je potrebné si najskôr pripraviť roztok polyméru a liečiva vo vhodnom rozpúšťadle. Ako polymérne rozpúšťadlo sa najčastejšie využíva acetón a etanol, ale je možné využiť aj napr. dioxán. Podstatné pritom je, aby bolo použité rozpúšťadlo semipolárne, miešateľné s vodou a aby bolo možné ho jednoducho odstrániť odparením. Za pomoci stabilizátora je navyše možné vzniknutý roztok stabilizovať. Pripravený roztok sa následne za stáleho miešania vstrikne alebo naleje do vodného roztoku, ktorý taktiež obsahuje stabilizátor, napr. poloxamér. Nanočastice tak vznikajú prakticky okamžite a to vďaka rýchlej difúzii organického rozpúšťadla do vodnej fázy, kedy vznikajú turbulencie medzi jednotlivými fázami a vytvárajú tzv. Marangoniho efekt. (10) (27) (26)

Dôležitými parametrami, ktoré ovplyvňujú tvorbu častíc o požadovanej veľkosti a úzkej distribúcii veľkosti sú rýchlosť pridávania organickej fázy do vodného roztoku, rýchlosť miešania vodnej fázy, metóda pridávania organickej fázy a tiež pomer organickej

a vodnej fázy. Prítomnosť povrchovo aktívnej látky nemá vplyv na samotnú tvorbu nanočastíc, avšak povaha a koncentrácia použitého surfaktantu má vplyv na výslednú veľkosť. Okrem toho, povrchovo aktívna látka zabezpečuje ochranu pred zhlukovaním častíc po dlhú dobu ich skladovania. (10)

Celý proces tvorby nanočastíc pomocou metódy nanoprecipitácie je možné vykonať aj obrátene, teda pridávaním vodnej fázy do roztoku polymérneho rozpúšťadla. (10)



Obrázok č. 9 Nanoprecipitácia (25)

4.4 Cielená distribúcia liečiv

Cielená distribúcia liečiv zabezpečuje dodanie liečiva do miesta pôsobenia v maximálnom rozsahu, čím sa zvyšuje jeho biologická dostupnosť a účinok liečiva je zvýšený. (4) Nanotechnológia zohráva kľúčovú úlohu z hľadiska cielenej distribúcie liečiv do miesta pôsobenia, a to buď prostredníctvom aktívneho alebo pasívneho targetingu. (28)

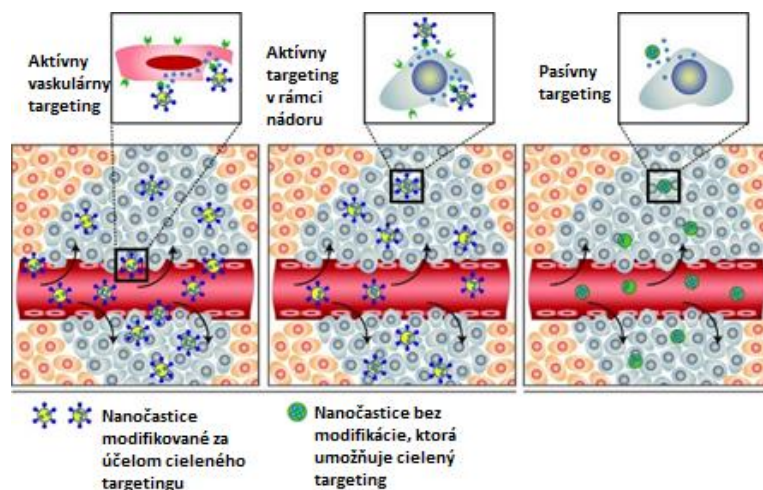
4.4.1 Pasívny targeting

Pasívny targeting využíva rozdiely v anatómii medzi zdravým a postihnutým tkanivom. Nádorové alebo zápalom zmenené tkanivo totiž môže vykazovať zvýšenú priepustnosť a retenčný čas, čo umožňuje nanočasticiam cirkulujúcim v krvi nahromadenie sa na postihnutom mieste. (28) Častice sú schopné extravazácie skrz fenestrácie v cievach a kapilárach, ktoré sú početné v nádorových alebo zapálených tkanivách na základe EPR efektu (enhanced permeability and retention effect), čo je efekt zvýšenej priepustnosti

a retencie. V takejto situácii môže dôjsť k uvoľneniu liečiva v extracelulárnej matrix a difúzii v rámci tkaniva. (29)

4.4.2 Aktívny targeting

Aktívny targeting vyžaduje konjugáciu ligandov špecifických pre receptory. (28) Akonáhle dôjde k prieniku nanočastíc s liečivom do cieľového tkaniva, ligandy naviazané na časticiach sú schopné aktívne zacieliť na receptory prítomné v nadmernom množstve v poškodených bunkách. To má za následok zvýšenú akumuláciu v cieľovom tkanive a zároveň zvýšený terapeutický účinok liečiva. (29)



Obrázok č. 10 Aktívny a pasívny targeting (29)

4.5 Rola povrchovo aktívnych látok

V prípade polymérnych nanočastíc je možné upravovať ich fyzikálne – chemické vlastnosti. Tým sa dosiahne zvýšenie stability a zároveň možnosť jednoduchšieho skladovania. Taktiež je možná úprava ich povrchu za použitia špecifických molekúl za účelom zvýšenia kontroly nad významnými vlastnosťami častíc, ako napr. doba cirkulácie v krvnom riečisku, hromadenie v mieste pôsobenia alebo ich vychytávanie bunkami. (30) Ďalším účelom modifikácie povrchu je dosiahnutie špecifickej väzby na cieľové bunky, čím sa zároveň zníži škodlivé pôsobenie na zdravé tkanivá. (4)

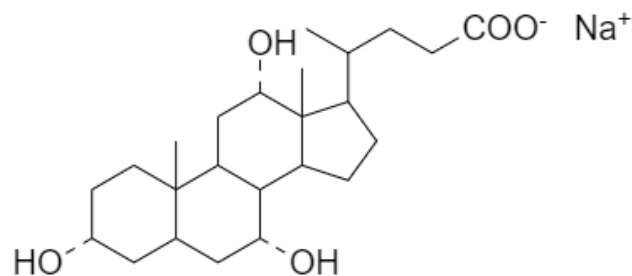
4.5.1 Povrchovo aktívne látky

Jedným z kľúčových technologických parametrov pri príprave nanočastíc je použitie povrchovo aktívnych látok, ktorých úlohou je znížiť povrchové napätie častíc na rozhraní s non-solventom a tým zabrániť zhlukovaniu častíc. Konkrétny typ a koncentrácia použitého surfaktantu sú významné parametre pre stabilitu, farmakokinetiku aj enkapsulačnú efektívnosť. Okrem toho, naviazanie povrchovo aktívnych látok na povrch nanočastíc umožňuje maskovanie pred makrofágmi z MPS. (15) Van Oss už v minulosti úspešne dokázal, že hydrofilná vrstva na povrchu mnohých baktérií, tvorená proteínmi, polysacharidmi a glykoproteínmi, ich významne chráni pred fagocytózou. Takmer v rovnakom období Davis a jeho spolupracovníci preukázali, že PEGylované proteíny nie sú imunogénne. V dôsledku toho je povrchová úprava polymérnych nanočastíc často využívaná ako prevencia opsonizácie po intravenóznom podaní a častice cirkulujú v krvnom obehu dlhšie. (31) Medzi veľmi často používanými stabilizátormi patria neiónové surfaktanty, ako napr. poloxamer 407, polysorbát alebo PVA (polyvinylalkohol). (32)

4.5.1.1 Cholát sodný

Cholát je povrchovo aktívna látka syntetizovaná v pečeni. Ide o soľ kyseliny cholovej, ktorá patrí medzi základné žľčové kyseliny. (33) Skladá sa z hydrofóbného steroidného jadra, na ktorom sú naviazané tri hydroxylové skupiny a jeden zvyšok karboxylovej skupiny. Práve tieto hydrofilné skupiny majú za následok odlišné amfifilné vlastnosti cholátu od iných alifatických povrchovo aktívnych látok. Vďaka týmto amfifilným vlastnostiam sa žľčové kyseliny s obľubou využívajú pri vyvíjaní transportných systémov na báze micel. Steroidné jadro je totiž schopné vytvárať hydrofóbne interakcie s liečivom, zatiaľ čo naviazané polárne skupiny tvoria intermolekulárne vodíkové väzby, čím napomáhajú k procesu tvorby micel. Už samotné žľčové kyseliny vytvárajú vo vodnom prostredí jednoduché micely prostredníctvom svojich aniónov. (34)

Soli žľčových kyselín sú známe tým, že majú schopnosť destabilizovať lipidové dvojvrstvy. Výskumy ukázali, že prítomnosť dostatočného množstva cholátu pri určitej koncentrácii polyméru spôsobuje ireverzibilný nárast veľkosti záporne nabitých vezikúl, zatiaľ čo bez prítomného cholátu dochádza len k reverzibilnému zhlukovaniu týchto častíc. To je pravdepodobne zapríčinené odpudivými silami medzi záporne nabitými vezikulami. Záporne nabitý cholát sodný tak znižuje tendenciu k agregácii častíc, ktorá je indukovaná polymérom. (35)



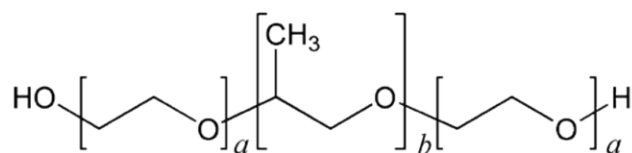
Obrázok č. 11 Štruktúra cholátu sodného (36)

4.5.1.2 Poloxamér – Pluronic F-127

Pluronic F-127 (Poloxamer 407) je povrchovo aktívna látka typu polyethylénoxid – polypropylénoxid – polyethylénoxid (PEO – PPO – PEO), používaná ako modifikátor povrchu, ktorý je nevyhnutný pre biokompatibilitu a zabránenie agregácie pripravovaných nanočastíc. (19)

Patrí medzi poloxaméry, ktoré predstavujú skupinu amfifilných neiónových trojblokových kopolymérov zložených z hydrofóbného polypropylénoxidu (PPO) a hydrofilného polyethylénoxidu (PEO), ktoré sú veľmi často využívané pri produkcii mikročastíc a nanočastíc za účelom vytvorenia vhodných nosičov liečiv. Naadsorbovanie poloxaméru na povrch pripravovaných nanočastíc zohráva dôležitú úlohu v technológii, pretože významne modifikuje ich schopnosť agregácie a sedimentácie. Táto povrchová modifikácia zároveň zabraňuje rýchlemu vychytávaniu intravenózne podaných liečiv makrofágmi a orgánmi MPS, najmä pečeno a slezinou. Okrem toho, prítomnosť poloxaméru na povrchu častíc dokáže zlepšiť uvoľnenie enkapsulovaného liečiva a ďalších látok, ako napr. DNA alebo proteínov a súčasne ich ochrániť pred predčasnou degradáciou v organizme. (31) (37)

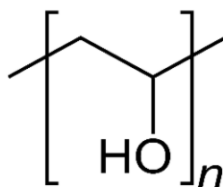
Rozsiahle štúdie preukázali nízku toxicitu a zároveň nízke riziko Pluronicu F-127 vyvolať imunitnú reakciu. Ďalšia výhoda tkvie v tom, že je schopný inhibovať efluxné pumpy, ktoré pumpujú protinádorové liečivá smerom von z nádorového tkaniva a tým zvýšiť citlivosť liečiv voči tumorom. Pluronic F-127 dokáže prekonať detoxikačný systém GSH/GST (glutathion/glutathion-S-transferáza) zodpovedný za mnohopočetnú rezistenciu k liečivám, ktorá je pozorovaná v bunkách karcinómu prs u ľudí a tiež je schopný inhibovať P – glykoproteín tým, že zníži dostupnosť ATP, čím sa zvýši citlivosť nádorových buniek voči protinádorovému liečivu 2–3x. (38)



Obrázok č. 12 Všeobecná štruktúra poloxaméru (37)

4.5.1.3 PVA

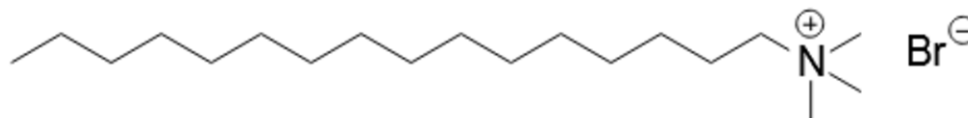
PVA (polyvinylalkohol) je vo vode rozpustná, polymérna, amfifilná, povrchovo aktívna látka, ktorá prispieva k tvorbe častíc s rovnomernou veľkosťou distribúcie. Nevýhodou PVA je, že pri pokusoch na zvieratách sa zistil možný karcinogénny potenciál. Ďalšie štúdie preukázali u zvierat zvýšenie krvného tlaku, anémiu alebo pokles funkcie CNS po intravenóznom a subkutánnom podaní. (38)



Obrázok č. 13 Štruktúra PVA

4.5.1.4 Cetrymid-bromid

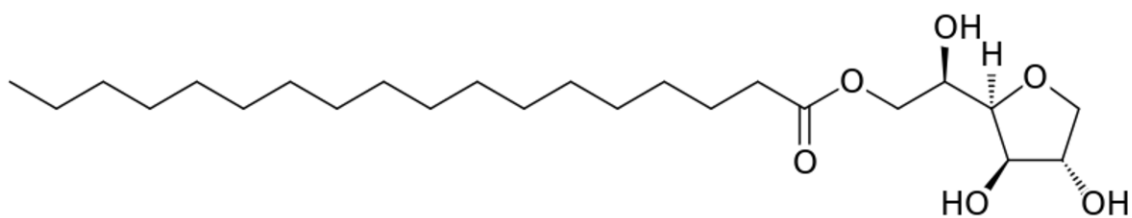
Cetyltrimethylamonium-bromid (cetrymid-bromid, CTAB) je povrchovo aktívna látka zo skupiny kvartérnych amóniových solí, ktorá sa skladá z dlhého reťazca atómov uhlíka. V procesoch prípravy nanočastíc sa uplatňuje najmä vďaka kladnému náboju v molekule. (39) (40)



Obrázok č. 14 Štruktúra cetrymid-bromidu

4.5.1.5 Sorbitan monostearát

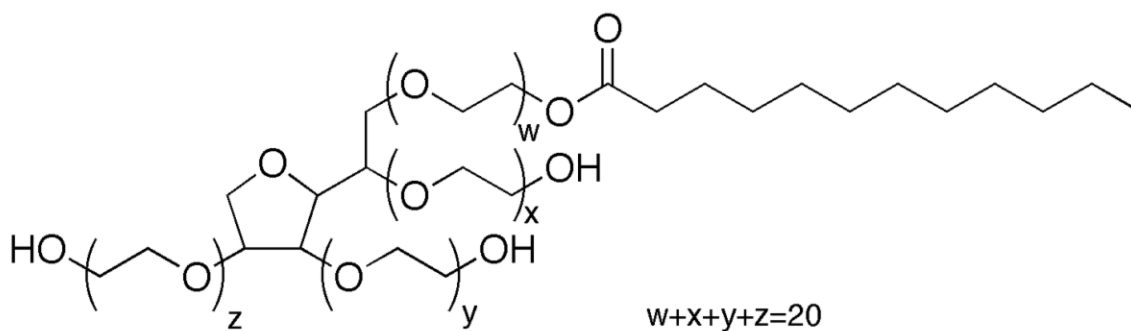
Sorbitan monostearát alebo Span 60 je neionická povrchovo aktívna látka. Ide o ester sorbitolu s kyselinou stearovou. (41) (42)



Obrázok č. 15 Štruktúra sorbitan monostearátu

4.5.1.6 Polysorbát 20

Polysorbát 20 (polyoxyethylén sorbitan monolaurát) – Tween 20 je neiónová povrchovo aktívna látka, kde hydrofóbnu časť molekuly tvorí uhľovodíkový reťazec a hydrofilnú časť tvoria jednotky polyetylénoxidu. (43)



Obrázok č. 16 Štruktúra polysorbátu

4.6 Fyzikálne – chemická charakterizácia nanočastíc

Nanomateriály vyvinuté v posledných rokoch disponujú novými fyzikálne – chemickými vlastnosťami, ktoré vplývajú na ich fyziologické pôsobenie. Patria medzi nich napr. zloženie, veľkosť, tvar alebo povrchové vlastnosti. Využitie rôznych techník pre charakteristiku nanomateriálov nám umožňuje pochopiť, ako tieto vlastnosti ovplyvňujú samotné pôsobenie častíc v organizme. (44)

4.6.1 Stanovenie veľkosti nanočastíc

Dôležitým parametrom nanočastíc je ich veľkosť, ktorá zohráva významnú úlohu v tzv. drug-loadingu alebo in vivo distribúcii. Prostredníctvom receptora sú endocytózou vychytávané častice vo veľkostnom intervale 100 až 200 nm, zatiaľ čo u väčších častíc prevažuje fagocytóza. Veľkosť častíc vplýva aj na proces extravazácie, difúzie do nádorového tkaniva alebo aj na vychytávanie bunkami. (16)

Okrem toho, že je veľkosť významným parametrom pri transporte nanočastíc z krvného riečiska do tkanív a postihnutých buniek, zohráva tiež dôležitú úlohu v procese eliminácie prostredníctvom MPS. Výskum ukázal, že častice väčšie ako 200 nm sa v organizme hromadia v slezine, Kupfferové bunky v pečeni vychytávajú častice o veľkosti približne 100 až 150 nm a častice menšie ako 5,5 nm sú vychytávané v obličkách. Vďaka tomuto poznatku je pri príprave nanočastíc za súčasného dodržania prísnych podmienok možné očakávať častice s vysoko predvídateľnou veľkosťou a úzkym rozmedzím distribúcie veľkosti častíc. (16) Na jednoznačné určenie veľkosti pripravovaných nanočastíc je možné využiť viaceré metódy, z ktorých najväčší význam majú mikroskopické alebo metódy založené na rozptyle svetla. (44)

4.6.1.1 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (Dynamic Light Scattering – DLS), ktorý sa označuje aj ako Fotonová korelačná spektroskopia (Photon Correlation Spectroscopy – PCS) je jednou z najpoužívanejších metód, ktorá nám umožňuje skúmať veľkosť polymérnych nanočastíc, anorganických nanočastíc a lipozómov. (44) (45)

Princíp spočíva v meraní časovej fluktuácie svetla rozptýleného prostredníctvom častíc, ktoré sú dispergované v kvapaline pod určitým uhlom rozptylu. Všetky častice menšie ako 1 μm totiž podliehajú náhodnému Brownovmu pohybu, ktorý vzniká vďaka tepelnej energii vytváranej na základe vzájomného pôsobenia dispergovaných častíc a kvapalného média. Dôležité pritom je, aby bol roztok s časticami v lúči monochromatického svetla, následne vhodný detektor detekuje vzniknutý signál. Výsledná intenzita závisí na veľkosti, tvare a indexe lomu. (44) (46)

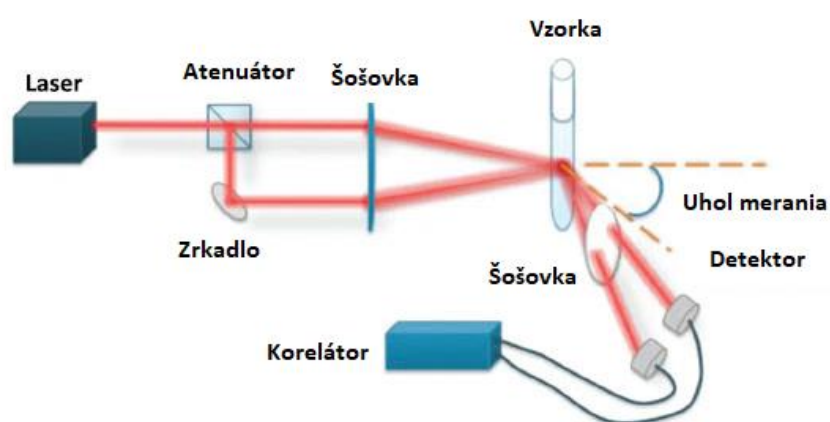
Stokes – Einsteinova rovnica určuje translačný difúzny koeficient D s hydrodynamickým polomerom častíc r_h , k_B označuje Boltzmannovu konštantu, T termodynamickú teplotu a η viskozitu kontinuálnej fázy. (44)

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h}$$

Veľkosť častíc získaná touto technikou je obvykle väčšia ako pri použití iných techník a je definovaná ako hydrodynamický polomer alebo priemer, pričom priemer označuje veľkosť častice spolu so solvatačnou vrstvou rozptýlenou v disperznom médiu. Takýto

údaj nám zároveň poskytuje informácie o fyzikálnom stave nanočastíc v kvapaline, čo môže pomôcť aj pri posudzovaní hydrofobicity častíc. (44)

Výpočet veľkosti častíc na základe Stokes – Einsteinovej rovnice však nemusí byť vždy správny. Táto rovnica totiž neberie do úvahy fakt, že častice môžu mať aj iný než guľovitý tvar, že sú schopné interakcií a nemusia byť vždy monodisperzné. Práve preto sa na získanie presnejších výsledkov týkajúcich sa veľkosti a tvaru častíc používa MDLS (Multi – angle dynamic light scattering), teda získavanie dát z viacerých uhlov, SLS (static light scattering), čiže statický rozptyl svetla alebo mikroskopické meranie. (44)



Obrázok č. 17 Schéma dynamického rozptylu svetla (44)

4.6.1.2 SEM a TEM

SEM (Skenovacia elektrónová mikroskopia) a TEM (Transmisná elektrónová mikroskopia) patria medzi metódy elektrónovej mikroskopie, vďaka ktorým dokážeme určovať veľkosť častíc, distribúciu veľkosti častíc a prítomnosť zhlukov. (44)

SEM spočíva v tom, že využíva zväzok urýchlených elektrónov s vysokou kinetickou energiou a ten pôsobí na povrch pevnej častice. Po zrážke elektrónov s povrchom sa následne začnú vytvárať signály, pričom detektor zachytí len spätne rozptýlené elektróny, ktoré vychádzajú z pevnej častice. Výhodou je možnosť rýchleho pozorovania vzoriek aj možnosť simulácie 3D štruktúry. Na druhej strane je nutná úprava vzoriek pred samotným pozorovaním, ktorá spočíva v nanosení vodivej vrstvičky na povrch nanočastíc, ktorá ale zároveň môže modifikovať veľkosť pozorovaných častíc. (44)

TEM pozostáva zo zväzku elektrónov prechádzajúceho skrz viaceré šošovky, aby previedol zachytený obraz na zväčšený. Ten vzniká na základe interakcií elektrónov,

ktoré vzorkou prešli. Keďže elektróny dokážu interagovať len s vodivými materiálmi, vzorky musia byť podobne ako pri SEM vopred upravené. Výhodou oproti SEM je, že v tomto prípade je možné získať informácie o veľkosti a tvare aj u veľmi malých častíc. (44)

Zatiaľ čo SEM umožňuje merať častice o veľkosti 1 – 20 nm, TEM nám poskytuje možnosť merať častice aj o veľkosti 0,2 nm.

Výsledná veľkosť častíc meraná prostredníctvom DLS a TEM sa veľmi často líši, čo je spôsobené tým, že DLS meria častice spolu s ich solvatačnou vrstvou. (47)

4.6.2 Stanovenie povrchového náboja

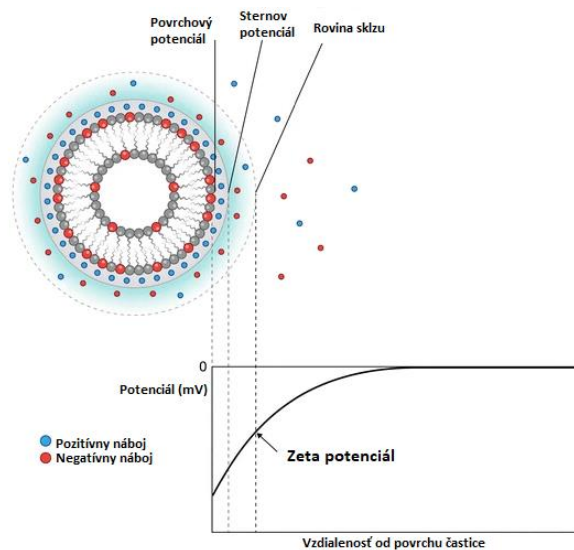
Významným faktorom, ktorý sa podieľa na stabilizácii nanosystémov prostredníctvom elektrostatických odpudivých síl je ich povrchový náboj. Ten navyše dokáže ovplyvňovať vzájomné pôsobenie nanosystémov s okolitým prostredím. Jednou zo základných metód na meranie povrchového náboja je Zeta potenciál. (44)

4.6.2.1 Zeta potenciál

Určovanie Zeta potenciálu (elektrického potenciálu v kĺzavej rovine) je štandardným analytickým meraním povrchu nanočastíc. Využíva sa na stanovenie ich povrchového náboja a na základe toho rozlišujeme katiónový, aniónový alebo neutrálny charakter častíc. (48)

Okolie častice tvorí elektrická dvojvrstva. Vrstva bezprostredne obklopujúca časticu, ktorá je tvorená pevne viazanými iónmi s opačným nábojom ako je náboj častice, sa nazýva Sternova vrstva. V jej okolí sa nachádza difúzna vrstva, v ktorej sú ióny viazané o niečo slabšie. Približne v strede tejto difúznej vrstvy je pomyselná hranica, ktorá oddeľuje ióny pohybujúce sa s časticou od iónov, ktoré sa časticou nepohybujú. Práve táto hranica sa nazýva kĺzava rovina a potenciál v nej sa nazýva Zeta potenciál. (44)

Meranie je ovplyvnené viacerými faktormi, napr. teplotou, pH, vodivosťou a viskozitou rozpúšťadla. (48)



Obrázok č. 18 Zeta potenciál (48)

4.6.2.2 Elektroforetický rozptyl svetla

Zeta potenciál je možné určiť pomocou elektroforetického rozptylu svetla. Počas elektroforézy, kedy je skúmaná disperzia vystavená pôsobeniu elektrického poľa, sa častice pohybujú smerom k opačne nabitým elektródam. Počas tohto procesu dochádza k rozptylu dopadajúceho laserového lúča prostredníctvom pohybujúcich sa častíc. Takýto pohyb spôsobí, že rozptýlené svetlo má inú frekvenciu než pôvodný laserový lúč a frekvenčný posun (tiež Dopplerov posun) je úmerný rýchlosti pohybu častíc. (49)

Najskôr sa laserový lúč sa rozdelí na dve časti, pričom jedna časť smeruje k vzorke a tá druhá predstavuje referenčný lúč. Vzorka rozptýli dopadajúce svetlo, ktoré sa následne opticky zmieša, respektíve skombinuje s referenčným svetlom. Tým je možné určiť Dopplerov posun, od ktorého je odvodená rýchlosť pohybujúcich sa častíc a Zeta potenciál sa následne vypočíta na základe Henryovej rovnice:

$$U_E = \frac{2\varepsilon \zeta F(Ka)}{3\eta}$$

v ktorej U_E predstavuje elektroforetickú pohyblivosť, ε - dielektrickú konštantu, ζ - zeta potenciál, η - dynamickú viskozitu pri experimentálnej teplote a $f(Ka)$ - Henryovu funkciu. (49)

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Použité suroviny

Cholát sodný (Roth, Karlsruhe, Nemecko)

PLGA (Purasorb PDLG 5002A 50:50 (LA:GA), Corbion, Holandsko)

Polyvinylalkohol (Merck, Praha)

Poloxamer 407, Pluronic® F-127 (Merck, Praha, ČR)

Polysorbát 20, Tween 20 (Merck, Praha, ČR)

Cetrimid-bromid (Merck, Praha, ČR)

Sorbitan monostearát, Span 60 (Merck, Praha, ČR)

Čistená voda (FaF UK)

Aceton (PENTA s.r.o., Chrudim, ČR)

5.2 PLGA

V rámci diplomovej práce bol ako polymér používaný PLGA (Purasorb PDLG 5002A 5:5). Ide o kopolymér zložený z monomérov kyseliny mliečnej a kyseliny glykolyvej.

$M_w = 17\,000\text{ g/mol}$.

5.3 Rozpúšťadlá

Čistená voda

Aceton

5.4 Povrchovo aktívna látka

Cholát sodný

$M_r = 430,6\text{ g/mol}$

HLB = 18

CMC = 9-15 mM (20-25°C)

5.5 Stabilizátory

Polyvinylalkohol

$M_n = 31\,000\text{--}50\,000$ g/mol hydrolyzovaný z 87–89 %

HLB (hydrofilne-lipofilná rovnováha) = 18

CMC (kritická micelárna koncentrácia) = N/A

Poloxamer 407, Pluronic® F-127

$M_n = 12\,600$ g/mol

HLB = 18-23

CMC = ~ 3.97 mM (19,5°C)

Tween 20

$M_n = 1\,227,54$ g/mol

HLB = 16,7

CMC = ~ 0,06 mM

Cetrimid-bromid

$M_n = 364,45$ g/mol

HLB = 10

CMC = 0,92 – 1,0 mM (20-25°C)

SPAN 60

$M_n = 430,62$ g/mol

HLB = 5+/-1

CMC = 0,02 mM

Tieto stabilizátory boli používané pri príprave nanočastíc.

5.6 Použité prístroje

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

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

Magnetická miešačka IKA-WERKE RT 5 power, (IKA, Staufen, Nemecko)

Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Spojené Kráľovstvo)

Centrifúga MPW 260R, (MPW Medical Instruments, Varšava, Poľsko)

Ultrazvuková sonda Mikrosplitze (Bandelin, Nemecko)

5.7 Použité metódy

5.7.1 Príprava nanočastíc

Nanočastice boli zakaždým pripravované rovnakým spôsobom a to metódou nanoprecipitácie, ktorá je teoretický popísaná v kapitole 4.3.5.2.3.

1) Príprava organickej fázy

Každá vzorka obsahovala polymér PLGA (PDLG 5002A 5:5), ktorý bol po vybratí z mrazničky najskôr zohriaty na laboratornú teplotu. Na analytických váhach sa vytáročila vialka a postupne sa do nej navážilo vždy 30 mg \pm 3 mg polyméru. Do každej vialky sa následne za pomoci automatickej pipety pridal 1 ml acetónu, ktorý slúžil ako organické rozpúšťadlo polyméru. V prípade stabilizátoru Span 60 bolo ako rozpúšťadlo potrebné použiť acetón. Span 60 sa pripravoval v koncentrácii 0,01%.

2) Príprava vodnej fázy

Počas rozpúšťania polyméru sa do kadičiek pripravilo vždy 10 ml roztoku cholátu sodného vo vode, ktoré boli pripravované navážením cholátu sodného a jeho následným rozpúšťaním v čistenej vode. Roztoky mali rôznu koncentráciu: 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%, 2% a 5%. Takto pripravené roztoky sa prostredníctvom miešadla nechali miešať na magnetickej miešačke.

3) Vznik nanočastíc

Po rozpustení polyméru v acetóne bol za pomoci mikropipety nabratý 1 ml a ten bol prevedený do roztoku cholátu za vzniku polymérnych nanočastíc. Približne po dobu 60

minút sa použitý acetón nechal odparovať v digestore za stáleho miešania (300 rpm (otáčky za minútu)) na magnetickej miešačke.

Postupne boli roztoky cholátu pripravované s prídavkami stabilizátorov. Použité boli, cetrimid-bromid, Span 60, Tween 20 a Pluronic F-127. K pripravovaným roztokom cholátu sodného vo vode o rôznych koncentráciach bolo za každým navážených 10 mg stabilizátorov PVA, cetrimid-bromidu, Tweenu 20 a Pluronicu F-127. Na rozpustenie PVA bol ako kosolvent použitý acetón. Výsledná koncentrácia stabilizátoru tak činila 0,1%. V prípade stabilizátoru Span 60 bola koncentrácia 0,01% a rozpustený bol v organickej fáze.

5.8 Meranie parametrov nanočastíc

Priemerná veľkosť vzniknutých nanočastíc bola meraná prostredníctvom prístroja Zetasizer (Malvern) pri teplote 25°C. Okrem toho boli zaznamenávané PDI a zeta potenciál.

1) Veľkosť častíc a PDI

400 µl vytvorenej nanosuspenzie sa previedlo do plastovej kyvety o objeme 2,5 ml. Na riedenie bol použitý 1 ml čistenej vody, pričom v kyvete sa nemohla vyskytovať žiadna bublina. Následne bola veľkosť častíc a PDI meraná pomocou dynamického rozptylu svetla (teoreticky popísaný v rámci kapitoly 4.6.1.1).

2) Zeta potenciál

V prípade merania zeta potenciálu boli použité plastové kyvety obsahujúce kapiláru a dve elektródy. Prevedenie nanosuspenzie do špeciálnej kyvety (typ DTS1060) tak, aby nevznikali bubliny, vyžadovalo použitie injekčnej striekačky. Potenciál bol meraný metódou elektroforetického rozptylu svetla (teoreticky popísaný v rámci kapitoly 4.6.2.2.).

6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto kapitole sú popísané a diskutované výsledky týkajúce sa veľkosti vzniknutých nanočastíc, ktoré boli pripravené pomocou metódy nanoprecipitácie. Cieľom bolo zistiť, do akej miery ovplyvňuje prítomnosť cholátu sodného a ďalších použitých stabilizátorov veľkosť pripravovaných častíc. Okrem veľkosti sú porovnávané aj PDI a zeta potenciál.

6.1 Veľkosť častíc

Cieľom prípravy nanočastíc bolo pripraviť častice vo veľkostnom intervale 10 – 200 nm. Práve tento interval sa totiž ukázal ako najviac relevantný pre cieľnú distribúciu liečiv z fyzikálneho a biochemického hľadiska. (50)

Bolo totiž pozorované, že niektoré vybrané faktory ako sú napríklad koncentrácia polyméru, voľba organického rozpúšťadla, iónová sila vodnej fázy, teplota, rýchlosť vstrekovania organickej fázy alebo rýchlosť agitácie vodnej fázy majú vplyv na výslednú veľkosť nanočastíc a to najmä kvôli difúznemu koeficientu rozpúšťadla vo vode D_{pw} za prítomnosti polyméru. (16)

Častice pripravené metódou nanoprecipitácie dosahovali požadovanú veľkosť takmer vo všetkých prípadoch. Výnimkou boli vzorky pripravené za použitia stabilizátoru cetrimid-bromidu a tiež Spanu 60, kedy pri najnižších koncentráciách cholátu dosahovali aj hodnoty vyššie ako 200 nm.

6.2 Index polydisperzity

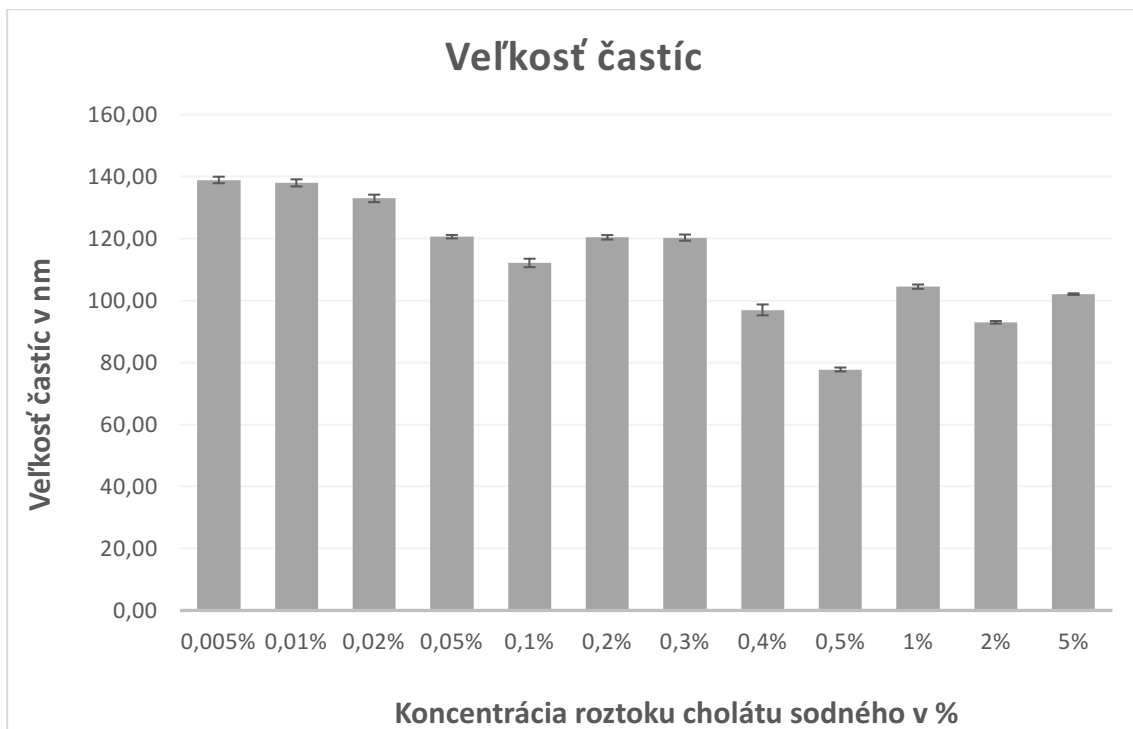
Polydisperzita vyjadruje stupeň nejednotného veľkostného rozloženia častíc. Index polydisperzity, niekedy označovaný aj ako index heterogenity, je bezrozmerný a je označovaný ako PDI. (51) Vzorka je charakterizovaná ako monodisperzia v tom prípade, kedy je hodnota PDI menšia než 0,2. (44)

Vzorky s hodnotami PDI menšími, respektíve rovnými 0,2 sa podarilo pripraviť za pomoci všetkých skúmaných stabilizátorov.

6.2.1 Cholát sodný

Tabuľka č. 1 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách

| Koncentrácia | Veľkosť častíc v nm | PDI |
|--------------|---------------------|------|
| 0,005% | 138,95 | 0,10 |
| 0,01% | 138,00 | 0,08 |
| 0,02% | 133,00 | 0,10 |
| 0,05% | 120,63 | 0,10 |
| 0,1% | 112,17 | 0,13 |
| 0,2% | 120,43 | 0,11 |
| 0,3% | 120,33 | 0,09 |
| 0,4% | 97,00 | 0,15 |
| 0,5% | 77,79 | 0,16 |
| 1% | 104,50 | 0,12 |
| 2% | 93,00 | 0,14 |
| 5% | 102,10 | 0,14 |



Obrázok č. 19 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného

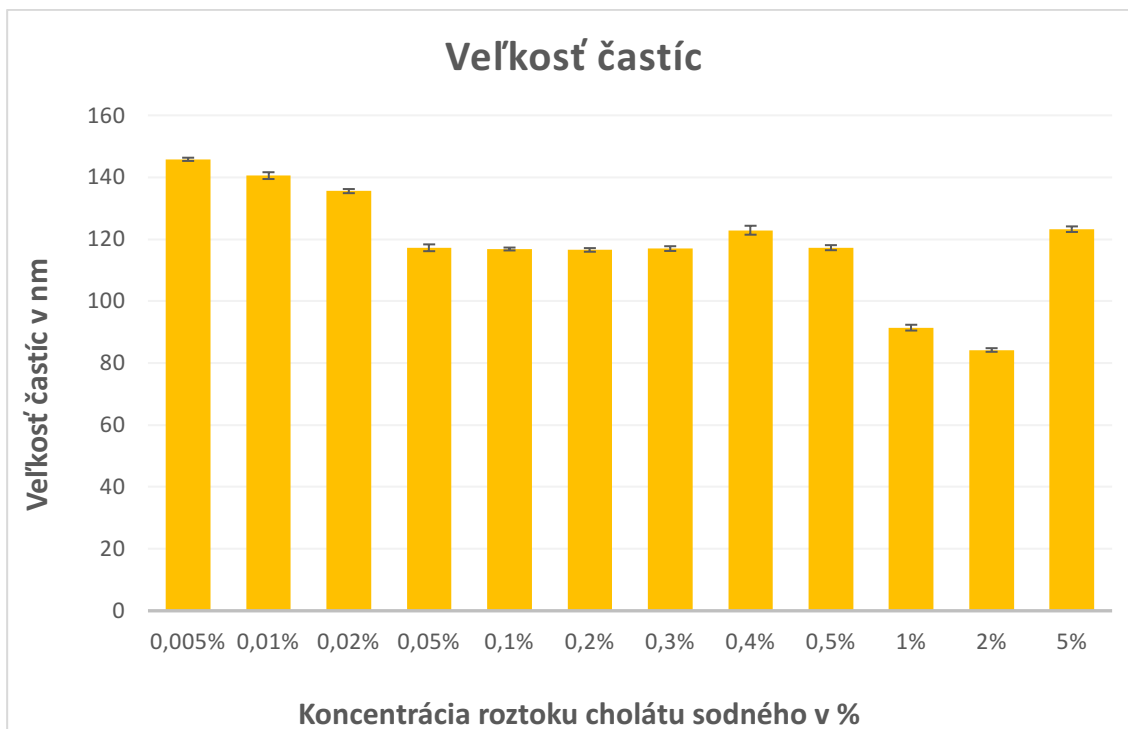
V prípade roztoku cholátu sodného vo vode dosahovali nanočastice najvyššiu hodnotu veľkosti pri koncentrácii 0,005% a to 138,95 nm. Je teda zrejmé, že výsledná veľkosť vzniknutých nanočastíc klesá so zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu až do koncentrácie 0,5%, pri ktorej je veľkosť 77,79 nm. Od hodnoty 1% však veľkosť nanočastíc opäť stúpa a pri koncentrácii 5% dosahujú nanočastice veľkosť 102,10 nm. To je možné vysvetliť prekročením CMC cholátu sodného, kedy došlo k tvorbe micel, čomu odpovedajú aj vyššie hodnoty polydisperzity pri týchto koncentráciách.

Priemerná polydisperzita činila 0,12.

6.2.2 Cholát sodný + 0,1% Pluronic F-127

Tabuľka č. 2 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom Pluronicu F-127 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách

| Koncentrácia | Veľkosť častíc v nm | PDI |
|--------------|---------------------|------|
| 0,005% | 145,80 | 0,12 |
| 0,01% | 140,53 | 0,08 |
| 0,02% | 135,53 | 0,09 |
| 0,05% | 117,23 | 0,09 |
| 0,1% | 116,83 | 0,11 |
| 0,2% | 116,53 | 0,11 |
| 0,3% | 116,97 | 0,10 |
| 0,4% | 122,90 | 0,10 |
| 0,5% | 117,27 | 0,09 |
| 1% | 91,44 | 0,11 |
| 2% | 84,22 | 0,16 |
| 5% | 123,23 | 0,14 |



Obrázok č. 20 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Pluronicu F-127 0,1%

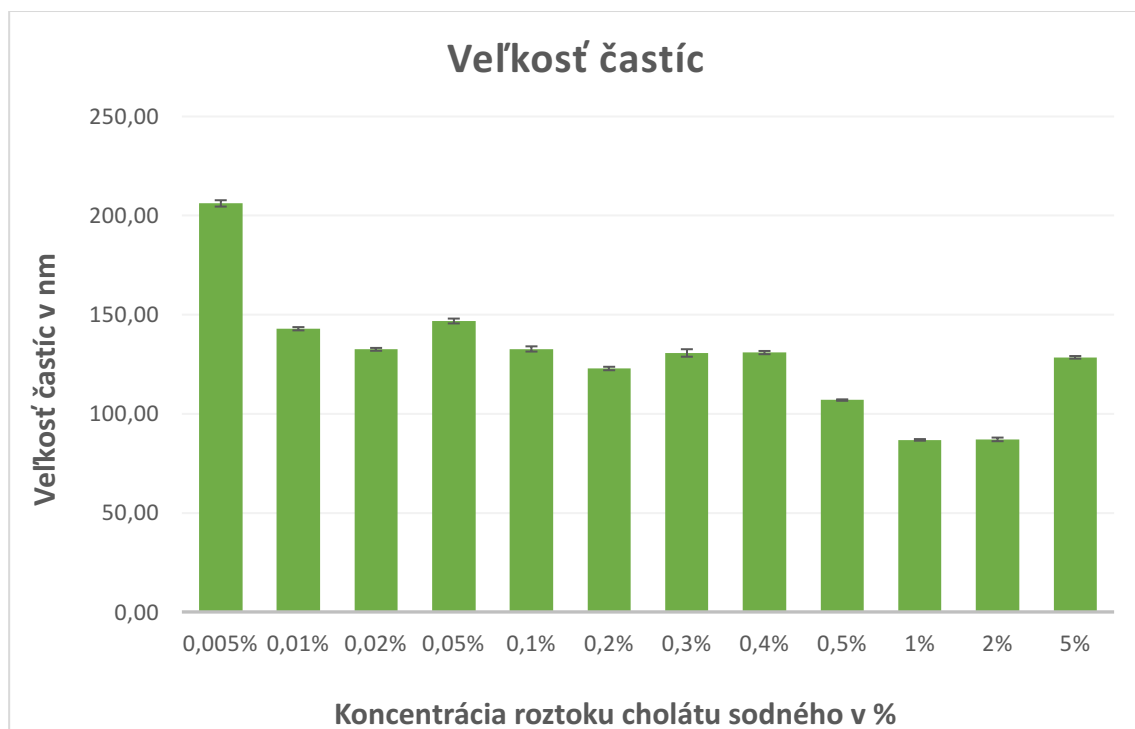
Veľkosť nanočastíc pri súčasnom použití Pluronicu F-127 dosahovala najvyššiu hodnotu opäť pri koncentrácii cholátu 0,005%. Táto hodnota predstavovala 145,80 nm. Bez použitia Pluronicu bola výsledná veľkosť pri tejto koncentrácii 138,95 nm. Častice pripravené s prídavkom Pluronicu s najmenšou veľkosťou však vznikli pri koncentrácii 2% a dosahovali 84,22 nm. V porovnaní so samotným cholátom, kedy najmenšie častice vznikli pri koncentrácii 0,5% (77,79 nm) je veľkosť vzniknutých nanočastíc o niečo vyššia, nepredstavuje to však významný rozdiel. Pri koncentrácii 5% bola výsledná veľkosť opäť vyššia, konkrétne 123,23 nm, zatiaľ čo samotný cholát spôsobil pri rovnakej koncentrácii vznik častíc o veľkosti 102,10 nm.

Priemerná polydisperzita bola v tomto prípade 0,11, hodnota je teda porovnateľná s hodnotou PDI roztoku cholátu sodného (0,12) bez použitia Pluronicu.

6.2.3 Cholát sodný + 0,1% Tween 20

Tabuľka č. 3 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom Tweenu 20 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách

| Koncentrácia | Veľkosť častíc v nm | PDI |
|--------------|---------------------|------|
| 0,005% | 206,13 | 0,29 |
| 0,01% | 142,90 | 0,10 |
| 0,02% | 132,50 | 0,09 |
| 0,05% | 146,80 | 0,16 |
| 0,1% | 132,70 | 0,17 |
| 0,2% | 122,83 | 0,10 |
| 0,3% | 130,67 | 0,11 |
| 0,4% | 130,87 | 0,11 |
| 0,5% | 106,90 | 0,13 |
| 1% | 86,81 | 0,15 |
| 2% | 87,06 | 0,18 |
| 5% | 128,47 | 0,18 |



Obrázok č. 21 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Tweenu 20 0,1%

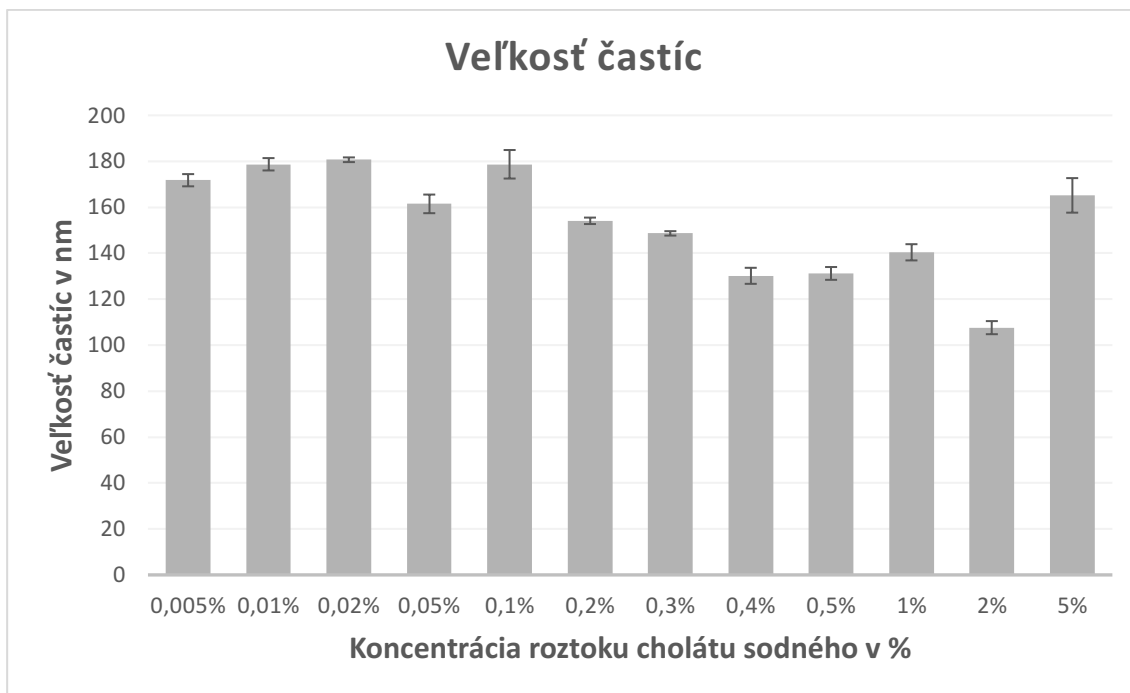
Častice pripravené za súčasného použitia stabilizátoru Tween 20 boli najväčšie pri koncentrácii 0,005% a dosahovali priemernú veľkosť 206,13 nm. Najmenšia veľkosť bola nameraná pri koncentrácii 1% a predstavovala 86,81 nm. Veľmi podobnú veľkosť (87,06 nm) vykazovali aj častice pri koncentrácii 2%. Oproti samotnému cholátu vznikli pri súčasnom použití 0,1% Tweenu častice o niečo väčšie (pri koncentrácii cholátu 0,005% 138,95 nm, pri 0,5% 77,79 nm). Následne veľkosť častíc opäť stúpala až k priemernej hodnote 128,47 nm pri koncentrácii 5%, kedy pravdepodobne opäť došlo k prekročeniu CMC cholátu sodného.

Priemerná polydisperzita činila 0,18, zatiaľ čo hodnota PDI v roztoku cholátu bola 0,11.

6.2.4 Cholát sodný + 0,1% PVA

Tabuľka č. 4 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom PVA 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách

| Koncentrácia | Veľkosť častíc v nm | PDI |
|--------------|---------------------|------|
| 0,005% | 171,77 | 0,06 |
| 0,01% | 178,70 | 0,06 |
| 0,02% | 180,67 | 0,06 |
| 0,05% | 161,47 | 0,06 |
| 0,1% | 178,70 | 0,12 |
| 0,2% | 154,10 | 0,07 |
| 0,3% | 148,63 | 0,08 |
| 0,4% | 130,17 | 0,07 |
| 0,5% | 131,20 | 0,10 |
| 1% | 140,40 | 0,11 |
| 2% | 107,60 | 0,14 |
| 5% | 165,17 | 0,12 |



Obrázok č. 22 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti PVA 0,1%

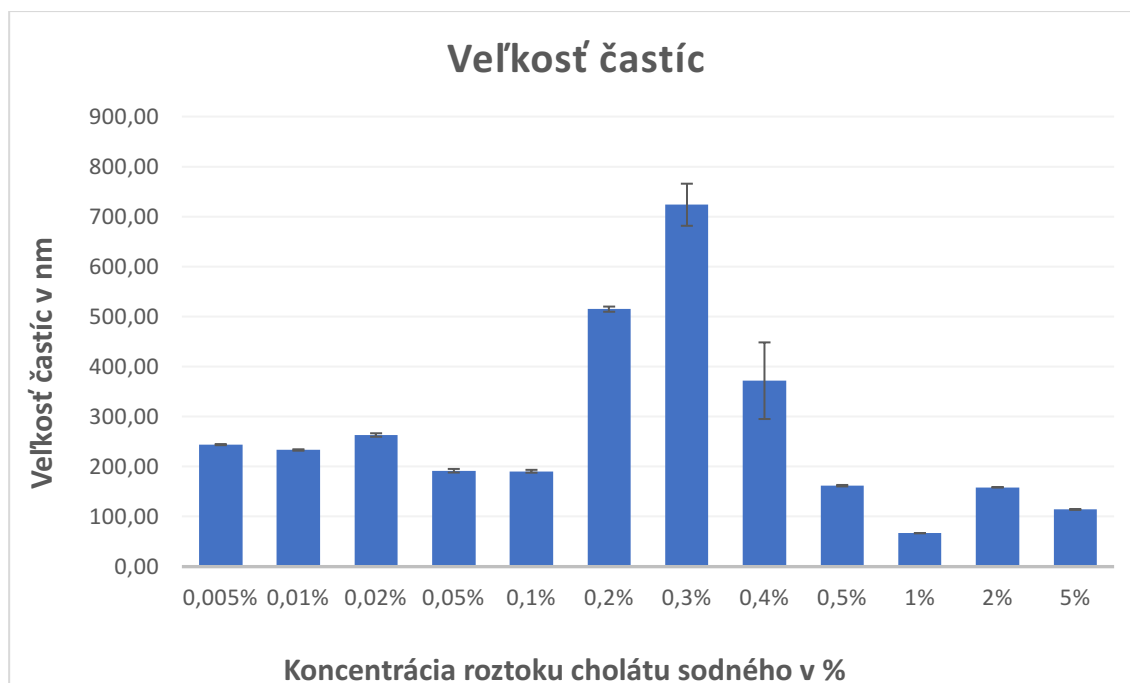
Pri použití PVA ako stabilizátora veľkosť vzniknutých nanočastíc mierne kolísala. V tomto prípade dosahovali častice najväčšiu hodnotu veľkosti, teda 180,67 nm, až pri koncentrácii 0,02%. Najmenšie častice s veľkosťou 107,60 nm vznikli pri koncentrácii 2%. Pri použití PVA ako stabilizátora je možné pozorovať nárast veľkosti výsledných častíc oproti kombinácii s ostatnými neionickými stabilizátormi. To je dané pravdepodobne vyššou molárnou hmotnosťou PVA, ktorá je cca 50 000 g/mol.

Priemerná polydisperzita bola 0,09, čo predstavuje veľmi málo polydisperznú vzorku.

6.2.5 Cholát sodný + 0,1% Cetrimid-bromid

Tabuľka č. 5 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom Cetrimid-bromidu 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách

| Koncentrácia | Veľkosť častíc v nm | PDI |
|--------------|---------------------|------|
| 0,005% | 244,00 | 0,20 |
| 0,01% | 233,27 | 0,18 |
| 0,02% | 263,23 | 0,23 |
| 0,05% | 191,83 | 0,10 |
| 0,1% | 190,77 | 0,16 |
| 0,2% | 514,90 | 0,25 |
| 0,3% | 723,67 | 0,34 |
| 0,4% | 371,80 | 0,26 |
| 0,5% | 161,90 | 0,14 |
| 1% | 66,96 | 0,16 |
| 2% | 158,73 | 0,21 |
| 5% | 114,40 | 0,18 |



Obrázok č. 23 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Cetrimid-bromidu 0,1%

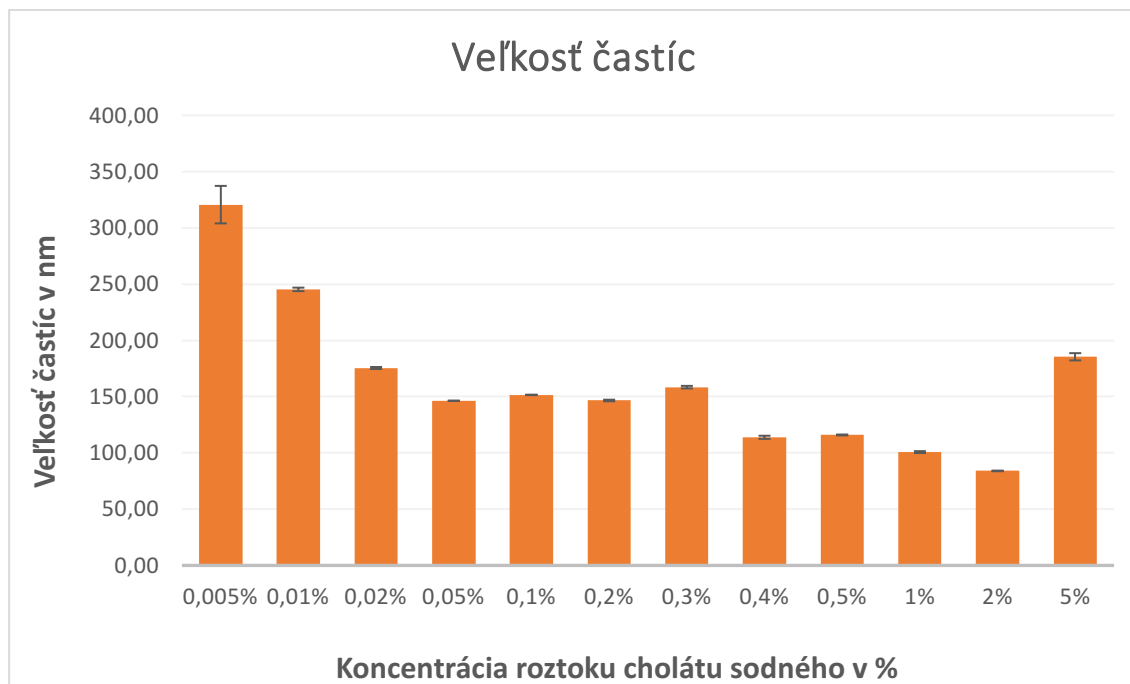
Použitie cetrimid-bromidu spôsobilo vznik nanočastíc s pomerne vysokou hodnotou polydispezity a vysokými hodnotami veľkostí častíc. Častice dosahovali v tomto prípade až 723,67 nm pri koncentrácii 0,4% a PDI 0,34. Je teda možné predpokladať, že počas prípravy došlo k agregácii nanočastíc do väčších zhlukov. Najnižšia veľkosť bola v tomto prípade nameraná pri koncentrácii 1% a predstavovala 66,96 nm. Je možné to vysvetliť tým, že cetrimid a cholát majú opačné náboje a to spôsobí, že sa v roztoku budú vzájomne neutralizovať. V prípade, že je ich tam približne ekvimolárne množstvo, dôjde k vyviazaniu a častice ostanú bez naviazaného stabilizátora, čo sa prejaví vysokou hodnotou polydisperzity a vysokými hodnotami veľkosti častíc. Pri dosiahnutí približne ekvimolárneho množstva cholátu a cetrimid-bromidu totiž nastane tzv. ion-pairing, kedy pri koncentrácii cholátu 0,1% bude látkové množstvo cholátu sodného a cetrimid-bromidu v pomere 1 : 1,18; pri koncentrácii cholátu 0,2%, 0,3% a 0,4% bude pomer látkového množstva cholátu a cetrimidu 2 : 1,18; 3 : 1,18 a 4 : 1,18. Je možné predpokladať, že cholátu je potrebné 4-krát väčšie množstvo ako cetrimid-bromidu, aby došlo k preváženiu záporného náboja a cholát tak dokázal znovu stabilizovať častice.

Priemerná polydiperzita bola 0,20.

6.2.6 Cholát sodný + 0,01% SP 60

Tabuľka č. 6 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom SPAN 60 0,01%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách

| Koncentrácia | Veľkosť častíc v nm | PDI |
|--------------|---------------------|------|
| 0,005% | 320,63 | 0,29 |
| 0,01% | 245,33 | 0,26 |
| 0,02% | 175,47 | 0,07 |
| 0,05% | 146,33 | 0,09 |
| 0,1% | 151,57 | 0,12 |
| 0,2% | 146,60 | 0,11 |
| 0,3% | 158,43 | 0,26 |
| 0,4% | 113,87 | 0,17 |
| 0,5% | 115,97 | 0,15 |
| 1% | 100,73 | 0,17 |
| 2% | 84,00 | 0,22 |
| 5% | 185,43 | 0,14 |



Obrázok č. 24 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Spanu 60 0,01%

Span 60 bol použitý v koncentrácii 0,01% (rozpuštením v organickej fáze). Tým, že je hydrofóbny (HLB = cca 5), nedifundoval do vodnej fázy a jeho koncentrácia bola najvyššia v okolí vznikajúcich častíc v organickom rozpúšťadle. Preto sa pravdepodobne zabudoval do častíc, ktoré pre neho predstavovali výhodnejšie prostredie a to ovplyvnilo výslednú veľkosť nanočastíc k vyšším hodnotám. Span 60 bol totiž druhým stabilizátorom, ktorý zapríčinil vznik nanočastíc s veľkosťou väčšou ako 200 nm. Najvyššia hodnota, 320,63 nm, bola nameraná pri koncentrácii 0,005%. Keďže PDI predstavoval v tomto prípade 0,29, môžeme predpokladať, že kvôli hydrofóbnej povahe Spanu došlo k jeho zabudovaniu do častíc a to spôsobilo ich nárast. Rovnako je to pri koncentrácii 0,01%, kedy častice dosiahli veľkosť 245,33 nm a PDI činil 0,26 a pri koncentrácii 0,3%, kedy bol PDI znovu na hodnote 0,26 (v tomto prípade však častice dosiahli veľkosť 158,43 nm). Pri koncentrácii 0,2% boli namerané častice o veľkosti 84,00 nm.

Priemerná polydisperzita bola 0,17. Častice teda môžeme považovať za monodisperzné.

Čo sa týka požadovanej veľkosti pripravovaných nanočastíc, je možné skonštatovať, že najmenej vhodným stabilizátorom je cetrimid-bromid. Pri použití zvyšných stabilizátorov je zjavná závislosť medzi koncentráciou roztoku cholátu sodného a výslednou veľkosťou častíc. Veľkosť nanočastíc sa postupne znižuje so zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu sodného až do hodnoty približne 1% - 2%, od ktorej sa naopak hodnoty veľkosti znovu začínajú zvyšovať, čo môžeme vysvetliť niekoľko rádovým prekročením CMC cholátu sodného. Je potrebné brať do úvahy aj skutočnosť, že CMC povrchovo aktívnych látok

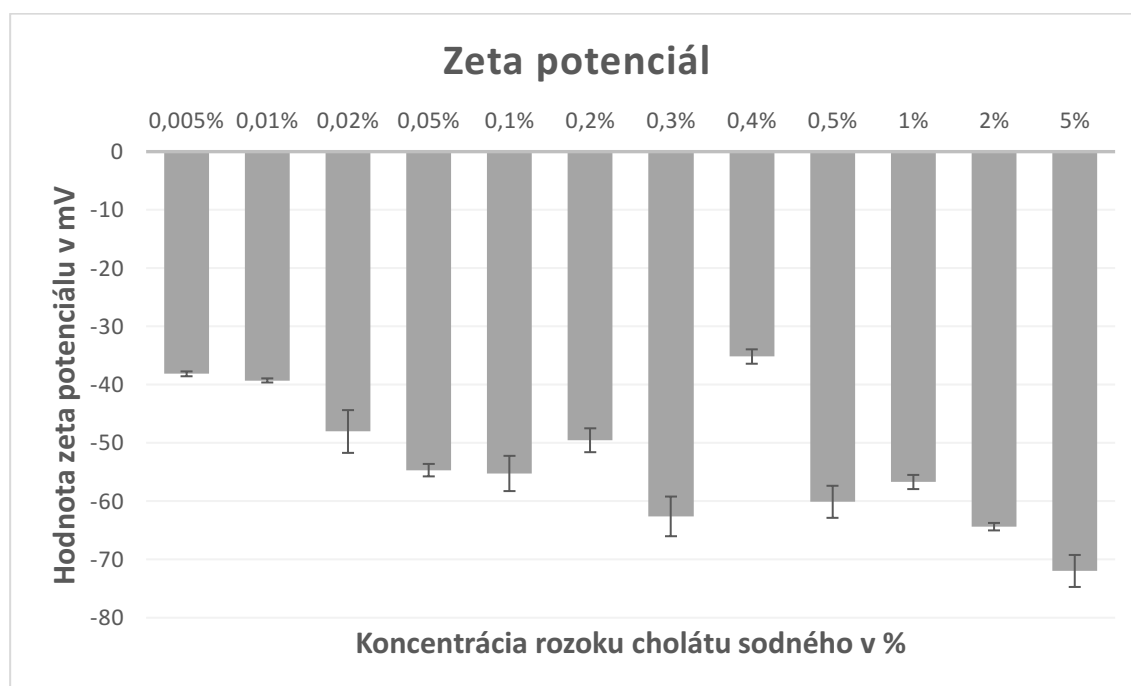
meraná vo vode nie je príliš relevantná pre nanonosičové systémy, kedy je v sústave prítomná príliš veľká plocha fázového rozhrania s/l, ktorú predstavuje povrch častíc. Je preto pravdepodobné, že v danej sústave budú molekuly surfaktantu viazané preferenčne na povrch častíc a koncentrácia surfaktantu vo vodnej fáze bude reálne nižšia, než aká bola v čase prípravy

Index polydiperzity bol taktiež najmenej vyhovujúci pri použití 0,1% cetrimid-bromidu v roztoku cholátu sodného vo vode, čo značí vyššiu agregáciu vznikajúcich nanočastíc za tvorby zhlukov, zrejme kvôli vyviazaniu stabilizátora v dôsledku rozdielného náboja v porovnaní s cholátom.

6.3 Zeta potenciál

Zeta potenciál určuje stabilitu disperzie. Disperzia častíc je považovaná za elektrostaticky stabilnú vtedy, keď absolútna hodnota zeta potenciálu je vyššia ako 30 mV.

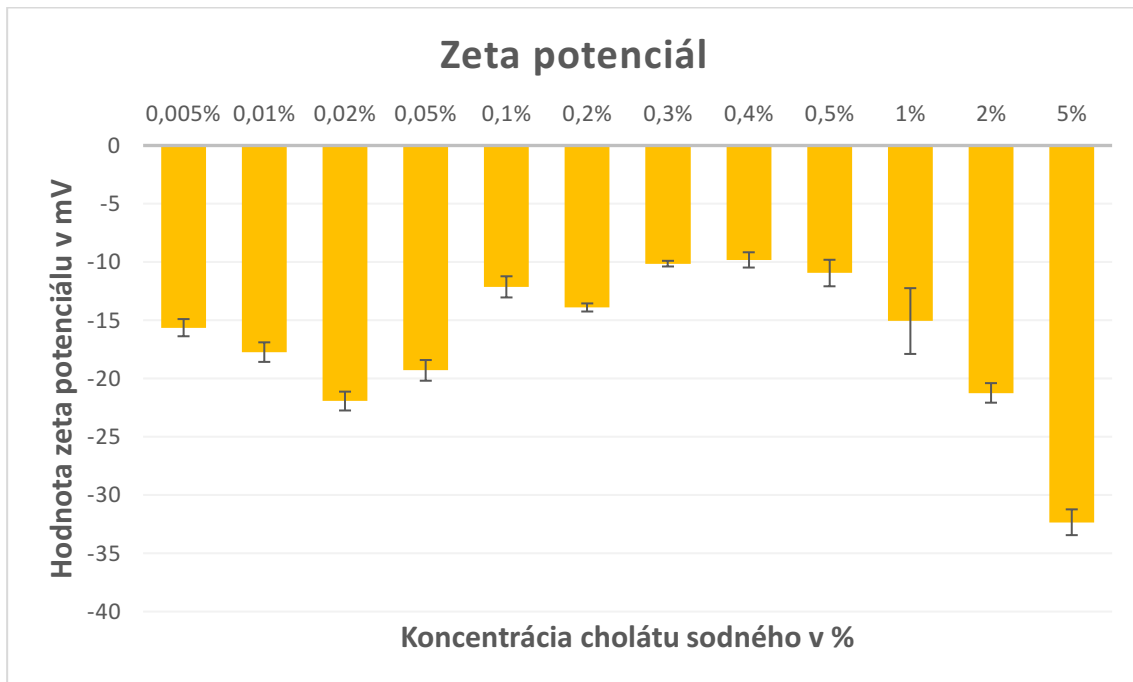
6.3.1 Cholát sodný



Obrázok č. 25 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného

Hodnoty zeta potenciálu pri použití cholátu sodného pri všetkých koncentráciách presiahli -30 mV. Je možné predpokladať, že vzniknuté častice disponujú dostatočnou elektrostatickou stabilitou.

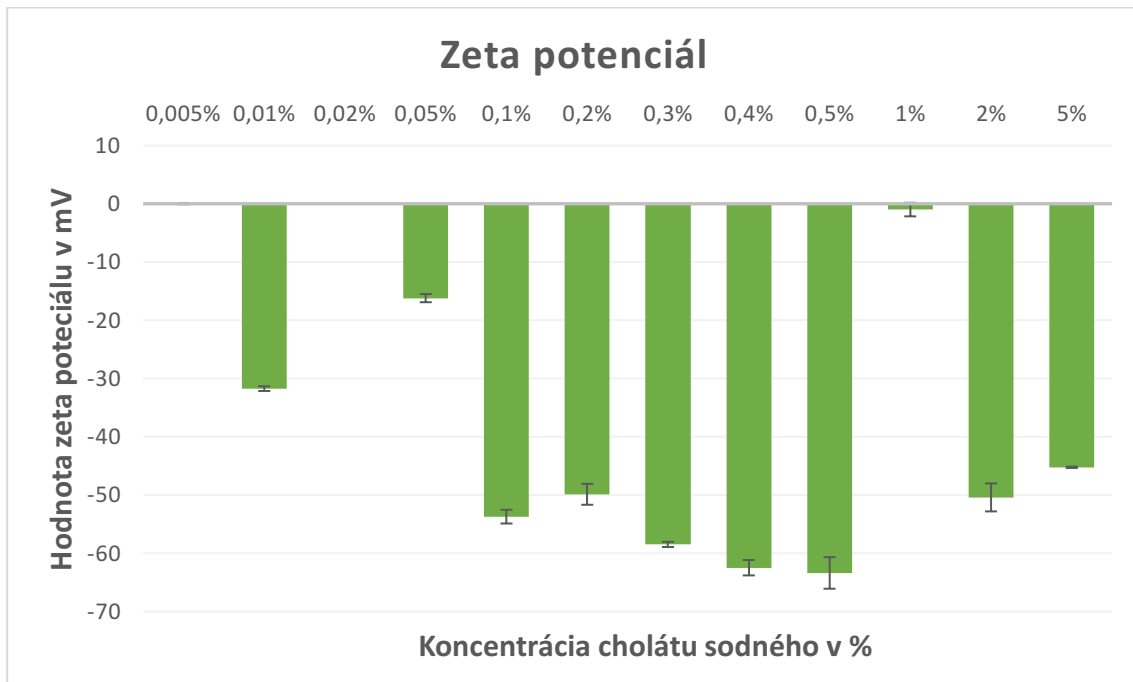
6.3.2 Cholát sodný + Pluronic F-127 0,1%



Obrázok č. 26 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Pluronicu F-127 0,1%

Pri súčasnom použití surfaktantu Pluronic F-127 je možné sledovať, že hodnoty zeta potenciálu sa posúvajú smerom k neutrálnym hodnotám pri zvyšujúcej sa koncentrácii cholátu až do koncentrácie 0,4%. V porovnaní s časticami pri použití cholátu bez prídavku Pluronicu vykazujú častice v tomto prípade hodnoty zeta potenciálu nižšie, čo môže byť spôsobené maskovaním zeta potenciálu. Dochádza tu totiž k naviazaniu surfaktantu na povrch nanočastíc, čo spôsobí tvorbu ochrannej hydrofilnej korony na ich povrchu a to zároveň zabezpečí, že častice sú menej nápadné pre MPS. (52) Jediná koncentrácia cholátu v prítomnosti Pluronicu, pri ktorej hodnota zeta potenciálu prekročila -30 mV, je 5%.

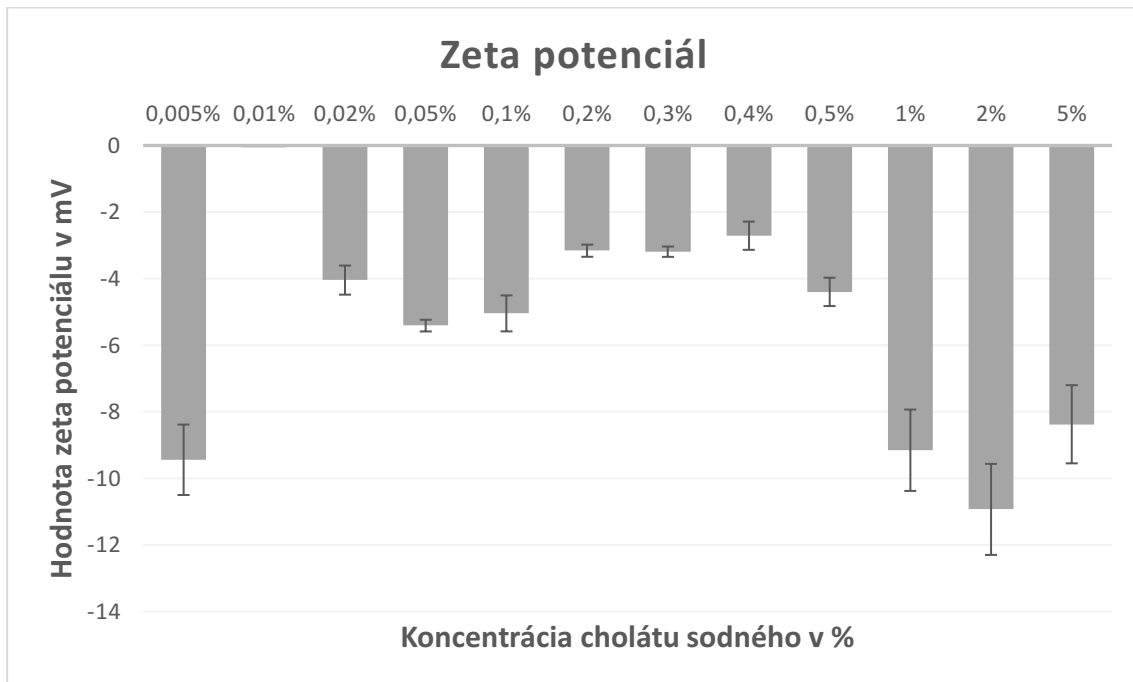
6.3.3 Cholát sodný + Tween 20 0,1%



Obrázok č. 27 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Tweenu 20 0,1%

Nanočastice pripravené s prídavkom Tweenu 20 dosahovali takmer pri každej koncentrácii cholátu hodnotu zeta potenciálu nižšiu ako -30 mV. Výnimku tvoria častice pripravené pri koncentrácii 0,05%. Hodnoty sa však nepodarilo stanoviť pri koncentrácii 0,005%, 0,02% a 1% z dôvodu znehodnotenia pripravených vzoriek. Z výsledkov je však zrejmé, že polysorbát 20 nemá schopnosť maskovať povrchový náboj častíc, ktoré stabilizuje. Dôvodom je jeho menšia veľkosť a kratšie PEG reťazce.

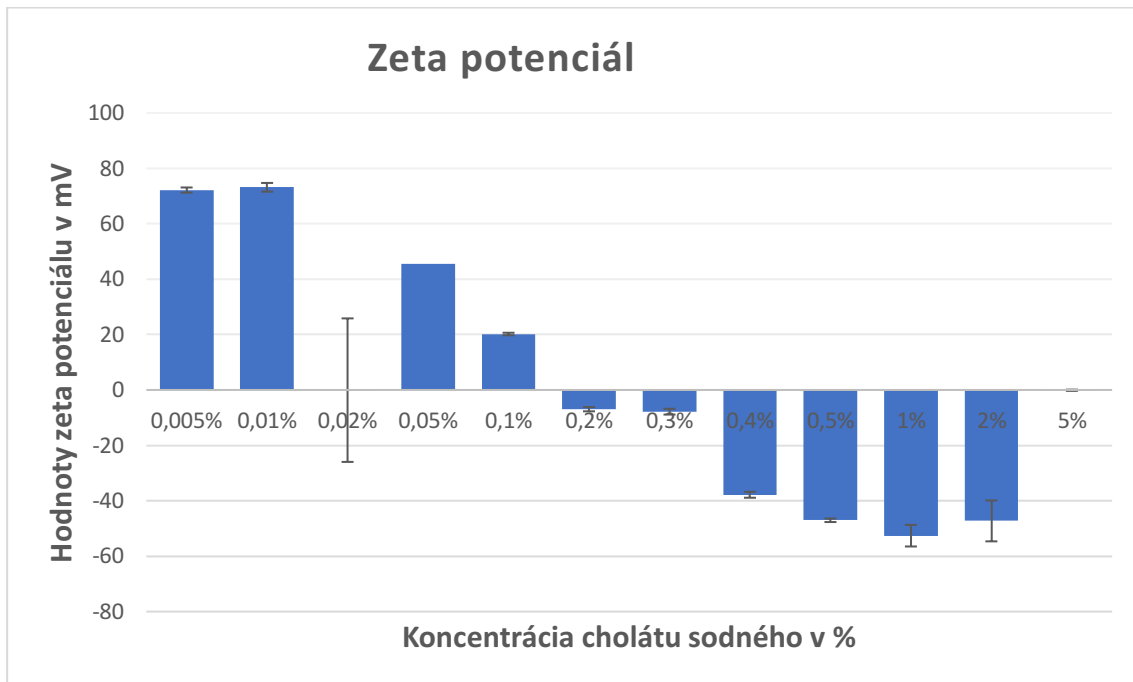
6.3.4 Cholát sodný + PVA 0,1%



Obrázok č. 28 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti PVA 0,1%

PVA ako neiónový stabilizátor spôsobil, že hodnoty zeta potenciálu pripravených nanočastíc sa postupne približovali k neutrálnym hodnotám znova do koncentrácie cholátu 0,4%. Je možné opäť predpokladať, že je to spôsobené maskovaním zeta potenciálu kvôli vytvoreniu hydrofilnej vrstvy na povrchu nanočastíc a teda takto pripravené častice nie je možné automaticky jednoznačne považovať za nestabilné. Naopak, molekuly PVA na povrchu častíc budú pôsobiť ako veľmi efektívny sterickej stabilizátor. Hodnotu pri koncentrácii cholátu 0,01% sa nepodarilo zistiť kvôli znehodnoteniu vzorku. PVA ako stabilizátor má vplyv na výsledné hodnoty zeta potenciálu. Dochádza k jeho významnému zníženiu.

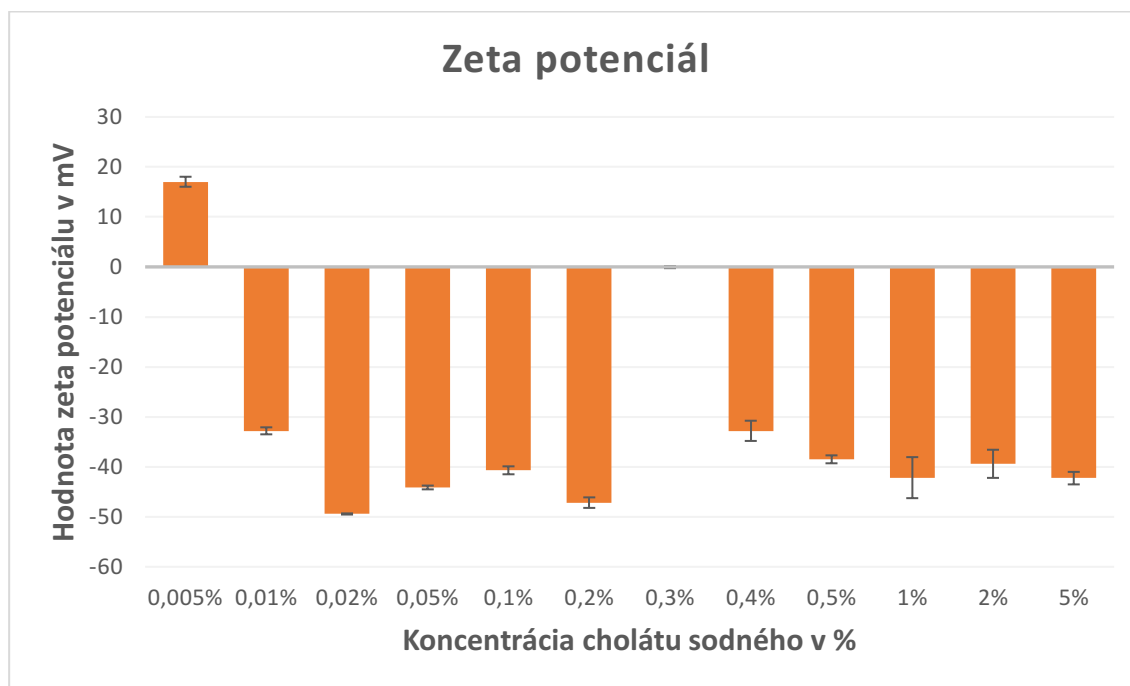
6.3.5 Cholát sodný + Cetrimid-bromid 0,1%



Obrázok č. 29 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Cetrimid-bromidu 0,1%

Cetrimid-bromid je kationický surfaktant, zatiaľ čo častice pripravené za použitia cholátu nesú záporný náboj. Pri nízkych koncentráciách cholátu má zeta potenciál kladné hodnoty, ktoré dosahujú približne 70 mV. Pri zvyšujúcej sa koncentrácii cholátu postupne dochádza k vyrovnaní kladného náboja surfaktantu až k neutrálnym hodnotám zeta potenciálu z dôvodu dosiahnutia približne ekvimolárneho množstva oboch látok. Následne pri prevahe cholátu dochádza znovu k zvyšovaniu stability disperzie a hodnoty zeta potenciálu sú nižšie ako -30 mV. Hodnoty pri koncentrácii 0,02% a 5% sa nepodarilo stanoviť. Môžeme skonštatovať, že prítomnosť surfaktantu má priamy vplyv na hodnoty zeta potenciálu.

6.3.6 Cholát sodný + Span 60 0,01%



Obrázok č. 30 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Spanu 60 0,01%

Pri použití stabilizátora Span 60 boli takmer všetky hodnoty zeta potenciálu nižšie ako -30 mV. Disperziu nanočastíc je možné považovať za stabilnú. Hodnotu sa nepodarilo stanoviť pri koncentrácii 0,3% kvôli znehodnoteniu vzorky.

Surfaktanty, ktoré boli použité pre stabilizáciu častíc v tejto práci je možné rozdeliť do niekoľkých skupín. Cholát sodný je typická malá molekula s povrchovou aktivitou, PVA a Pluronic F-127 sú neionogénne polymérne látky, ktorých molekulová hmotnosť je vyššia ako 10 000 g/mol. Span 60 a Tween 20 sú deriváty parciálnych esterov sorbitanu. Ich molekulová hmotnosť je rádovo nižšia v porovnaní s obidvomi vyššie zmiernenými polymérmi. Cetrimid je kationický stabilizátor s relatívne nízkou molekulovou hmotnosťou.

Z výsledkov je zrejma závislosť medzi molekulovou hmotnosťou a schopnosťou maskovať povrchový náboj. Pri použití PVA a poloxaméru došlo k významnému zníženiu zeta potenciálu, v prípade použitia cholátu sodného s prídavkom PVA až na hodnotu -10 mV. Na druhej strane, zeta potenciál častíc pripravených iba za použitia cholátu dosahoval hodnoty až -70 mV. Podstatne menšie molekuly Span 60 a Tween 20 preukázali výrazne nižšiu schopnosť ovplyvňovať zeta potenciál. V prípade kationického cetrimidu dochádzalo k zvratu zeta potenciálu do kladných hodnôt pri vyššej koncentrácii cetrimidu v porovnaní s koncentráciou cholátu. Opačne nabité molekuly

cholátu a cetrimidu sú totiž v oblasti približne ekvimolárnych koncentrácií schopné sa navzájom elektrostaticky neutralizovať a ich protektívny efekt na stabilitu nanosuspenzie je v tejto koncentračnej oblasti zanedbateľný.

7 ZÁVER

1. Porovnávaných bolo celkom 5 stabilizátorov s cieľom upresniť ich vplyv na veľkosť pripravovaných nanočastíc v prítomnosti cholátu sodného. Išlo o Pluronic F-127, Tween 20, PVA, Cetrimid-bromid a Span 60.
2. Častice boli pripravované za použitia PLGA pri koncentráciách cholátu sodného 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%, 2%, 5% s prídavkom stabilizátorov. Bolo preukázané, že cholát sodný je schopný regulovať výslednú veľkosť vzniknutých nanočastíc či už samostatne, alebo aj v prítomnosti stabilizátorov. Za použitia cholátu sodného pri príprave nanočastíc je možné získať najnižšie hodnoty veľkosti častíc pri koncentrácii 1% - 2%, následne veľkosť opäť stúpa.
3. Ako najmenej vhodný tenzid sa javí kationický cetrimid-bromid. Kvôli opačnému náboju v porovnaní s cholátom totiž dochádzalo k tzv. ion-pairingu, kedy pri dosiahnutí ekvimolárneho množstva obidvoch látok v disperzii došlo k vyviazaniu častíc a tie následne ostali bez stabilizátora, čo sa prejavilo na veľkosti aj polydisperzite.
4. Sú potrebné ďalšie experimenty.

8 POUŽITÉ SKRATKY

| | |
|-----------|--|
| CMC | kritická micelárna koncentrácia |
| CTAB | cetyltrimethylamonium bromid, cetrimid bromid |
| DLS | dynamický rozptyl svetla (<i>Dynamic Light Scattering</i>) |
| EPR efekt | efekt zvýšenej priepustnosti a retencie (<i>Enhanced permeability and retention effect</i>) |
| GA | kyselina glykolová |
| GSH/GST | glutathion/glutathion-S-transferáza |
| HLB | hydrofilne-lipofilná rovnováha |
| LA | kyselina mliečna |
| MDLS | dynamický rozptyl svetla z viacerých uhlov (<i>Multi – angle dynamic light scattering</i>) |
| Mn | číselný priemer molekulovej hmotnosti |
| MPS | mononukleárny fagocytický systém (<i>Mononuclear phagocytic system</i>) |
| Mr | relatívna molekulová hmotnosť |
| Mw | hmotnostný priemer |
| PCL | polykaprolaktón |
| PCS | fotonová korelačná spektroskopia (<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>) |
| PDI | index polydisperzity |
| PEG | polyethylénglykol |
| PEO | polyethylénoxid |
| PGA | polyglykolová kyselina |
| PLA | polymliečna kyselina |
| PLGA 5:5 | kyselina poly(mliečná-co-glykolová) zložená z monomérov kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej v pomere 5:5 |

| | |
|------|--|
| PLGA | kyselina poly (mliečna-co-glykolová) |
| PNP | polymérne nanočastice (<i>polymer nanoparticles</i>) |
| PPO | polypropylénoxid |
| PVA | polyvinylalkohol |
| Rpm | otáčky za minútu |
| SEM | skenovacia elektronová mikroskopia |
| SLS | statický rozptyl svetla (<i>static light scattering</i>) |
| TEM | transmisná elektronová mikroskopia |

9 ZOZNAM TABULIEK

| | |
|--|----|
| Tabuľka č. 1 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách | 34 |
| Tabuľka č. 2 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom Pluronicu F-127 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách.... | 35 |
| Tabuľka č. 3 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom Tweenu 20 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách | 37 |
| Tabuľka č. 4 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom PVA 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách..... | 38 |
| Tabuľka č. 5 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom Cetrimid-bromidu 0,1%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách | 40 |
| Tabuľka č. 6 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného vo vode s prídavkom SPAN 60 0,01%; hodnoty polydisperzity pri jednotlivých koncentráciách | 41 |

10 ZOZNAM OBRÁZKOV

| | |
|---|----|
| Obrázok č. 1 Štruktúra lipozómu (9) | 11 |
| Obrázok č. 2 Štruktúra dendriméru (9) | 12 |
| Obrázok č. 3 Štruktúra polymérnej micely (9)..... | 12 |
| Obrázok č. 4 Mikrosféra a mikrokapsula (9)..... | 13 |
| Obrázok č. 5 Štruktúra nanočastice (9) | 14 |
| Obrázok č. 6 Hydrolýza PLGA (17) | 15 |
| Obrázok č. 7 Emulzne-difúzna odparovacia metóda (25) | 17 |
| Obrázok č. 8 Metóda vysolovania (25) | 18 |
| Obrázok č. 9 Nanoprecipitácia (25) | 19 |
| Obrázok č. 10 Aktívny a pasívny targeting (29) | 20 |
| Obrázok č. 11 Štruktúra cholátu sodného (36)..... | 22 |
| Obrázok č. 12 Všeobecná štruktúra poloxaméru (37) | 23 |
| Obrázok č. 13 Štruktúra PVA | 23 |
| Obrázok č. 14 Štruktúra cetrimid-bromidu | 23 |
| Obrázok č. 15 Štruktúra sorbitan monostearátu | 24 |
| Obrázok č. 16 Štruktúra polysorbátu | 24 |
| Obrázok č. 17 Schéma dynamického rozptylu svetla (44)..... | 26 |
| Obrázok č. 18 Zeta potenciál (48) | 28 |
| Obrázok č. 19 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného | 34 |
| Obrázok č. 20 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Pluronicu F-127 0,1% | 36 |
| Obrázok č. 21 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Tweenu 20 0,1% | 37 |
| Obrázok č. 22 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti PVA 0,1% | 39 |
| Obrázok č. 23 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Cetrimid-bromidu 0,1%..... | 40 |
| Obrázok č. 24 Závislosť veľkosti častíc v nm na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Spanu 60 0,01% | 42 |
| Obrázok č. 25 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného..... | 43 |
| Obrázok č. 26 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Pluronicu F-127 0,1% | 44 |
| Obrázok č. 27 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Tweenu 20 0,1% | 45 |
| Obrázok č. 28 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti PVA 0,1% | 46 |
| Obrázok č. 29 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Cetrimid-bromidu 0,1%..... | 47 |
| Obrázok č. 30 Závislosť zeta potenciálu v mV na koncentrácii cholátu sodného v prítomnosti Spanu 60 0,01% | 48 |

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. *Development of nanotechnologies.* **Dowling, Ann P.** 2004, *Materials Today* [online], s. 30-35. ISSN 1369-7021.
2. *The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine.* **BAYDA, Samer, a iní.** 2020, *Molecules* [online]. ISSN 1420-3049.
3. *Impact of nanotechnology on drug delivery.* **FAROKHZAD, Omid C. a LANGER, Robert.** 2008, *ACS Nano* [online], s. 16-20. ISSN 1936-0851.
4. *Research and development of drug delivery systems based on drug transporter and nano-formulation.* **PENG, Yi, Lu CHEN, Sheng YE, Yu KANG, Junqing LIU, Su ZENG a Lushan YU.** 2020, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online], s. 220-236. ISSN 18180876.
5. *Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer.* **CHO, Kwangjae, a iní.** 2008, *Clinical Cancer Research* [online], s. 1310-1316. ISSN 1078-0432.
6. *Oral Modified Release Multiple-Unit Particulate Systems: Compressed Pellets, Microparticles and Nanoparticles.* **AL-HASHIMI, Nihad, a iní.** 2018, *Pharmaceutics* [online]. ISSN 1999-4923.
7. *Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy.* **FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto a PÉREZ-HERRERO, Edgar.** 2015, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online], s. 52-79. ISSN 09396411.
8. *Nanotechnologie v medicíne* [online]. **ŠRÁMEK, Jaromír.** 2009.
9. *Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications.* **BELTRÁN-GRACIA, Esteban, a iní.** 2019, *Cancer Nanotechnology* [online]. ISSN 1868-6958.
10. *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters.* **J. Prasad Rao, Kurt E. Geckeler.** 2011, *Progress in Polymer Science*, s. 887-913. ISSN 0079-6700.
11. *Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine.* **Bartneck M, Warzecha KT, Tacke F.** 2014, *Hepatobiliary Surg. Nutr.*, s. 364-376.
12. *Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery.* **MIR, Maria, Naveed AHMED a Asim ur REHMAN.** 2017, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online], s. 217-231. ISSN 09277765.
13. *Biodegradable Viral Nanoparticle/Polymer Implants Prepared via Melt-Processing.* **LEE, Parker W., Sourabh SHUKLA, Jaqueline D. WALLAT, Chaitanya DANDA, Nicole F. STEINMETZ, Joao MAIA a Jonathan K. POKORSKI.** 2017, *ACS Nano* [online], s. 8777-8789. ISSN 1936-0851.
14. *Viry jako nanotransportéry léčiv.* **DOSTÁLOVÁ Simona, et al.** 2014, *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, s. 30-33. ISSN 2336-3940.

15. *Effect of surfactant on the size and stability of PLGA nanoparticles encapsulating a protein kinase C inhibitor.* **Shkodra-Pula B, GruneC, Traeger A, Vollrath A, Schubert S, Fischer D, Schubert US.** 2019, *Int J Pharm*, s. 756-764.
16. *Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation.* **HUANG, Wei a Chenming ZHANG.** 2018, *Biotechnology Journal* [online]. ISSN 18606768.
17. *PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems.* **MIRAKABAD, TABATABAEI , a iní.** 2014, *sian Pacific Journal of Cancer Prevention* [online], s. 517-535. ISSN 1513-7368.
18. *Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories.* **XU, Yihan, KIM, Chang-Soo a SAYLOR, David M. .** 2017, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. ISSN 15524973.
19. *Surface Layer Modification of Poly(d , l -lactic- co -glycolic acid) Nanoparticles with Targeting Peptide: A Convenient Synthetic Route for Pluronic F127–Tuftsin Conjugate.* **HORVÁTI, Kata, Gergő GYULAI, Antal CSÁMPAI, János ROHONCZY, Éva KISS a Szilvia BŐSZE.** 2018, *Bioconjugate Chemistry* [online], s. 1495-1499. ISSN 1043-1802.
20. *Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate.* **LAI, Patrick, a iní.** 2014, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online], s. 154-163. ISSN 09277765.
21. *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles.* **PINTO REIS, Catarina, a iní.** 2006, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online], s. 8-21. ISSN 15499634.
22. *Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics.* **DING, Dawei a ZHU, Qingdi .** 2018, *Materials Science and Engineering: C* [online], s. 1041-1060. ISSN 09284931.
23. *Recent progress in interfacial polymerization. Materials Chemistry Frontiers* [online]. **SONG, Yongyang, WANG, Shutao a FAN, Jun-Bing .** 2017, s. 1028-1040. ISSN 2052-1537.
24. *Interfacial Polymerization: From Chemistry to Functional Materials.* **ZHANG, Feilong, FAN, Jun-bing a WANG, Shutao.** 2020, *Angewandte Chemie International Edition* [online], s. 21840-21856. ISSN 1433-7851.
25. *Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer.* **WANG, Yichao, a iní.** 2016, *Nanomaterials* [online]. ISSN 2079-4991.
26. *Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers.* **QUINTANAR-GUERRERO, David, a iní.** 2008, *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online], s. 1113-1128. ISSN 0363-9045.

27. *Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles.* **BILATI, Ugo, ALLÉMANN, Eric a DOELKER, Eric.** 2005, European Journal of Pharmaceutical Sciences [online], s. 67-75. ISSN 09280987.
28. *Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging.* **PARVEEN, Suphiya, Ranjita MISRA a Sanjeeb K. SAHOO.** 2012, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine [online], s. 147-166. 15499634.
29. *Impact of Nanotechnology on Drug Delivery.* **FAROKHZAD, Omid C. a Robert LANGER.** 2008, ACS Nano [online], s. 16-20. ISSN 1936-0851.
30. *Polymer nanoparticles for the intravenous delivery of anticancer drugs: the checkpoints on the road from the synthesis to clinical translation.* **FERRARI, R., a iní.** 2018, Nanoscale [online], s. 22701-22719. ISSN 2040-3364.
31. *Studies on stabilization mechanism and stealth effect of poloxamer 188 onto PLGA nanoparticles.* **JAIN, Darshana, a iní.** 2013, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online], s. 59-67. ISSN 09277765.
32. *Physical and chemical stability of drug nanoparticles.* **WU, Libo, ZHANG, Jian a WATANABE, Wiwik.** 2011, Advanced Drug Delivery Reviews [online], s. 456-469.
33. *Bile Salts Caught in the Act: From Emulsification to Nanostructural Reorganization of Lipid Self-Assemblies.* **SADEGHPOUR, Amin, a iní.** 2018, Langmuir [online], s. 13626-13637. ISSN 0743-7463.
34. *Sodium cholate-enhanced polymeric micelle system for tumor-targeting delivery of paclitaxel.* **ZHANG, Xiaomin, WU, Yibo a ZHANG, Min .** 2017, International Journal of Nanomedicine [online], s. 8779-8799. ISSN 1178-2013.
35. *Effect of water-soluble polymers on the state of aggregation, vesicle size, and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and sodium cholate.* **MEYUHAS, D. a LICHTENBERG, D.** 1996, Biophysical Journal [online], s. 2613-2622. ISSN 00063495.
36. *Structure of Sodium Cholate Micelles.* **MASLOVA, V.A. a KISELEV, M.A.** 2018, Crystallography Reports [online], s. 472-475. ISSN 1063-7745.
37. *Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms.* **SANTANDER-ORTEGA, M.J., a iní.** 2006, Journal of Colloid and Interface Science [online], s. 522-529. ISSN 00219797.
38. *Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles.* **MENON , Jyothi U., a iní.** 2012, Journal of Biomedical Materials Research Part A [online], s. 1998-2005. ISSN 15493296.
39. *Elaboration of Charged Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles for Effective Release of Tranexamic Acid.* **HUANG, Ming-Hsi, a iní.** 2020, Polymers [online], s. 12(4). ISSN 2073-4360.

40. *CTAB Surfactant Assisted and High pH Nano-Formulations of CuO Nanoparticles Pose Greater Cytotoxic and Genotoxic Effects*. **SINGH , Zorawar a SINGH, Iqbal** . 2019, Scientific Reports [online], s. 9(1). ISSN 2045-2322.
41. *Re-evaluation of sorbitan monostearate (E 491), sorbitan tristearate (E 492), sorbitan monolaurate (E 493), sorbitan monooleate (E 494) and sorbitan monopalmitate (E 495) when used as food additives*. **MORTENSEN, Alicja, AGUILAR, Fernando a CREBELLI, Riccardo** . 2017, EFSA Journal [online]. ISSN 18314732.
42. *Preparation and properties of vesicles (niosomes) of sorbitan monoesters (Span 20, 40, 60 and 80) and a sorbitan triester (Span 85)*. **YOSHIOKA, T., STERNBERG, B. a FLORENCE, A.** 1994, International Journal of Pharmaceutics [online], s. 1-6. ISSN 03785173.
43. *Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways*. **KERWIN, Bruce A.** 2008, Journal of Pharmaceutical Sciences [online], s. 2924-2935. ISSN 00223549.
44. *Characterization of Polymeric Nanoparticle Dispersions for Biomedical Applications: Size, Surface Charge and Stability*. **FORNAGUERA, Cristina a Conxita SOLANS**. 2018, Pharmaceutical Nanotechnology [online], s. 147-164. ISSN 22117385.
45. *Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials*. **LIN, Ping-Chang, a iní.** 2014, Biotechnology Advances [online], s. 711-726. ISSN 07349750.
46. *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences* . **STEFELD, Jörg, MCKENNA, Sean A. a PATE, Trushar R.** . 2016, Biophysical Reviews [online], s. 409-427. ISSN 1867-2450.
47. *Characterization and Analytical Separation of Fluorescent Carbon Nanodots*. **HU, Qin, a iní.** 2017, Journal of Nanomaterials [online], s. 1-23. ISSN 1687-4110.
48. *Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes*. **SMITH, Mackensie C, a iní.** 2017, Analytical and Bioanalytical Chemistry [online], s. 5779-5787. ISSN 1618-2642.
49. *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?* . **BHATTACHARJEE, Sourav**. 2016, Journal of Controlled Release [online], s. 337-351. ISSN 01683659.
50. *Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery*. **HICKEY, John W., a iní.** 2015, Journal of Controlled Release [online], s. 536-547. ISSN 01683659.
51. *Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems*. **DANAELI, M., a iní.** 2018, Pharmaceutics [online]. ISSN 1999-4923.
52. *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. **OWENSIII, D. a PEPPAS, N.** 2016, International Journal of Pharmaceutics [online], s. 93-102. ISSN 03785173.