

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutickej technológie

Študijný program: **Farmácia**



Príprava biodegradovateľných polymérnych nanočastíc
Biodegradable polymeric nanoparticles preparation

Diplomová práca

Silvia Bacskaiová

Školiteľ: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktorú som písala samostatne pod odborným vedením svojho školiteľa. Všetka použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pre spracovanie čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové

.....

Silvia Bacskaiová

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcemu školiteľovi diplomovej práce PharmDr. Ondřejovi Holasovi, Ph.D za poskytnuté rady a pripomienky k tejto práci a za obetavosť, trpezlivosť a pomoc pri realizácii experimentálnej časti. Chcela by som sa poďakovať za zaradenie práce do projektu SVV 260-401.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt.....	7
Abstract	8
1 Zadanie.....	9
2 Úvod.....	10
3 Teoretická časť.....	11
3.1 Nanočastice ako nosiče liečiv	11
3.2 Prehľad materiálov najčastejšie používaných na prípravu biodegradovateľných nanočastíc.....	15
3.2.1 Polyestéry-PLA, PLGA	15
3.2.2 Poly- ϵ -kaprolakton.....	16
3.2.3 Polyalkylkyanoakryláty	16
3.2.4 Želatína	17
3.2.5 Polysacharidy.....	18
3.3 Využitie nanočastíc	18
3.3.1 Liečba rakoviny	18
3.3.2 Liečba ochorení sprevádzaných zápalom	19
3.3.3 Nanočastice ako nosiče vakcín	19
3.3.4 Použitie nanočastíc pri neurodegeneratívnych ochoreniach mozgu	20
3.3.5 Využitie nanočastíc v oftalmológii.....	20
3.3.6 Antibiotická rezistencia	21
3.4 Aktívna a pasívna cielená distribúcia.....	21
3.4.1 Aktívna distribúcia.....	21
3.4.2 Pasívna distribúcia	21
3.4.2.1 Perorálna cesta podania	22
3.4.2.2 Intravenózna cesta podania.....	22
3.4.2.3 Inhalačná cesta podania	23

3.5	Mikroenkapsulácia	23
3.6	Príprava nanočastíc	23
3.6.1	Príprava nanočastíc polymerizáciou	24
3.6.1.1	Emulzná polymerizácia	24
3.6.1.2	Medzifázová polymerizácia.....	24
3.6.2	Príprava nanočastíc z vopred pripravených polymérov.....	25
3.6.2.1	Odparovanie rozpúšťadla	25
3.6.2.2	Nanoprecipitácia.....	26
3.6.2.3	Vysoľovanie	27
3.6.2.4	Technológia so superkritickou kvapalinou.....	27
3.7	Fyzikálno-chemické vlastnosti nanočastíc	28
3.7.1	Veľkosť častíc.....	28
3.7.2	Zeta potenciál.....	28
4	Experimentálna časť	30
4.1	Použité suroviny	30
4.2	Použité prístroje	30
4.3	Vlastnosti použitých surfaktantov.....	31
4.4	Použité metódy.....	31
4.4.1	Emulzná metóda	32
4.4.2	Nanoprecipitácia	33
4.4.3	Mikroenkapsulácia.....	33
5	Výsledky	35
5.1	Emulzná metóda.....	35
5.2	Porovnanie výsledkov pri emulznej metóde	48
5.3	Nanoprecipitácia	53
5.4	Porovnanie výsledkov pri nanoprecipitácii	60
5.5	Mikroenkapsulácia	65
5.6	Porovnanie výsledkov u nanočastíc s enkapsulovaným rodamínom B a bez enkapsulovaného rodamínu B.....	68
6	Diskusia	72

6.1	Všeobecné poznámky k experimentálnej časti.....	72
6.2	Vplyv surfaktantu na veľkosť nanočastíc a index polydisperzity	72
6.3	Vplyv surfaktantu na zeta potenciál nanočastíc	75
6.4	Hodnotenie enkapsulácie rodamínu B	78
7	Záver	79
8	Zoznam tabuliek	80
9	Zoznam grafov	82
10	Zoznam obrázkov	86
11	Použitá literatúra	87

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická technológia

Školiteľ: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Poslucháč: Silvia Bacskaiová

Názov diplomovej práce:

Príprava biodegradovateľných polymérnych nanočastíc

Súčasný vedecký pokrok významnou mierou prispieva aj k rozvoju nanomedicíny, ktorá sa snaží o zefektívnenie farmakoterapie rakoviny a iných vážnych ochorení. Hlavným cieľom tejto diplomovej práce je štúdium vplyvov povrchovo aktívnych látok na výsledné vlastnosti nanočastíc. Teoretická časť je zameraná na nanočastice ako nosiče liečiv, na prípravu biodegradovateľných nanočastíc, ich využitie pri liečbe rakoviny, ochorení sprevádzaných zápalmi, vakcinácii a aj na iné účely. Hlavnou súčasťou je tiež charakterizovanie aktívnej a pasívnej cieľenej distribúcie liečiv, mikroenkapsulácie, prípravy nanočastíc polymerizáciou a z vopred pripravených polymérov. Definujú sa fyzikálno-chemické vlastnosti nanočastíc: veľkosť, zeta potenciál. Experimentálna časť je rozsiahlejšia a zaoberá sa optimalizáciou prípravy nanočastíc, výberom vhodnej koncentrácie a typu surfaktantu pri ich príprave. Pri experimentálnej časti bolo použitých päť rôznych typov surfaktantov a to v troch koncentráciách. Súčasťou experimentálnej časti sú tabuľky a grafy porovnávajúce vplyv jednotlivých surfaktantov na veľkosť častíc, zeta potenciál a index polydisperzity u nanočastíc.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Silvia Bacskaiová

Title of Thesis:

Biodegradable polymeric nanoparticles preparation

The present scientific progress in an important rate conduces to nanomedicine development, which aims to reengineering of cancer pharmacotherapy and other substantial diseases. The main intention of this graduation thesis is the study of surface-active chemical's effects on the final properties of nanoparticles. The theoretical part is focused on the nanoparticles likedrugs vehicles, synthesis of biodegradable nanoparticles, themselves applications in the cancer therapy, diseases accompanied by inflammations, vaccination and for another different purposes. The theoretical part also contents characterization of active and passive goal-directed distribution by diseases, microencapsulations, synthesis of nanoparticles by polymerization and from previously synthesized polymers and definition of physical-chemical properties of nanoparticles. The experimental part is more extensive and concerned with the optimalization of reaction conditions of nanoparticles synthesis, with selection of advisable concentracion and type of surfactant. In the experimental part were used five different types of surfactants in three concentracions. The experimental part includes tables and graphs, which balance different types of surfactant on the particle size, zeta potential and polydispersity index of nanoparticles.

1 Zadanie

Cieľom diplomovej práce bolo oboznámiť sa s odbornou literatúrou a dostupnými laboratórnymi postupmi. Následne prakticky v laboratórnych podmienkach pripraviť farmaceutické formulácie na báze polymérnych nanočastíc. Náplňou práce bola optimalizácia prípravy nanočastíc a hodnotenie vlastností častíc, optimalizácia inkorporácie účinných látok, príprava nanočastíc s inkorporovaným liečivom a následne hodnotenie účinnosti inkorporácie. Hlavným cieľom tejto práce bolo štúdium vplyvov povrchovo aktívnych látok na výsledné vlastnosti nanočastíc.

Kľúčové slová: biodegradovateľné polyméry, nanočastice, emulzná metóda, inkorporácia liečiv.

2 Úvod

Pokrok v humánnej medicíne nastal v roku 1906, keď Paul Ehrlich vyslovil myšlienku o cielenej distribúcii liečiv pomocou častíc, ktoré nazval ako „*magické guľičky*“. Medzi tieto časticové systémy patria aj nanočastice. Tieto nové poznatky umožnili významný pokrok v oblasti farmakoterapie a prispeli k zvýšeniu jej účinnosti a bezpečnosti (1).

Vedný odbor, ktorý sa zaoberá nanočasticami je nanotechnológia. Nanotechnológia sa využíva v rôznych odvetviach a to aj v medicíne. Nanomedicína využíva poznatky z viacerých vedných disciplín ako je chémia, biológia, fyzika, klinická medicína a iné. Vznikli tak nové diagnostické a liečebné metódy využívajúce nanotechnológie.

Využitie nanočastíc je veľmi široké a umožňuje lepšiu farmakoterapiu pri mnohých závažných ochoreniach, ale uplatňujú sa aj ako ciele nosiče liečiv a využívajú sa aj ako transportné systémy pre vakcíny, proteíny, inzulín.

V rámci regeneratívnej nanomedicíny sú pripravované lepšie znášané zubné nanoimplantáty, a tiež aj nanovlákná, ktoré slúžia na regeneráciu a hojenie poškodeného tkaniva. (2)

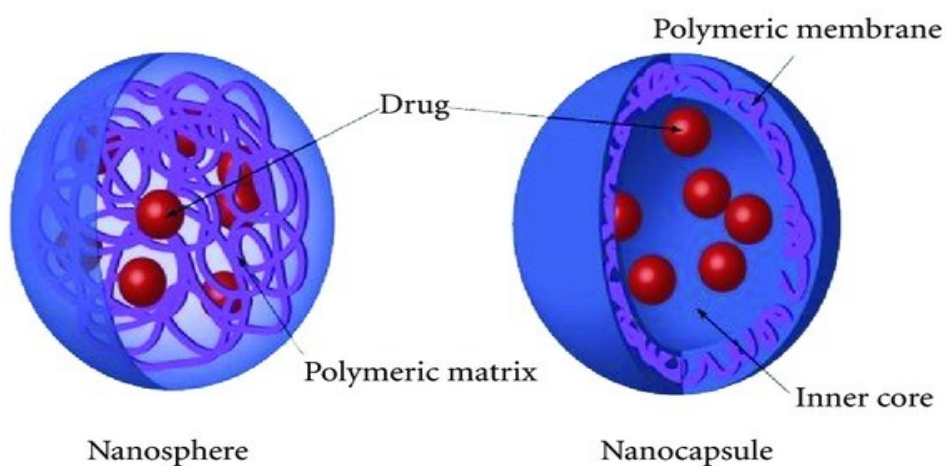
Nanočastice majú široký rozsah aplikácie. Môžu sa podávať perorálne, parenterálne, topicky a sú vhodné aj na aplikáciu do nosa a očí. (3) Nanočastice sú vyrábané z materiálov, ktoré sú biodegradovateľné a biokompaktibilné. Ich toxicita je preto pre organizmus veľmi nízka, čo je ich veľkou prednosťou. Vyrábajú sa v miniatúrnej veľkosti, čo umožňuje ich prechod aj cez najmenšie kapiláry v organizme. Kvôli týmto vynikajúcim vlastnostiam sú veľmi nádejné na ciele transport. Nanočastice sa tak stali neoddeliteľnou súčasťou modernej medicíny a výskum s nimi spojený neustále prebieha. Ak by sa podarilo pomocou nanotechnológií odhaliť a opraviť, prípadne liečiť poškodenie jednotlivých orgánov a tkanív v ľudskom organizme ešte predtým, ako sa prejavia klinické príznaky chorôb, podarilo by sa posunúť medicínu do oblasti prevencie. (2)

3 Teoretická časť

3.1 Nanočastice ako nosiče liečiv

Nanočastice sú častice s veľkosťou v rozmedzí 1 až 1000 nm. (3) K ich priaznivým vlastnostiam patrí ich biokompatibilita, schopnosť biodegradácie, možnosť enkapsulácie liečiva a ich malé rozmery. (4) Ich subcelulárna veľkosť je vhodná pre distribúciu v krvnom obeh, pretože môžu prechádzať aj cez najmenšie kapiláry a dostávať sa tak k svojmu cieľu. (5) Nanočastice sa delia na nanosféry, nanotobolky, dendriméry, polymérne micely, lipozómy a iné. (3) Nanosféry sú častice zložené z matrice, na ktorú je liečivo naadsorbované, alebo je v ňom dispergované. Nanotobolky sa skladajú z jadra a obalu, pričom liečivo sa v jadre nachádza v tekutej forme (obrázok 3-1). (6)

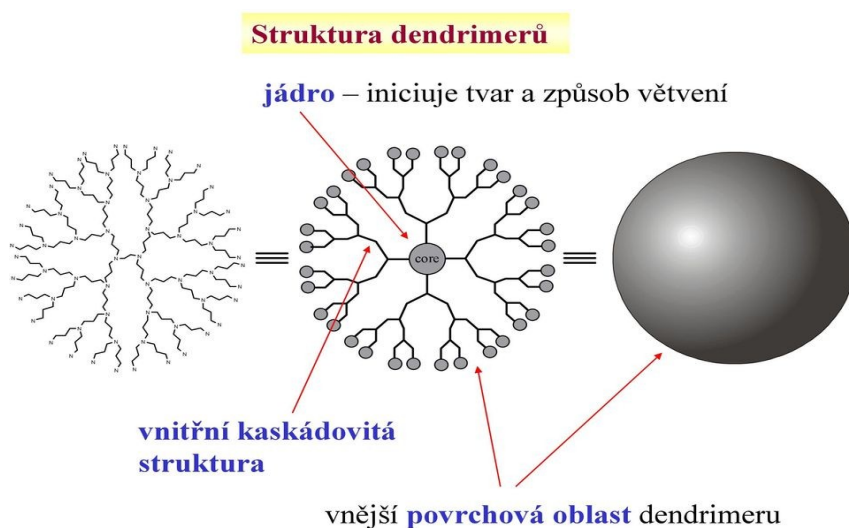
Obrázok 3-1 Nanočastice a nanosféry¹



¹ <https://www.google.sk/search?tbm=isch&q=nanosphere&hl=sk-sk&client=safari&ved=2ahUKEwjAi7Ls8bLaAhWPI1AKHVHECuAQMvgAegQIABAs&imgre=kli4aFx4ra3a5M&uact=26#imgre=kli4aFx4ra3a5M>:11.04.2018 20:56:53

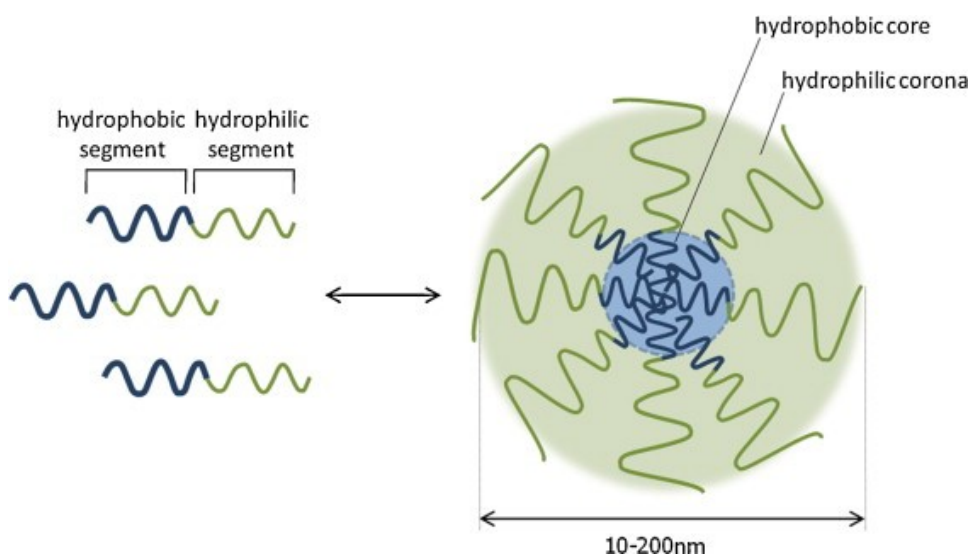
Dendriméry majú presne chemicky definovanú štruktúru, ktorá je bohato vetvená (obrázok 3 – 2). Pripravujú sa chemickou syntézou. Naviazaním rôznych funkčných skupín sa pripravilo viacero typov dendrimérov, ktoré reagujú na rôzne stimuly (svetlo, pH, teplo). (6)

Obrázok 3-2 Dendriméry²



Polymérne micely patria tiež medzi transportné systémy liečiv. Tvorí ich lipofilné jadro a hydrofilná stena (obrázok 3 – 3). Získavajú sa prípravou z amfifilných polymérov, ktoré tvoria micely a do nich sa zabudováva liečivá látka. (7) V krvnom obehú zotrúvajú pomerne dlhú dobu. Využívajú sa napríklad pri farmakoterapii rakoviny, pri ktorej dopravujú cytostatiká až k postihnutému tkanivu a uvoľnia ho pri použití ultrazvuku. Táto terapia je však limitovaná na niektoré typy nádorov, keďže ultrazvuk nedosiahne do niektorých častí organizmu. Uvedená terapia je vhodná napríklad pri karcinóme prsníka a vaječníkov. (1)

Obrázok 3-3 Polymérne micely³

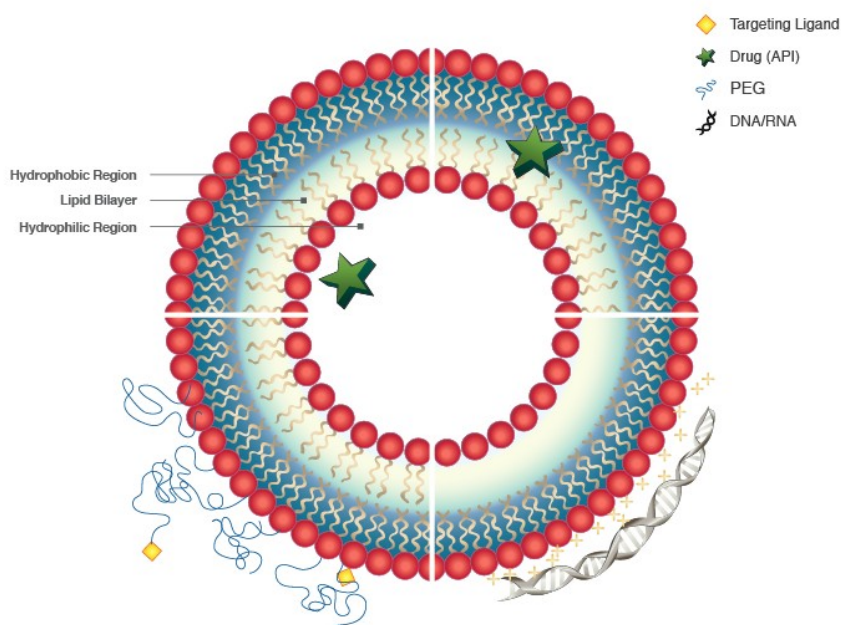


³ Zdroj: https://www.google.sk/search?tbm=isch&q=polymeric+micelles+&hl=sk-sk&client=safari&ved=2ahUKEwjo35788rLaAhWHmrQKHRSYDikQMygRegQIA_BBG&imgsrc=CT_2b6mrstrlIM&uact=26#imgsrc=CT_2b6mrstrlIM:11.04.2018

20:58:10

Lipozómy sú biodegradovateľné a biokompatibilné. (6) Skladajú sa z hydrofilného jadra a z lipofilnej dvojvrstvy. Ich štruktúra im tak umožňuje transport hydrofilných liečiv v jadre a lipofilných liečiv v obale (obrázok 3 – 4). (8)

Obrázok 3-4 Lipozómy⁴



Zvláštnym typom sú pH-senzitívne lipozómy. Sú citlivé na slabo kyslé pH. Ako pomocné látky pre dosiahnutie tejto vlastnosti sa používajú polykarboxylové kyseliny, sukcinylované polyglycidoly a poly-N-izopropylakrylamidy. Zvláštnosťou pri niektorých typoch rakoviny je, že pH v intersticiálnej tekutine je nižšie, ako v normálnom tkanive. Táto ich vlastnosť sa môže použiť pri transporte cytostatík, keďže v postihnutom tkanive budú uvoľňovať enkapsulované liečivo.

Na membránu lipozómov sa dajú naviazať polyméry, ktoré môžu byť prírodného, ale aj syntetického charakteru. Tieto polyméry dodávajú lipozómom

⁴ Zdroj: <https://www.google.sk/search?q=liposomes&client=safari&hl=sk-sk&dcr=0&prmd=ivn&source=lnms&tbn=isch&sa=X&biw=320&bih=454&ved=2ahUKEwjournI8rLaAhWCl7QKHTJFDs8QMygGegQIABA2&imgrc=g6LDMXRSN8sCCM&uact=26#imgrc=g6LDMXRSN8sCCM:11.04.2018 20:57:06>

rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti. Známod modifikáciou je tzv. PEGylácia, čiže pripojenie polyetylénglykolu (PEG). (6) PEGylácia zvyšuje rozpustnosť a znižuje renálnu exkréciu liečiv. (7) Tieto PEGylované lipozómy majú predĺženú dobu cirkulácie v krvnom obehu. Naviazaním termosenzitívnych polymérov na lipozómy, vznikajú lipozómy citlivé na zmeny teploty. U nich zmena teploty slúži ako stimul na uvoľnenie enkapsulovaného liečiva. Táto skutočnosť sa využíva u hypertermnej terapii rakoviny. Vyrábajú sa lysolipidové termosenzitívne polyméry a termosenzitívne mikrotobolky. Pri nich sa využívajú polyméry, ktoré v závislosti na teplote bobtnajú alebo sa zmršťujú. Najpoužívanější termoresponzívny materiál je poly-N-izopropylakrylamid. (1,6)

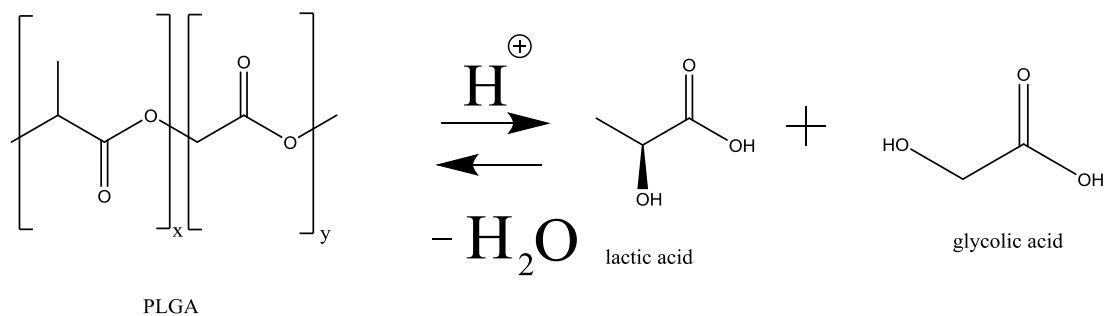
3.2 Prehľad materiálov najčastejšie používaných na prípravu biodegradovateľných nanočastíc

Hlavnými kritériami pri voľbe materiálov, je nízka toxicita a schopnosť biodegradácie. (6) Nebiodegradovateľné polyméry (napríklad polyakrylamid) sa v súčasnosti už nepoužívajú kvôli riziku chronickej toxicity. Používajú sa najčastejšie polyestéry–poly(lactidacid) (PLA), poly(lactic-*co*-glycolicacid) (PLGA), poly- ϵ -kapolakton, polyalkylkyanoakryláty, želatína a polysacharidy - chitosan a algináty. (4)

3.2.1 Polyestéry-PLA, PLGA

Polyestéry- PLA, PLGA sa s obľubou využívajú pri príprave nanočastíc, pretože sa pokladajú za bezpečné. V organizme z nich vzniká kyselina mliečna a glykolová, ktoré vstupujú do Krebsovho cyklu, a tak sa odstraňujú z tela (obrázok 3-5). Sú to látky alifatické a hydrofóbne, pričom PLGA je menej hydrofóbny, čo vychádza z jeho štruktúry. PLA sa skladá jedine z monomérov kyseliny mliečnej, je teda homopolymér. PLGA je kopolymér zložený z jednotiek kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej. (4) PLGA sa pokladajú za veľmi efektívne nosiče mnohých liečiv rôzneho typu, napríklad cytostatík, antiparazitík, antibiotík a iných. (9)

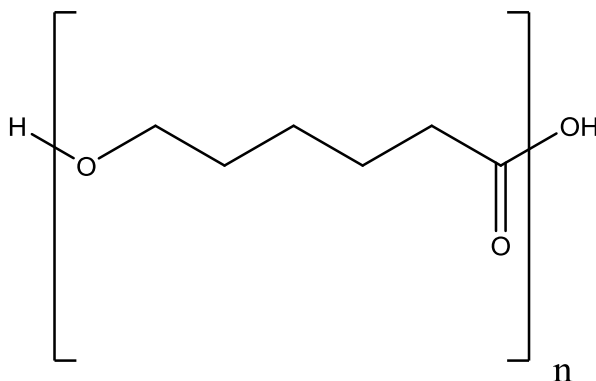
Obrázok 3-5 Vzorec hydrolýzy polyestérov v organizme⁵



3.2.2 Poly- ϵ -kaprolakton

Poly- ϵ -kaprolakton (ďalej PCL) je alifatický, hydrofóbny polyester pripravovaný polymerizačnou reakciou ϵ -kaprolaktónu. V tele sa hydrolyticky štiepi, tento proces prebieha veľmi pomaly. (4) Kvôli jeho pomalej degradácii sa využíva pre výrobu liekov s riadeným uvoľňovaním liečivej látky. (6)

Obrázok 3-6 Vzorec Poly- ϵ -kaprolaktonu⁶



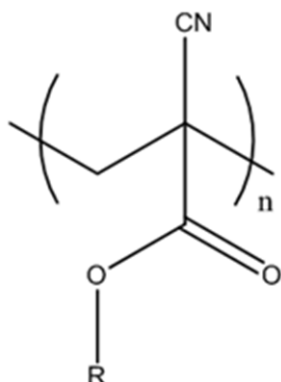
3.2.3 Polyalkylkyanoakryláty

Polyalkylkyanoakryláty sa zvyčajne pripravujú anionickou polymerizáciou vo vodnom prostredí. V organizme sa ich esterová väzba hydrolyticky štiepi. (4) Okrem prípravy nanočastíc sa používajú aj v chirurgii ako šijací materiál. (6)

⁵Zdroj: Vzorec tvorený v ChemDraw dostupný cez www.faf.cuni.cz

⁶Zdroj: Vzorec tvorený v ChemDraw dostupný cez www.faf.cuni.cz

Obrázok 3-7 Všeobecný vzorec Polyalkylkyanoakrylátu⁷

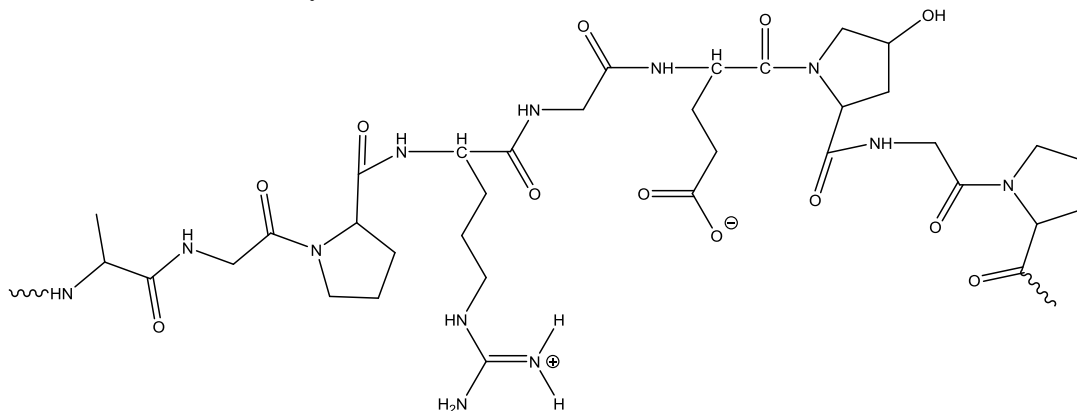


3.2.4 Želatína

Želatína je známa tým, že je obľúbená pomocná látka vo výrobe želatínových kapsúl. Avšak špeciálna arylsulfónová želatína sa používa na prípravu nanočastíc.

(6)

Obrázok 3-8 Vzorec želatíny⁸



⁷Zdroj: Vzorec tvorený v ChemDraw dostupný cez www.faf.cuni.cz

⁸Zdroj: Vzorec tvorený v ChemDraw dostupný cez www.faf.cuni.cz

3.2.5 Polysacharidy

Polysacharidy chitosan a alginát sú biodegradovateľné a netoxické, v tele sa štiepia enzymaticky. (4)

3.3 Využitie nanočastíc

Nanočastice patria k časticovým liekovým systémom, ktoré pozostávajú z veľkého množstva častíc, čiže ide o násobnú liekovú formu. Každá častica sa pri tom správa ako samostatná jednotka. Využitie nanočastíc je zamerané na cieľnú distribúciu liečiv a riadené uvoľňovanie. Medzi riadené uvoľňovanie liečiv patrí pulzné, predĺžené a oneskorené uvoľňovanie. Uvedené možnosti prispievajú k lepšej compliance pacienta a k znášateľnosti farmakoterapie. (3) Využitie nanočasticových systémov má sľubnú budúcnosť kvôli ich priaznivým vlastnostiam, a tiež širokým možnostiam využitia v medicíne na rôzne účely napr. v toxikológii, v klinickej diagnostike, v bioanalytickom výskume. Veľký význam má ich využitie na cieľný transport liečiv. (1) Pri cieľnom transporte sa liečivo dostáva priamo k postihnutému tkanivu a orgánu, a tým sa zvýši jeho účinnosť v danom mieste a zníži sa aj toxické pôsobenie na zdravé tkanivá a orgány. Tento fakt má veľký význam pri závažných ochoreniach, akými sú rôzne typy rakoviny, reumatoidná artritída a ďalšie. (3)

3.3.1 Liečba rakoviny

Liečivé látky používané v chemoterapii rakoviny sa vyznačujú poškodením zdravého tkaniva a závažnými nežiaducimi účinkami, a pri niektorých typoch rakoviny je problémom dostať sa k postihnutému tkanivu. Tieto problémy sa dajú zmierniť použitím nanočasticových systémov. Liečivá látka je enkapsulovaná do nanočasticového systému, ktorý zabezpečí jeho cieľnú distribúciu do požadovaného miesta pôsobenia. Nanočastice sú na subcelulárnej úrovni, čo umožňuje ich distribúciu na miesta, ktoré by boli pri inom spôsobe podania nedostupné. Rakovinou postihnuté tkanivo má špecifické vlastnosti, ktoré sa zohľadňujú kvôli dosiahnutiu cieľnej distribúcie, napr. pH, prítomnosť určitého typu receptora. Nanočasticové systémy umožňujú účinnejšiu a pacientom lepšie znášanú liečbu rakoviny. (3,9)

3.3.2 Liečba ochorení sprevádzaných zápalom

Do tejto skupiny ochorení patria napr. reumatoidná artritída, ulceratívna kolitída, Crohnova choroba a iné. Ich liečba je dlhodobá a spojená s prejavom závažných nežiaducich účinkov. Aj v tejto oblasti sa uplatnili nanočastice ako nosiče liečiv. Väčšina nanočastíc po systémovom podaní aktivuje retikuloendotelialný systém. Sú opsonizované a následne vychytávané. Zápal vyvoláva imunitnú reakciu organizmu a v mieste zápalu dochádza k zhromažďovaniu lymfocytov a makrofágov. Týmto spôsobom sa k miestu zápalu dostanú aj nanočastice s enkapsulovaným liečivom. V mieste zápalu býva zvýšená expresia určitých typov receptorov, napríklad integrinov, ktoré sa v normálnom tkanive vyskytujú iba v malom množstve. Tento fakt sa využíva pri príprave nanočastíc, ktoré majú špecifický upravený povrch a slúžia k aktívnej cielenej distribúcii ku konkrétnemu typu receptorov. (4,9)

3.3.3 Nanočastice ako nosiče vakcín

Aktívna imunizácia je hlavnou metódou prevencie voči infekčným ochoreniam. Podaním vakcín dochádza k indukcii špecifickej imunity organizmu voči určitému antigénu. (10) Vakcíny obsahujú časti mikroorganizmov alebo celé mikroorganizmy, ktoré môžu byť umŕtvené alebo len oslabené. Tieto tradičné vakcíny však nie sú až také bezpečné, hlavne pre osoby s oslabenou imunitou. Moderné vakcíny obsahujú izolované látky na báze proteínov, polysacharidov, DNA (deoxyribonukleová kyselina) alebo RNA (ribonukleová kyselina), ktoré kódujú antigén. K zvýšeniu ich účinnosti sa k nim pridávajú tzv. adjuvanciá. (11) Nanočastice sa môžu využiť ako transportný systém, v ktorom je enkapsulovaný antigén, kombinácia antigénov alebo kombinácia antigénu a adjuvancia. Najvýhodnejšia je kombinácia antigénu a adjuvancia v jednej častici, ktoré už v minimálnom množstve môžu vyvolať silnú imunitnú reakciu. Zníženie ich dávok súvisí aj so znížením nežiaducich účinkov s nimi spojených. Na tieto účely sa používajú predovšetkým PLGA nanočastice. (9) Nanovakcinácia je využívaná najmä pri imunoterapii rakoviny a v súčasnosti je skúmané jej využitie aj pre iné choroby. Na prevenciu rôznych ochorení sa používa profylaktická nanovakcinácia. Časť

z týchto nanovakcín bola schválená pre použitie u človeka a ostatné sú ešte v klinickom alebo pre klinickom štádiu výskumu. (12)

3.3.4 Použitie nanočastíc pri neurodegeneratívnych ochoreniach mozgu

Medzi neurodegeneratívne onemocnenia mozgu patria: Alzheimerov syndróm, Parkinsonov syndróm, skleróza multiplex a iné. Ich farmakoterapia je problematická, keďže transport liečiv do centrálného nervového systému (ďalej CNS), je veľmi obtiažny. Fyzikálno-chemické vlastnosti nanočastíc musia byť také, aby mali schopnosť prekročiť hematoencefalickú bariéru, ktorá oddeľuje CNS od ostatných častí tela. Táto bariéra slúži na ochranu citlivého nervového tkaniva, preto blokuje aj prechod väčšiny liečiv. Prenos endogénnych látok zabezpečujú špecifické receptory. (7,9)

V súčasnosti pripravované nanočastice prekračujú hematoencefalickú bariéru viacerými spôsobmi. Mechanizmus, akým nanočastice prekračujú hematoencefalickú bariéru závisí na ich fyzikálno-chemických vlastnostiach. Nanočastice indukujú lokálne toxické účinky čo vedie k zvýšenej permeabilite hematoencefalickej bariéry, a to umožní penetráciu liečiva. Nanočastice môžu byť transportované aj endocytózou. Avšak najčastejším spôsobom je transport nanočastíc do CNS transcytozou. Môže však ísť aj o kombináciu týchto mechanizmov. Je však nutný ďalší výskum na objasnenie rozdielov v preprave u zdravých jedincov a u jedincov postihnutých neurodegeneratívnou chorobou. (13)

3.3.5 Využitie nanočastíc v oftalmológii

Pri aplikácii liečiv do oka je najväčším problémom krátka doba styku liečiva s okom. Kvôli tomu sa zvyčajne používajú očné kvapky s vysokými koncentráciami liečivej látky a musia sa často aplikovať. Pri použití nanočastíc ako nosičov liečiv sa dá predĺžiť doba kontaktu, a tým aj absorpcia liečiv. To umožňuje použiť menšie dávky liečiva, zvyšovať účinnosť terapie a znížiť frekvenciu dávkovania. (7)

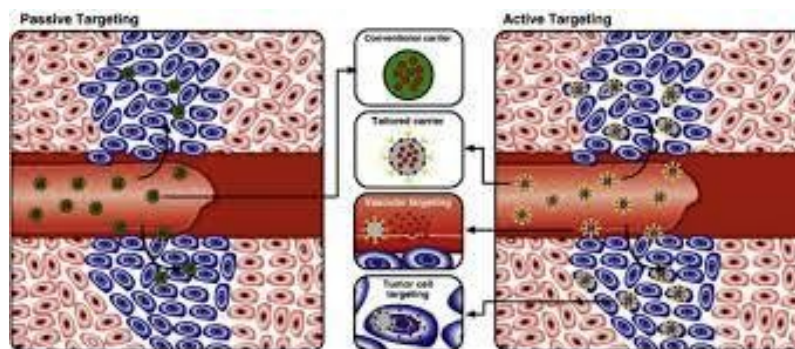
3.3.6 Antibiotická rezistencia

Využitím nanočastíc sa dá znížiť antibiotická rezistencia. Takúto schopnosť majú nanočastice s oxidom zinočnatým, ktoré reagujú s proteínmi zúčastňujúcimi sa rezistencie na antibiotiká. (14)

3.4 Aktívna a pasívna cielená distribúcia

Cielená distribúcia umožňuje dopravu liečiv k požadovaným štruktúram v organizme.(obrázok 3 – 9). (1)

Obrázok 3-9 Aktívny a pasívny cielený transport⁹



3.4.1 Aktívna distribúcia

Pri aktívnej cielenej distribúcii sa povrch nanočastíc modifikuje tak, aby obsahovali špecifickú časť, ktorá ich nasmeruje na miesto, kde majú pôsobiť. (1) Nazývajú sa aj ako, tzv. chytré nanočastice, keďže reagujú na rôzne podnety (iontové, fyzikálno-chemické, enzymatické), na vplyv ktorých uvoľnia enkapsulované liečivo. (3)

3.4.2 Pasívna distribúcia

Pri pasívnej distribúcii záleží na fyzikálno-chemických vlastnostiach nanočastíc (napríklad lipofilita a veľkosť častíc) a dochádza k ich kumulácii

⁹ Zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Passive-versus-active-targeting-Left-In-passive-targeting-particles-tend-to-passively_fig1_22932509021.07.2018 4:20:04

na cieleom mieste. Jej priebeh sa líši na základe spôsobu podania do organizmu: a) perorálna cesta podania, b) intravenózna cesta podania, c) inhalačná cesta podania. (4)

3.4.2.1 Perorálna cesta podania

Pri perorálnom podávaní liečiva, mnoho faktorov ovplyvňuje jej vstrebávanie, medzi ktoré patrí rozpustnosť a acidobázické vlastnosti liečivej látky, kyslá hydrolyza v žalúdku, first-pass efekt v pečeni a iné. Hlavným miestom absorpcie pre väčšinu liečiv je tenké črevo. Tenké črevo je pokryté veľkým množstvom klkov, ktoré zväčšujú jeho povrch, a tým sa zvýši aj vstrebávanie. Enterocyty sú miestom absorpcie látok z tenkého čreva. Z hľadiska vstrebávania nanočastíc sú dôležité tzv. Peyerové pláty, ktoré obsahujú M-bunky, a tie sú špecializované na endocytózu a uptake častíc cez lymfatický systém. Pri tomto type absorpcie zohrávajú rolu najmä veľkosť, hydrofilita a povrch častíc. Tento spôsob podávania sa uplatňuje pri chorobách, ako je Crohnova choroba, ulceratívna kolitída, vredová choroba, pri ktorých cieleé pôsobenie liečiva má veľké výhody. (4,18)

3.4.2.2 Intravenózna cesta podania

Pri intravenózneí ceste podávania liečiv záleží hlavne na veľkosti častíc. Podmienkou dobreí distribúcie v krvnom obehu je veľkosť častíc 5-6 μm a tiež, aby nedochádzalo k ich agregácii. Častice s veľkosťou menšou než 100 nm neaktivujú retikuloendotelialny systém, ich osud závisí od ich veľkosti. Menšie častice, ktoré sú schopné prechádzať fenestráciami v obličkách sú z tela vylúčené okamžite. Ostatné častice zotrývajú v tele dlhšiu dobu, až nakoniec sa zhromažďujú v endoteliálnych fenestráciach. Z toho dôvodu sa môžu prednostne využívať pri liečbe chorôb, ktoré sú spojené s narušením integrity epiteliálnych fenestrácií. Častice s veľkosťou v rozmedzí 100 nm až 6 μm sú opsonizované a vychytávané retikuloendoteliálnym systémom a zhromažďujú sa v pečeni a slezine. To sa môže využiť pri chorobách sprevádzaných zápalom, keď sa monocyty a makrofágy nahromadia v mieste zápalu, a tým aj nimi vychytané častice. Špecifickejšie pôsobenie dosiahneme úpravou veľkosti a povrchu nanočastíc. Tento spôsob podania je výhodný pri ochoreniach ako reumatická artritída, diabetes mellitus a iné. Častice s veľkosťou väčšou než 6 μm sa

kumulujú v pľúcach, sú totiž príliš veľké na to, aby boli vychytávané retikuloendoteliálnym systémom. Výhodou je, že môžu lokálne pôsobiť v pľúcach napríklad pri rakovine pľúc či tuberkulóze. (5,4)

3.4.2.3 Inhalačná cesta podania

Inhalačná cesta podania je neinvazívny spôsob a je vhodná k vyvolaniu lokálnych, ale aj systémových účinkov liečiva. Lokálny účinok v pľúcach sa uprednostňuje pri pľúcnych ochoreniach, napríklad tuberkulóza, astma, CHOPN (chronická obštrukčná pľúcna nemoc) a ďalšie. Podané liečivo nebude pôsobiť na celý organizmus, len priamo v mieste účinku. Liečivo sa v pľúcach môže dostať do systémovej cirkulácie cez tenký epitel. Okrem toho, že ide o neinvazívny spôsob podania, je táto cesta podania vhodná aj preto, že sa vyhýba first-pass efektu a umožňuje podanie liečiv charakteru peptidov a proteínov, ktoré by pri inom spôsobe boli degradované. Osud inhalovaných nanočastíc závisí na veľkosti častíc, ich fyzikálno-chemických vlastností a od zdravotného stavu pľúc pacienta. (4,18)

3.5 Mikroenkapsulácia

Mikroenkapsulácia, alebo tzv. drug loading je proces pri ktorom sa liečivá látka inkorporuje do nanočastice. Môže prebiehať dvoma spôsobmi. Prvý spôsob je inkorporácia počas procesu prípravy nanočastíc, a druhý spôsob je adsorpcia na hotové nanočastice.

Liečivá látka môže byť enkapsulovaná do rôznych častí nanočastice. Môže sa nachádzať napríklad v jadre, v membráne, môže byť naadsorbovaná na povrch. Do nanočastice nemusí byť enkapsulovaná len jedna liečivá látka, ale môže to byť aj ich kombinácia. (5) Miesto, kde sa presne bude enkapsulované liečivo v nanočastici nachádzať závisí od jeho hydro-lipofilných vlastností. V prípade lipozómov sa hydrofilné liečivá nachádzajú v hydrofilnom jadre a lipofilné liečivá v lipofilnom obale. (8)

3.6 Príprava nanočastíc

Nanočastice sa pripravujú, buď polymerizáciou alebo z vopred pripravených polymérov. (3) Obe typy prípravy sa môžu uskutočňovať viacerými metódami.

Voľba metódy závisí na vlastnostiach liečiva, ktoré má byť do nanočastice enkapsulované a na spôsobe podávania do organizmu. (15)

3.6.1 Príprava nanočastíc polymerizáciou

Polymerizácia z monomérov je výhodná pre prípravu nanočastíc so žiadanými vlastnosťami. Sú dve hlavné metódy polymerizácie, a to emulzná polymerizácia a medzifázová polymerizácia. (16)

3.6.1.1 Emulzná polymerizácia

Emulzná polymerizácia patrí medzi najrýchlejšie metódy na prípravu nanočastíc. Podľa charakteru kontinuálnej fázy rozlišujeme dva typy emulznej polymerizácie. Kontinuálna fáza môže byť vodného alebo organického charakteru.

Vodná kontinuálna fáza je spravidla tvorená vodným roztokom. V tejto fáze sú rozpustené monoméry. Prvým krokom polymerizácie je iniciačná reakcia. Ako iniciátori sa dajú použiť rôzne faktory, a to ión, voľný radikál alebo iniciácia sa môže vyvolať ožiarením. Pri tomto procese dochádza buď k zrážke monoméru s iónom či radikálom, alebo vplyvom žiarenia vzniká modifikovaný, iniciovaný monomér. Reakcia sa šíri zrážkami iniciovaného monoméru s ostatnými monomérmi, pričom dochádza k ich iniciácii.

Organická kontinuálna fáza – pri jej použití sa monomér nachádza vo fáze, kde nie je rozpustný, alebo je dispergovaný v emulzii či inverznej mikroemulzii. Od tejto metódy sa upúšťa kvôli používaniu organických rozpúšťadiel, ktoré majú významnú toxicitu. (16)

3.6.1.2 Medzifázová polymerizácia

Pri tejto metóde sú monoméry zvlášť rozpustené v dvoch navzájom nemiešateľných fázach, a to vo vodnej a organickej fáze. Prvým stupňom polymerizácie je iniciačná reakcia, v ktorej vznikajú iniciované monoméry. K reakcii dochádza na medzifáze dvoch navzájom nemiešateľných kvapalín. Hlavnou výhodou tohto typu polymerizácie je, že enkapsulácia liečiva prebieha veľmi účinne. Jej nevýhodou je využívanie organických rozpúšťadiel. (15,16)

3.6.2 Príprava nanočastíc z vopred pripravených polymérov

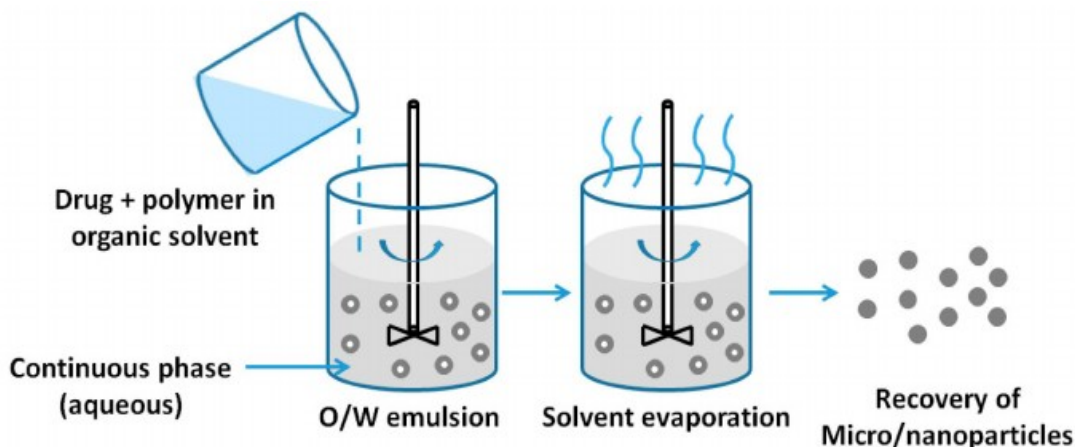
Pri príprave nanočastíc sa využívajú rôzne metódy, a to:

- a) odparovanie rozpúšťadla,
- b) nanoprecipitácia,
- c) vysoľovanie,
- d) technológia so superkritickou kvapalinou.

3.6.2.1 Odparovanie rozpúšťadla

Odparovanie rozpúšťadla je najstaršia metóda prípravy nanočastíc (obrázok 3 – 10). Táto metóda je spojená s prípravou emulzií, ktoré môžu byť jednoduché (napríklad olej vo vode) a zložité (napríklad (voda v oleji) vo vode). Olejovú fázu tvorí polymér rozpustený v organickom rozpúšťadle a vo vodnej fáze sa nachádzajú stabilizátory. Najprv sa robí homogenizácia alebo ultrasonikácia, po ktorej sa organické rozpúšťadlo odparí, pričom sa stále magneticky mieša. Potom môžu byť častice ultracentrifugované a premyté destilovanou vodou pre odstránenie prídavkov. Nakoniec sa lyofilizuje. Podmienky prípravy majú vplyv na výslednú veľkosť, ale aj na zeta potenciál nanočastíc. Ako organické rozpúšťadlá sa používajú predovšetkým etylacetát, chloroform a dichlormetán, pričom od posledných dvoch menovaných rozpúšťadiel sa upúšťa kvôli ich toxicite. Ako stabilizátory sa používajú polyvinylalkohol (ďalej PVA), span, pluronic, poloxamery a iné. Výber stabilizátoru závisí na konkrétnom type polyméru. (15) Táto metóda je použiteľná väčšinou pre lipofilné látky. Najčastejšie používané polyméry sú: PLGA, PLA, PCL a iné. (16)

Obrázok 3-10 Odparovanie rozpúšťadla¹⁰



3.6.2.2 Nanoprecipitácia

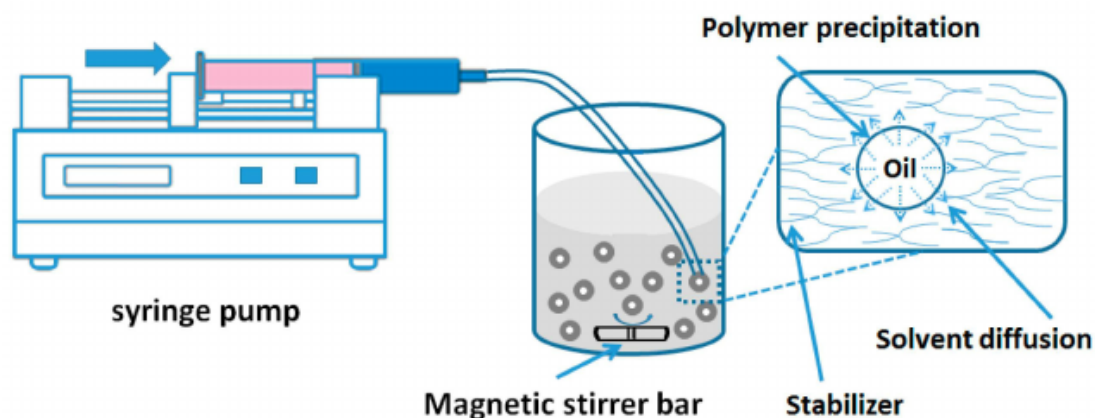
Nanoprecipitácia má veľmi jednoduchý a rýchly priebeh (viď. obrázok 3 – 11). Touto metódou môžeme dostať nanotobolky aj nanosféry požadovanej veľkosti a stability. Pri nanoprecipitácii k vodnej fáze, ktorá sa stále magneticky mieša, sa pomaly pridáva olejová fáza, pričom dochádza k rýchlej difúzii, a tým k vzniku nanočastíc. Nanoprecipitácie sa zúčastňujú polymér, rozpúšťadlo, v ktorom je polymér rozpustný, a rozpúšťadlo, v ktorom polymér nie je rozpustný. Z polymérov sa dáva prednosť tým, ktoré sú málo toxické a biodegradovateľné. Týmto kritériám vyhovujú biodegradovateľné polyestéry: PLA, PLGA, PCL, ktoré sa volia najčastejšie. Organickou fázou, v ktorej sa polymér rozpúšťa je najčastejšie acetón kvôli nízkej toxicite, ale môže sa použiť aj acetonitril, etanol, hexan, dioxan a iné, alebo aj zmesi acetónu s vodou alebo organickým rozpúšťadlom. Organická fáza sa môže ľahko odstrániť vyparovaním.

Vodná fáza je rozpúšťadlo, v ktorej je polymér nerozpustný, spravidla sa v ňom nachádza surfaktant. Zmenami podmienok nanoprecipitácie môžeme dostať

¹⁰ Zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Preparation-of-NPs-by-emulsion-evaporation-method_fig4_292671903 21.07.2018 4:31:52

nanočastice so žiaducimi vlastnosťami, ako sú veľkosť a stabilita. Napríklad musí byť vhodne zvolený typ aj koncentrácia surfaktantu, pretože to ovplyvňuje výsledné vlastnosti nanočastíc. (15)

Obrázok 3-11 Nonoprecipitácia¹¹



3.6.2.3 Vysol'ovanie

Vysol'ovanie na rozdiel od iných metód sa vyhýba použitiu surfaktantov a chlórovaných rozpúšťadiel, ktoré majú toxický vplyv na organizmus. Namiesto toho pri tejto metóde sa často krát používajú chlorid horečnatý, chlorid vápenatý a octan horečnatý, čím sa dosiahne salting-out efekt. Emulzia je formulovaná s polymérom rozpustným vo vode a emulgácia polyméru je dosiahnutá rozpúšťaním vysokej koncentrácie soli vo vodnej fáze. Táto metóda sa dá optimalizovať voľbou typu a koncentrácie salting-out agentu, typom použitého polyméru a rozpúšťadla. (15)

3.6.2.4 Technológia so superkritickou kvapalinou

Technológia so super kritickou kvapalinou je environmentálne bezpečnejšia metóda na prípravu nanočastíc. Pri jej prevedení nie je potrebné používať organické rozpúšťadla a získavajú sa nanočastice s vysokou čistotou. Sú dva možné spôsoby jej prevedenia:

¹¹ Zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Preparation-of-NPs-by-nanoprecipitation-method_fig3_29267190321.07.2018 4:33:24

1. RESS- rapid expansion of supercritical solution,
 2. RESOLV- rapid expansion of supercritical solution into liquid solvent.
- Nevýhodou RESS je nutnosť použitia PLA s malou molekulovou hmotnosťou a v nízkych koncentráciách. (15,21)

3.7 Fyzikálno-chemické vlastnosti nanočastíc

Celý osud nanočastíc v organizme závisí od ich fyzikálno-chemických vlastností. Úpravou jednotlivých vlastností nanočastice sa dá dosiahnuť, aby nanočastica pôsobila na presne určenom mieste. Optimalizácia týchto vlastností sa dá dosiahnuť úpravou jednotlivých faktorov pri príprave nanočastíc. Medzi tieto faktory patria: a) voľba vhodného polyméru, b) voľba vhodného rozpúšťadla, c) vhodná metóda prípravy.

3.7.1 Veľkosť častíc

Tento parameter je dôležitý preto, že má vplyv na mnohé aspekty. Jednak súvisí so stabilitou, ale tiež aj s rýchlosťou uvoľnenia liečivej látky a s tým, kam sa bude v organizme distribuovať. Nanočastice so svojou veľkosťou 1 až 1000 nm na rozdiel od mikročastíc, ktoré sú od nich väčšie, sú vhodnejšie k intravenóznemu podávaniu, pretože majú schopnosť sa dostať aj cez najmenšie kapiláry. (5)

Veľkosť častíc sa meria metódou dynamického rozptylu svetla, pri ktorej sa hodnotí hydrodynamický priemer. Častice vykonávajú Brownov pohyb, ktorý je závislý na viskozite, teplote a veľkosti častíc. Vzťah medzi veľkosťou častíc a rýchlosťou ich pohybu vyjadruje Stokes-Einsteinova rovnica. (17)

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Kde $d(H)$ je hydrodynamický priemer častice, k je Boltzmannova konštanta, T absolútna teplota, η viskozita disperzného prostredia, D koeficient difúzie.

3.7.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál (ZP) je elektrický potenciál, ktorý vzniká pri kontakte nanočastice s vodným roztokom na jej povrchu. Vysvetľuje správanie sa nanočastíc v suspenznej alebo emulznej formulácii. Slúži na predpovedanie stability nanočastíc. Veľkú

stabilitu majú nanočastice so zeta potenciálom ± 30 mV. Zeta potenciál môže nadobúdať kladné ale aj záporné hodnoty.(19,20)

4 Experimentálna časť

4.1 Použité suroviny

Pri experimentálnej časti boli použité nasledovné suroviny:

- Polymér – PLGA (1:1) (polylaktid-ko-glykolid), bol syntetizovaný na KFT, FaF, Hradec Králové;
- Surfaktanty:
 - ✓ Pluronic® F-127, Sigma-Aldrich, Praha,
 - ✓ Kolliphor® P-188, Sigma-Aldrich, Praha,
 - ✓ Span 20, Sigma-Aldrich, Praha,
 - ✓ Tween 20, Sigma-Aldrich, Praha,
 - ✓ Polyvinylalkohol, Sigma-Aldrich, Praha,
- Čistená voda (reverzná osmóza, FaF UK);
- Organické rozpúšťadlá
 - ✓ Dichlórmetán, Honeywell, Olomouc,
 - ✓ Acetón, Penta, Chrudím,
 - ✓ Etanol, Penta, Chrudím,
- Rodamín B, Sigma-Aldrich, Praha.

4.2 Použité prístroje

Pri experimentálnej časti boli použité nasledovné nástroje:

- Analytické váhy Ohaus discovery (Ohaus, Grefensee, Švajčiarsko), max. 210g, d=0,1 mg;
- Váhy Kern 440-53N (Kern, Balingen, Nemecko), max. 400g, d=0,01 g
- Homogenizátor Ultra Turrax T10 basic (IKA, Staufen, Nemecko) 8000-30000 ot./min., 6 pásiem
- Nanosizer ZS 90, (Malvern Panalytical, Malvern, Spojené kráľovstvo)
- Magnetická miešačka IKA-WERKE RT 5 power (IKA, Staufen, Nemecko), 100-1000 ot./min, Ika
- Stopky DS 35 ZPA PRAGOTRON (Pragotron, Praha, Česká republika)

- Spektrofotometer Helios γ (Thermo scientifica, Varšava, Poľsko)

4.3 Vlastnosti použitých surfaktantov

Kolliphor® P-188 a **Pluronic® F-127** sú to triblokové kopolyméry, ktoré slúžia na zlepšenie rozpustnosti a biologickej dostupnosti u účinných látok so zlou rozpustnosťou. Môžu sa použiť aj ako plastifikačné činidlo, solubilizátor a emulgátor. Kolliphor® P-188 má hodnotu hydrofilne-lipofilnej rovnováhy (ďalej HLB) > 24. Pluronic® F-127 HLB = 22. HLB vyjadruje polaritu molekuly. Relatívna molekulová hmotnosť (ďalej Mw) Kolliphoru® P-188 je 7,680 – 9,510 g/mol, Pluronicu® F-127 Mw= 12 600 g/mol.

Polyvinylalkohol - $(C_2H_4O)_x$, je syntetický polymér získaný hydrolýzou polyvinylacetátu. Je rozpustný vo vode a zmesi vody s alkoholmi. Rozpustnosť vo vode však klesá s molekulovou hmotnosťou. Využíva sa predovšetkým ako lubrikant v oftalmológii a používa sa aj ako stabilizátor pri príprave nanočastíc. Mw = 31 500-50 000g/mol, čiastočne hydrolyzovaný.

Span 20 - $C_{18}H_{34}O_6$, **Tween 20** - $C_{58}H_{114}O_{26}$, sú neionické surfaktanty s vysokou kompatibilitou a stabilitou. Sú to vysoko efektívne solubilizátory a emulgátory. Span 20 je získavaný dehydratáciou zo sorbitolu a Tweeny sa získavajú etoxyláciou Spanu. Rozpustnosť Spanu vo vodnom prostredí sa znižuje so stupňom etoxylácie. Span 20 má HLB = 16,7, Mw = 346,46 g/mol, Tween 20 HLB = 15,6 ; Mw = 1227,54 g/mol.

4.4 Použité metódy

V experimentálnej časti boli použité tri metódy:

- a) emulzná metóda,
- b) nanoprecipitácia,
- c) mikroenkapsulácia.

4.4.1 Emulzná metóda

Pomocou analytických váh sa naváži do šiestich kadičiek vopred pripravený polymér PLGA. Do troch kadičiek sa naváži po 25mg a do ďalších troch po 12,5mg polyméru PLGA. Do každej kadičky sa pridá 1ml organického rozpúšťadla - dichlórmetánu. Zvlášť do troch kadičiek sa pripraví 20 ml roztokov surfaktantu v troch koncentráciách nasledovne: 0,1%; 0,5%; 1%.

(Pozn.v prípade polyvinylalkoholu sa ešte pridá aj 6 ml etanolu do každej kadičky kvôli rozpustnosti). Použité rozpúšťadlo pri príprave roztokov surfaktantu je čistená voda. Pomocou pipety 10 ml roztokov surfaktantu pridáme do každej kadičky obsahujúci polymér, tak aby sme získali nasledovné roztoky:

Vzorka č.	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu
1.	12,5mg	0,1%
2.	12,5mg	0,5%
3.	12,5mg	1,0%
4.	25,0mg	0,1%
5.	25,0mg	0,5%
6.	25,0mg	1,0%

Do kadičky ponoríme hlavicu homogenizátora pod hladinu kvapaliny a dve minúty homogenizujeme s použitím maximálneho výkonu. Tento postup opakujeme u každého roztoku. Po homogenizácii do každej kadičky pridáme miešatko a uložíme ho na magnetické miešadlo. Roztoky ponecháme v digestore na magnetickej miešačke 2 hodiny až do odparenia organického rozpúšťadla. Po odparení organického rozpúšťadla sa roztoky príslušne zriedia a prefiltrujú. Použije sa 0,8 μ m membránový filter. Veľkosť nanočastíc sa potom meria pomocou prístroja Zetasizer. Pri meraní získame aj hodnotu index polydisperzity (PDI) a následne sa pomocou Zetasizeru nameria aj zeta potenciál.

4.4.2 Nanoprecipitácia

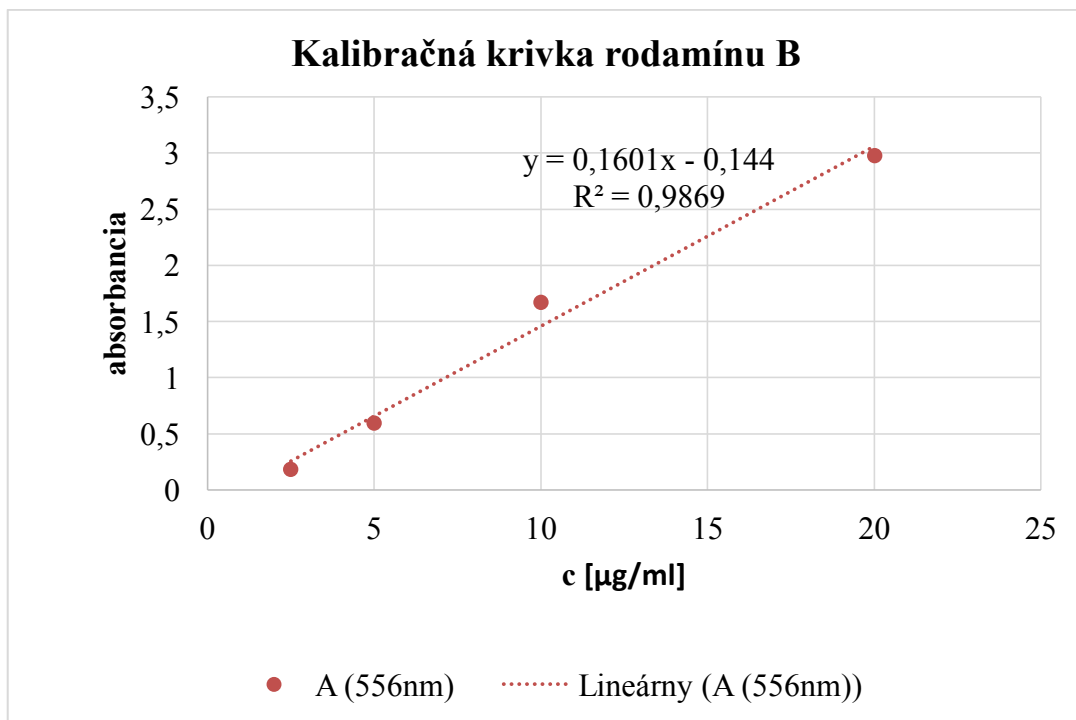
Pri nanoprecipitácii sa postupuje nasledovne:

Pomocou analytických váh sa naváži do šiestich kadičiek vopred pripravený polymér PLGA. Do troch kadičiek sa naváži po 25mg a do ďalších troch po 12,5mg polyméru PLGA. Zvlášť do šiestich kadičiek sa pripraví roztoky surfaktantu po dvoch kadičkách s koncentraciou 0,1%; 0,5% a 1%. Spolu sa pripraví šesť kadičiek surfaktantu. V každej kadičke je po 10 ml roztoku surfaktantu. Do kadičiek s polymérom PLGA pridáme 1 ml organického rozpúšťadla - acetónu, aby sa polymér rozpustil. Roztok potom nasajeme do injekčnej striekačky a po kvapkách pridáme do roztoku surfaktantu. Postupne si pripravíme roztoky. Do každej kadičky pridáme miešatko a uložíme ho do digestora na magnetické miešadlo. Roztoky sa miešajú zhruba dve hodiny až do odparenia organického rozpúšťadla. Po odparení organického rozpúšťadla sa roztoky zriedia. Pomocou Zetasizeru potom zistujeme veľkosť častíc, index polydisperzity a ich zeta potenciál.

4.4.3 Mikroenkapsulácia

Pomocou analytických váh sa naváži do šiestich kadičiek vopred pripravený polymér PLGA. Do troch kadičiek sa naváži po 25mg a do ďalších troch po 12,5mg polyméru PLGA. Do všetkých kadičiek sa potom pridá 250µg rodamínu B. Následne sa do každej kadičky pridá 1ml organického rozpúšťadla- dichlórmetánu. Zvlášť do troch kadičiek sa pripraví roztoky surfaktantu v troch koncentráciách nasledovne: 0,1%; 0,5%; 1%. Použité rozpúšťadlo pri príprave roztokov surfaktantu je čistená voda. Pomocou pipety 10 ml roztokov surfaktantu pridáme do každej kadičky obsahujúci polymér, tak aby sme získali roztoky. Do kadičky ponoríme hlavicu homogenizátora pod hladinu kvapaliny a dve minúty homogenizujeme použitím maximálneho výkonu. Tento postup opakujeme u každého roztoku. Po homogenizácii do každej kadičky pridáme miešatko a uložíme ho do digestora na magnetické miešadlo. Roztoky sa miešajú zhruba dve hodiny až do odparenia organického rozpúšťadla. Po odparení organického rozpúšťadla sa roztoky zriedia

a prefiltrujú. V tomto prípade sa realizujú dve filtrácie každého pripraveného roztoku. Pri prvej filtrácii sa použije membránový filter 0,45 μm a pri druhej filtrácii 0,20 μm . Po ukončení filtrácie sa pomocou spektrofotometra meria absorbancia rodamínu B pri vlnovej dĺžke 556 nm. Z nameraných hodnôt bola zostrojená kalibračná krivka (Obr. 4 – 1) a z nej získaná hodnota koncentrácie enkapsulovaného rodamínu B.



Obrázok 4-1 Kalibračná krivka rodamínu B

Na osi x je znázornená koncentrácia enkapsulovaného rodamínu B a na osi y je zobrazená absorbancia.

5 Výsledky

5.1 Emulzná metóda

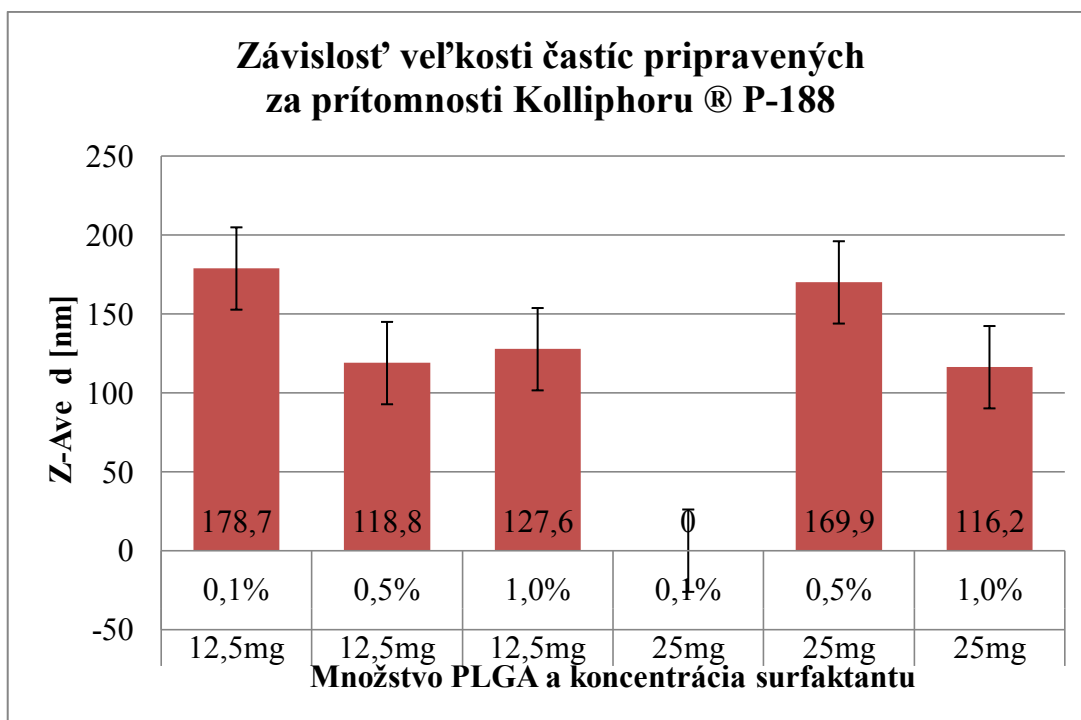
Použité skratky meraných veličín:

- ✓ Z-Ave- veľkosť častíc
- ✓ PDI- index polydisperzity
- ✓ ZP- zeta potenciál

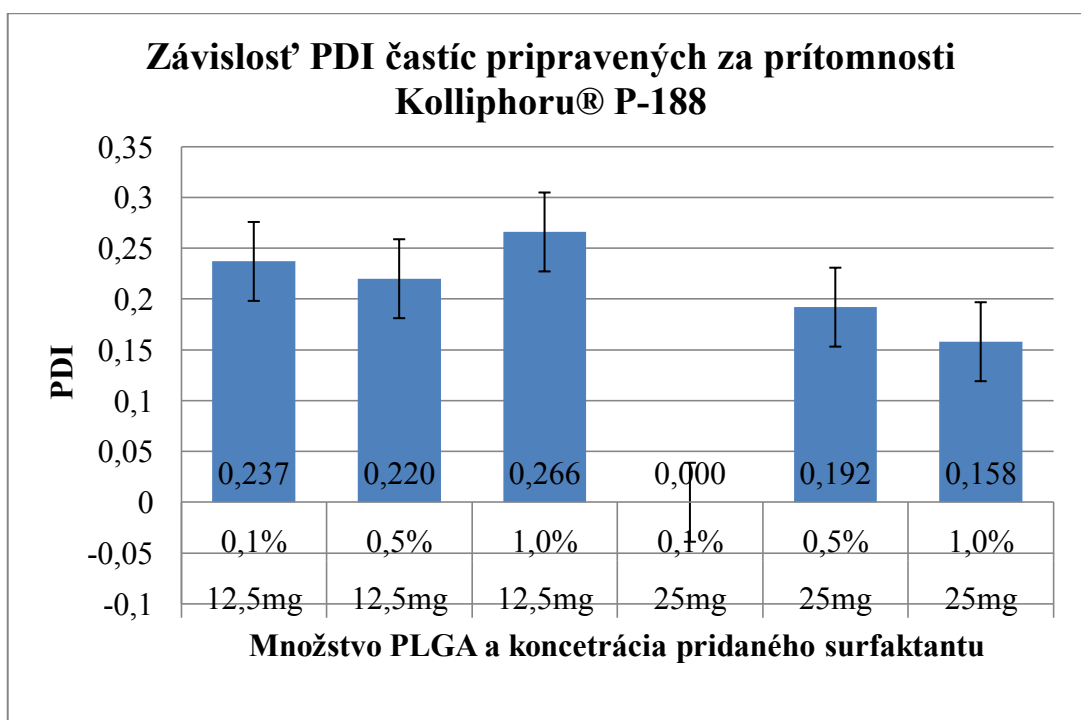
Tabuľka 5-1 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru ® P-188 pri emulznej metóde

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	178,7	±1,819	0,237	±0,010
č.2	12,5mg	0,5%	118,8	±0,700	0,220	±0,013
č.3	12,5mg	1,0%	127,6	±0,700	0,266	±0,016
č.4	25mg	0,1%	0	0	0	0
č.5	25mg	0,5%	169,9	±0,577	0,192	±0,004
č.6	25mg	1,0%	116,2	±0,500	0,158	±0,008

Poznámka: U vzorky č.4 polymér vypadol z roztoku a nedošlo ku vzniku nanočastíc



Graf 5-1 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde

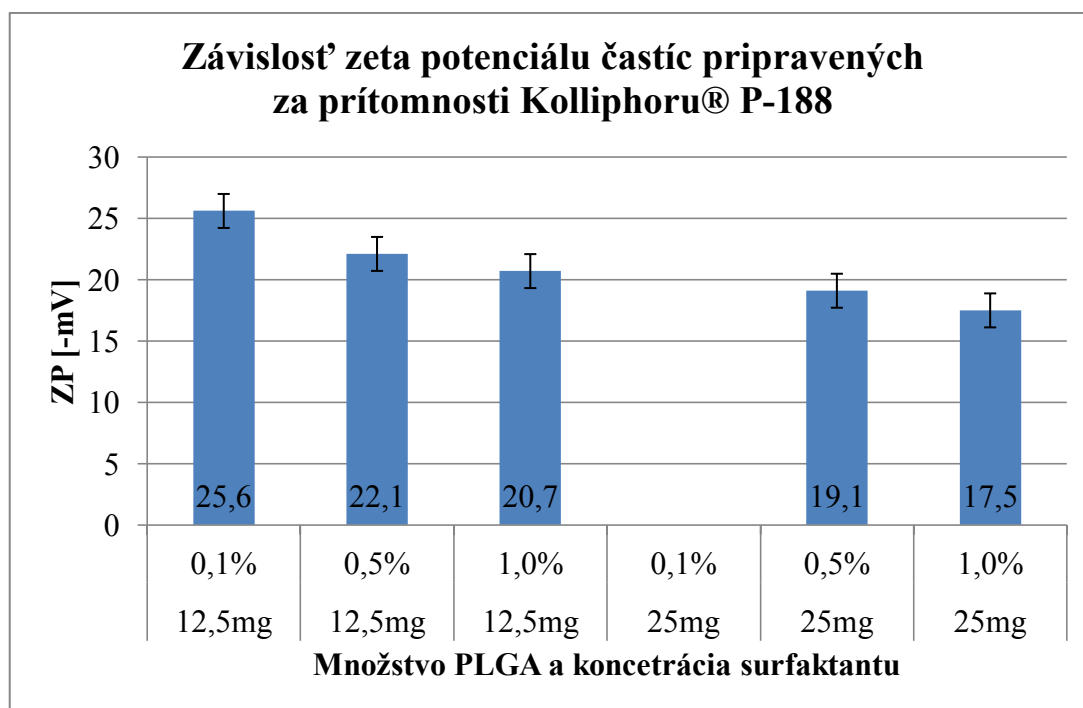


Graf 5-2 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde

Tabuľka 5-2 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-25,6	±1,760
č.2	12,5mg	0,5%	-22,1	±0,819
č.3	12,5mg	1,0%	-20,7	±0,666
č.4	25mg	0,1%		
č.5	25mg	0,5%	-19,1	±0,902
č.6	25mg	1,0%	-17,5	±0,569

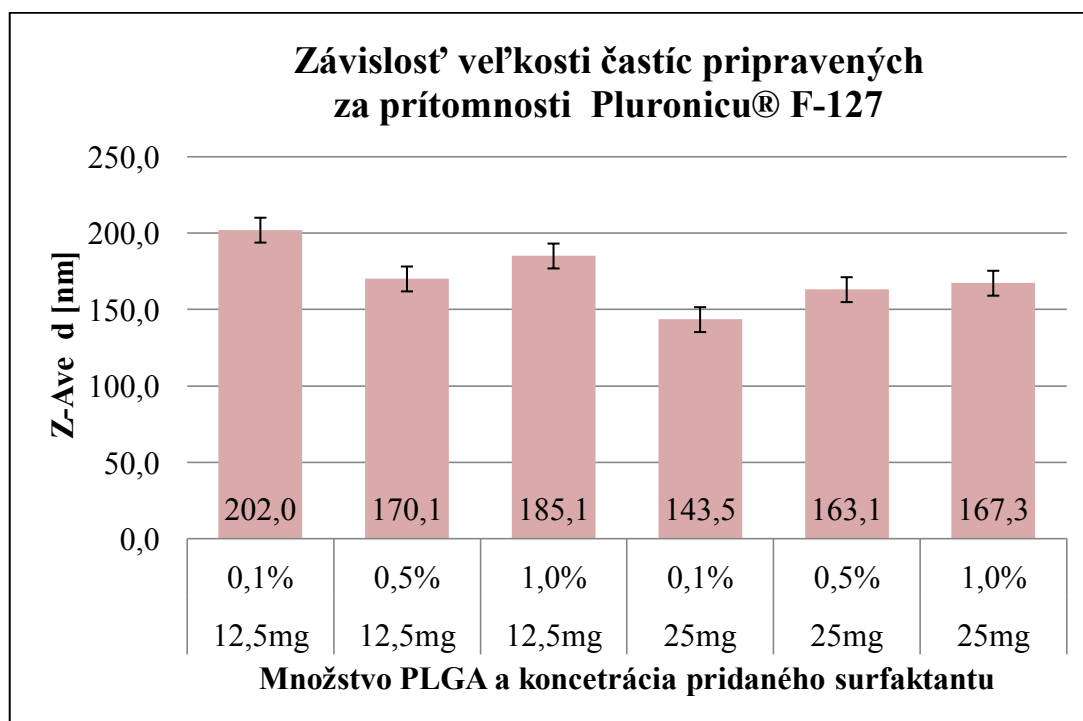
Poznámka: U vzorky č.4 ZP nameraná veličina.



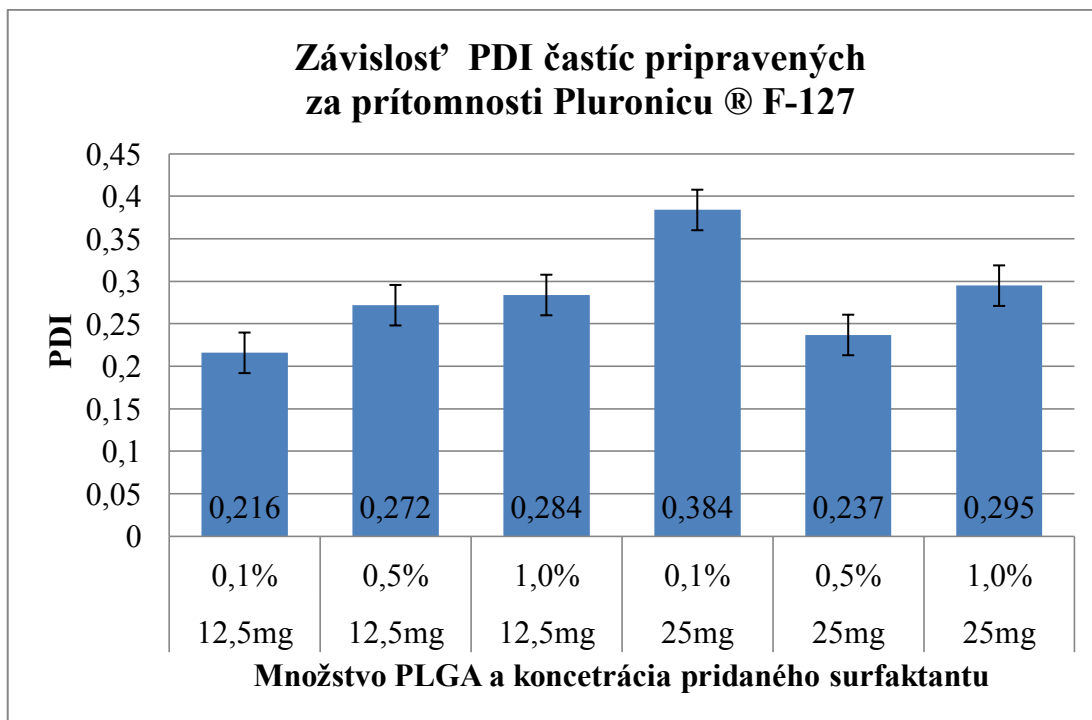
Graf 5-3 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde

Tabuľka 5-3 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	202,0	±0,6506	0,216	±0,018
č.2	12,5mg	0,5%	170,1	±3,3560	0,272	±0,033
č.3	12,5mg	1,0%	185,1	±0,4163	0,284	±0,011
č.4	25mg	0,1%	143,5	±1,7350	0,384	±0,014
č.5	25mg	0,5%	163,1	±0,0000	0,237	±0,000
č.6	25mg	1,0%	167,3	±1,4190	0,295	±0,024



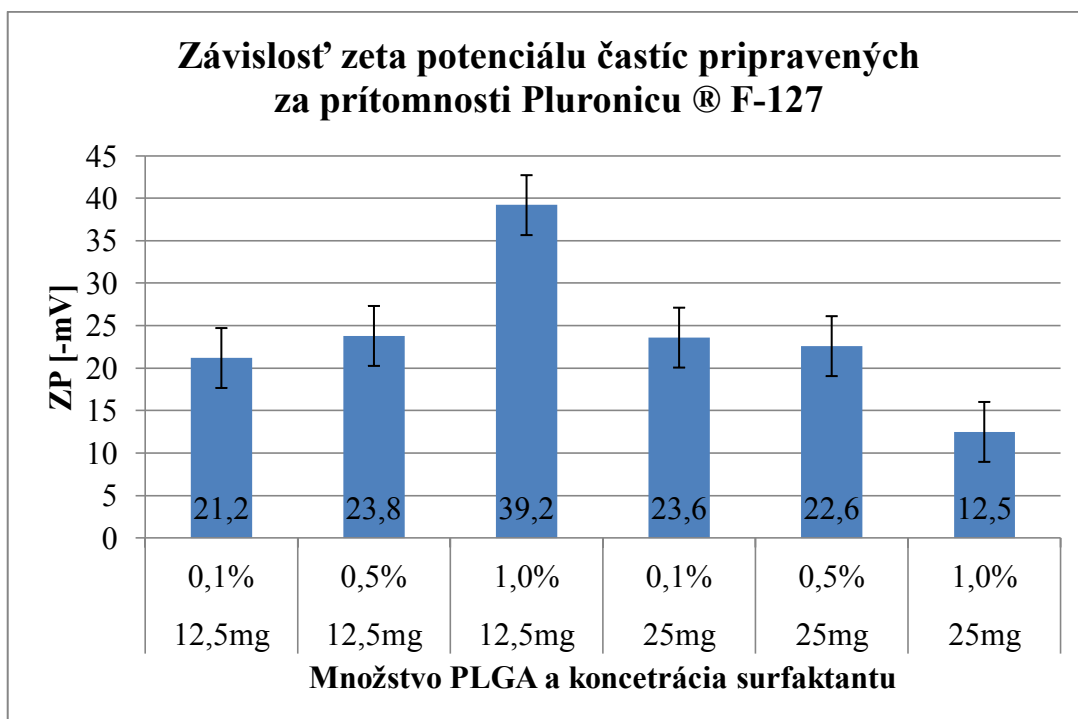
Graf 5-4 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde



Graf 5-5 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde

Tabuľka 5-4 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde

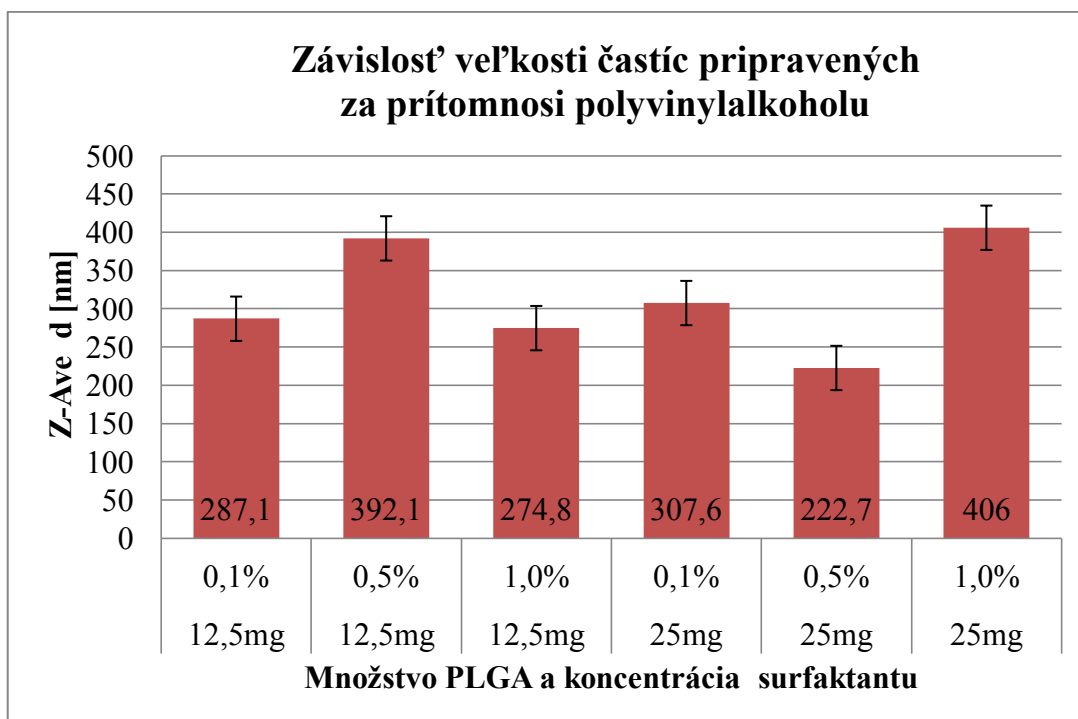
Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-21,2	±1,270
č.2	12,5mg	0,5%	-23,8	±0,666
č.3	12,5mg	1,0%	-39,2	±2,110
č.4	25mg	0,1%	-23,6	±0,907
č.5	25mg	0,5%	-22,6	±1,270
č.6	25mg	1,0%	-12,5	±1,150



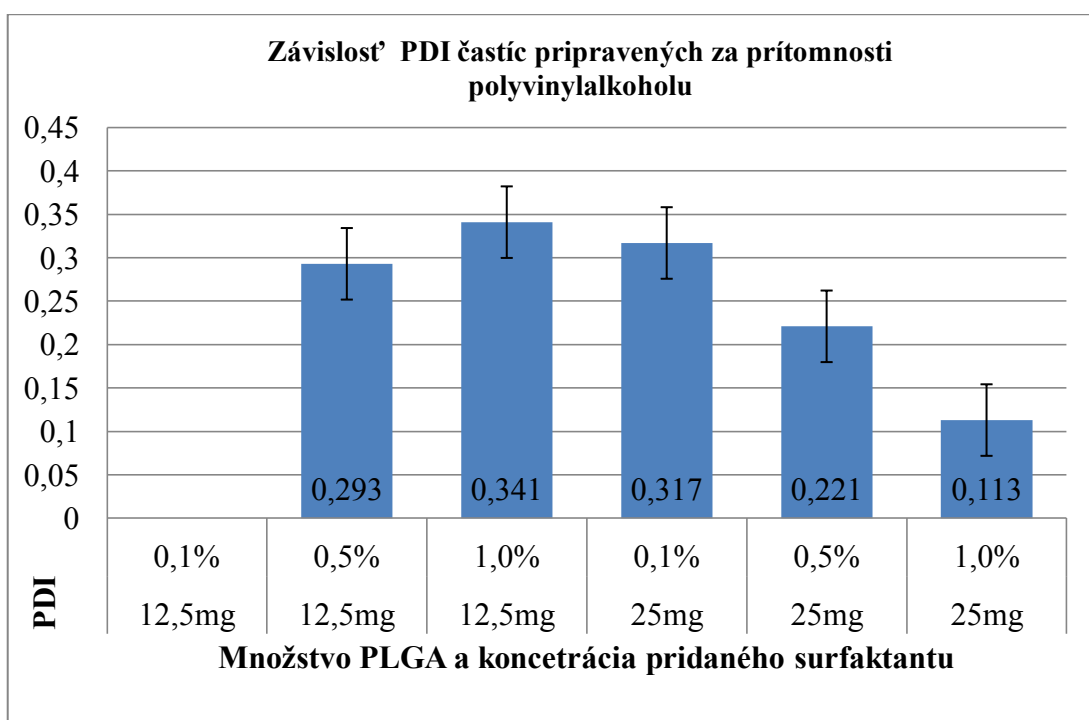
Graf 5-6 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde

Tabuľka 5-5 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	287,1	±0,707	1,910	±0,019
č.2	12,5mg	0,5%	392,1	0	0,293	0
č.3	12,5mg	1,0%	274,8	±5,991	0,341	±0,036
č.4	25mg	0,1%	307,6	±14,240	0,317	±0,023
č.5	25mg	0,5%	222,7	±6,930	0,221	±0,015
č.6	25mg	1,0%	406,0	±6,630	0,113	±0,056



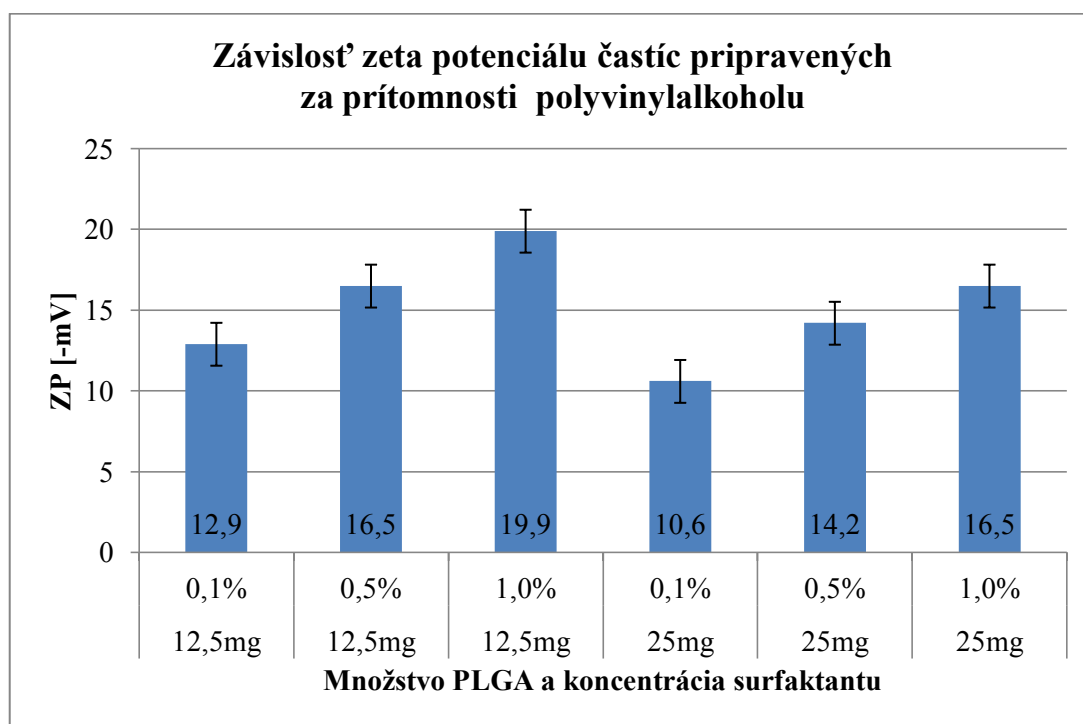
Graf 5-7 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde



Graf 5-8 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde

Tabuľka 5-6 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde

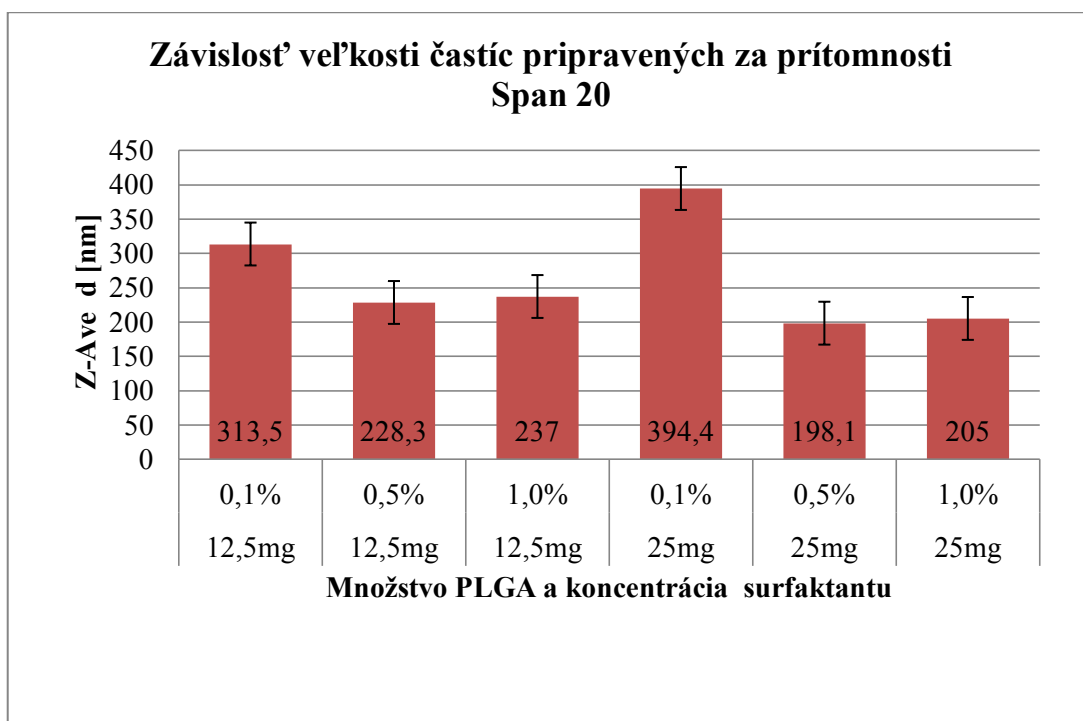
Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-12,9	±1,10
č.2	12,5mg	0,5%	-16,5	±1,81
č.3	12,5mg	1,0%	-19,9	±1,08
č.4	25mg	0,1%	-10,6	±1,11
č.5	25mg	0,5%	-14,2	0
č.6	25mg	1,0%	-16,5	0



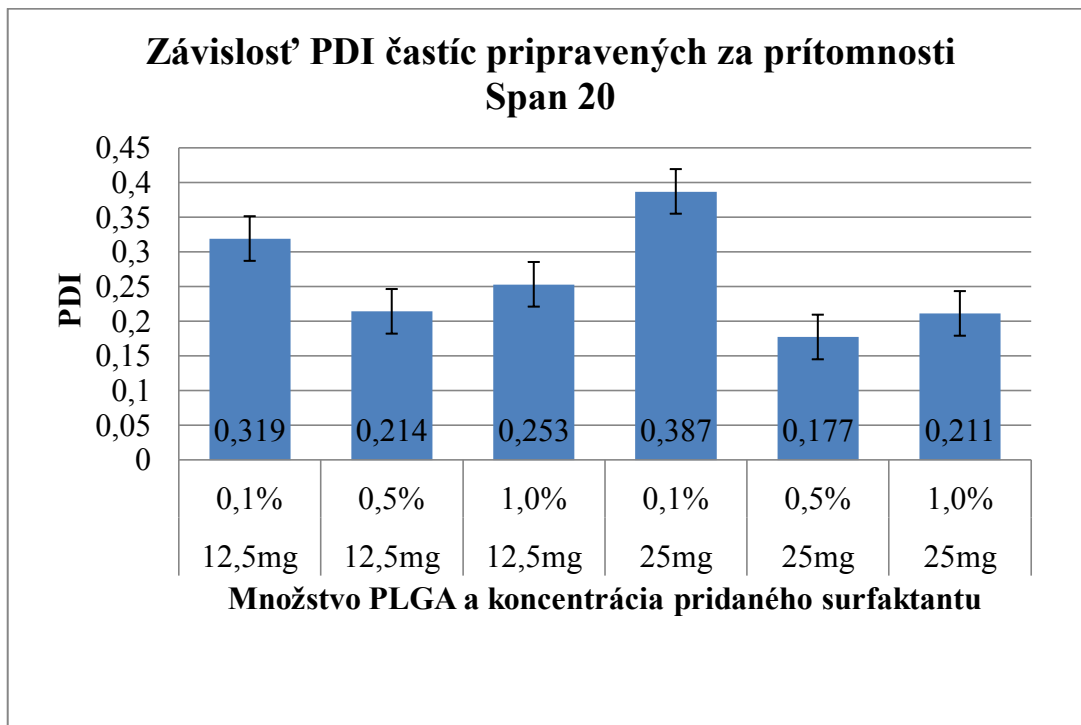
Graf 5-9 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde

Tabuľka 5-7 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	313,5	±4,375	0,319	±0,072
č.2	12,5mg	0,5%	228,3	±3,213	0,214	±0,023
č.3	12,5mg	1,0%	237,0	±2,358	0,253	±0,058
č.4	25mg	0,1%	394,4	±17,890	0,387	±0,037
č.5	25mg	0,5%	198,1	0	0,177	0
č.6	25mg	1,0%	205,0	±5,894	0,211	±0,020



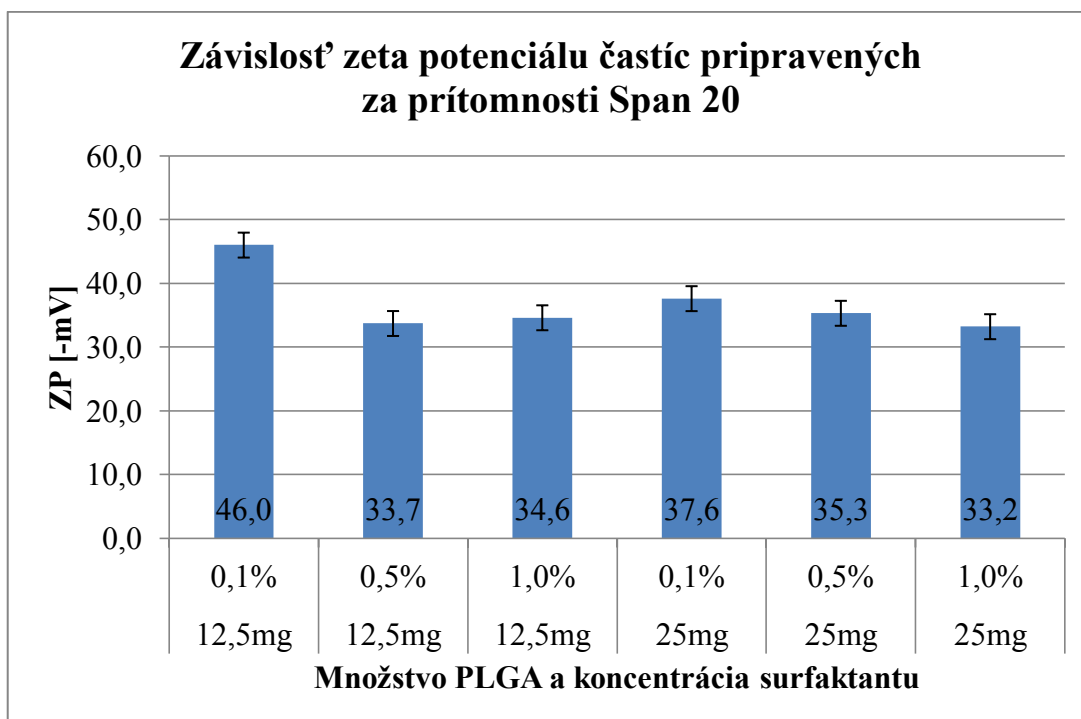
Graf 5-10 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde



Graf 5-11 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde

Tabuľka 5-8 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde

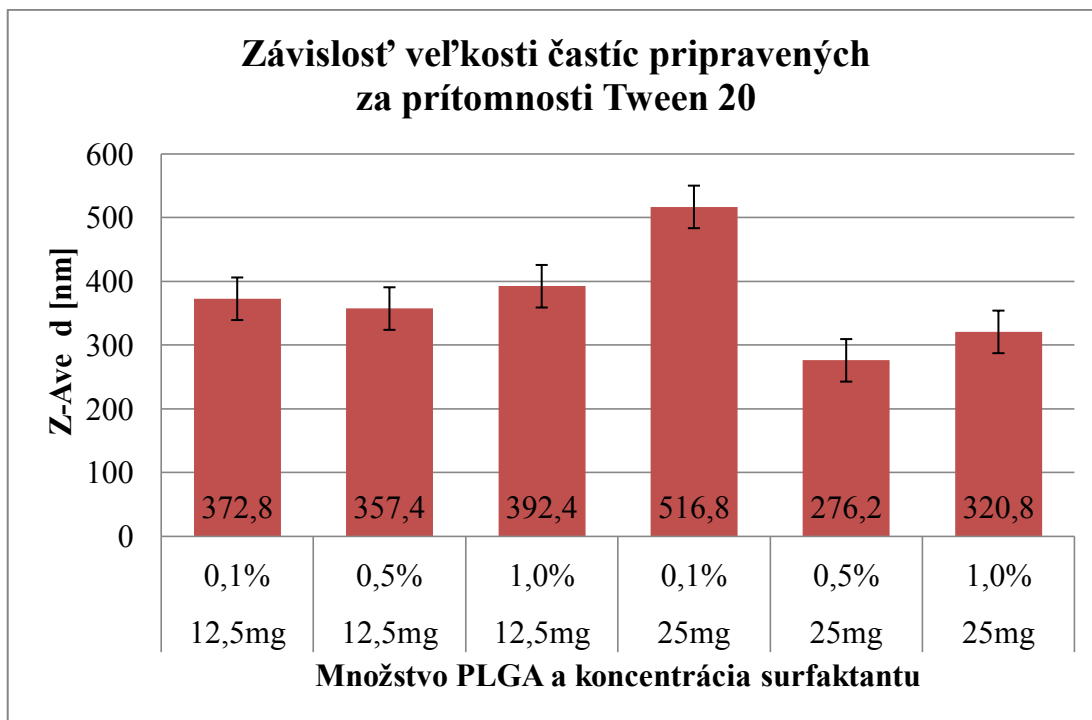
Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-46,0	±1,370
č.2	12,5mg	0,5%	-33,7	±0,404
č.3	12,5mg	1,0%	-34,6	±0,436
č.4	25mg	0,1%	-37,6	±1,540
č.5	25mg	0,5%	-35,3	±1,840
č.6	25mg	1,0%	-33,2	±0,700



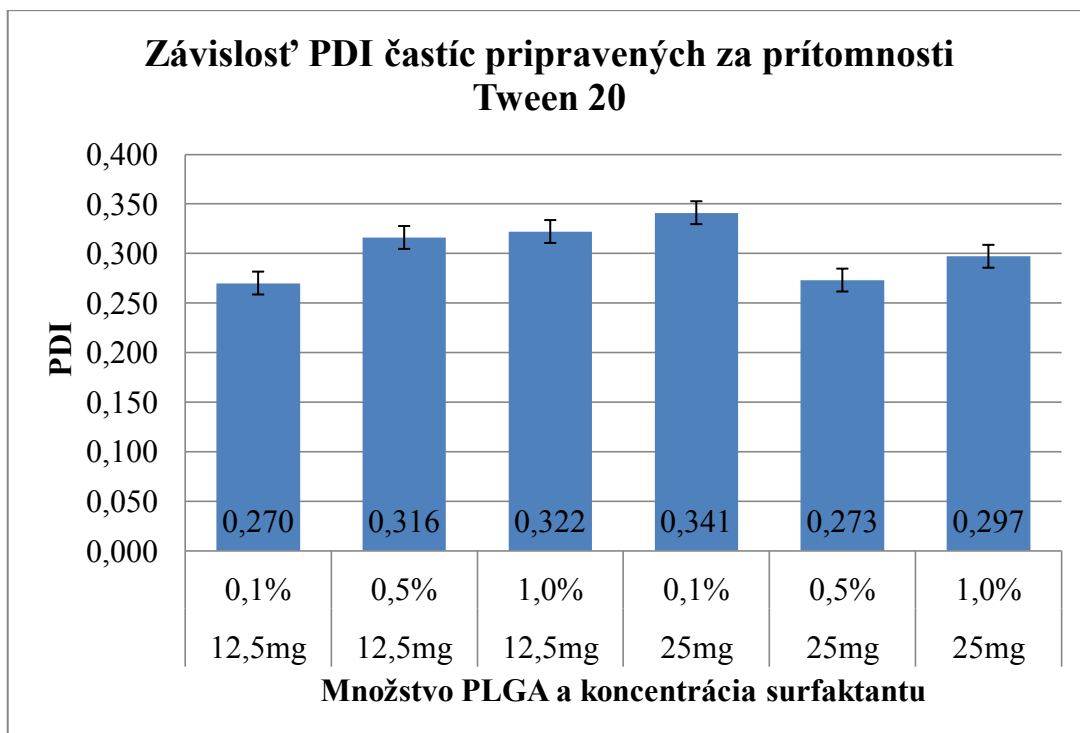
Graf 5-12 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde

Tabuľka 5-9 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	372,8	0	0,27	0
č.2	12,5mg	0,5%	357,4	±4,102	0,316	±0,011
č.3	12,5mg	1,0%	392,4	0	0,322	0
č.4	25mg	0,1%	516,8	0	0,341	0
č.5	25mg	0,5%	276,2	0	0,273	0
č.6	25mg	1,0%	320,8	0	0,297	0



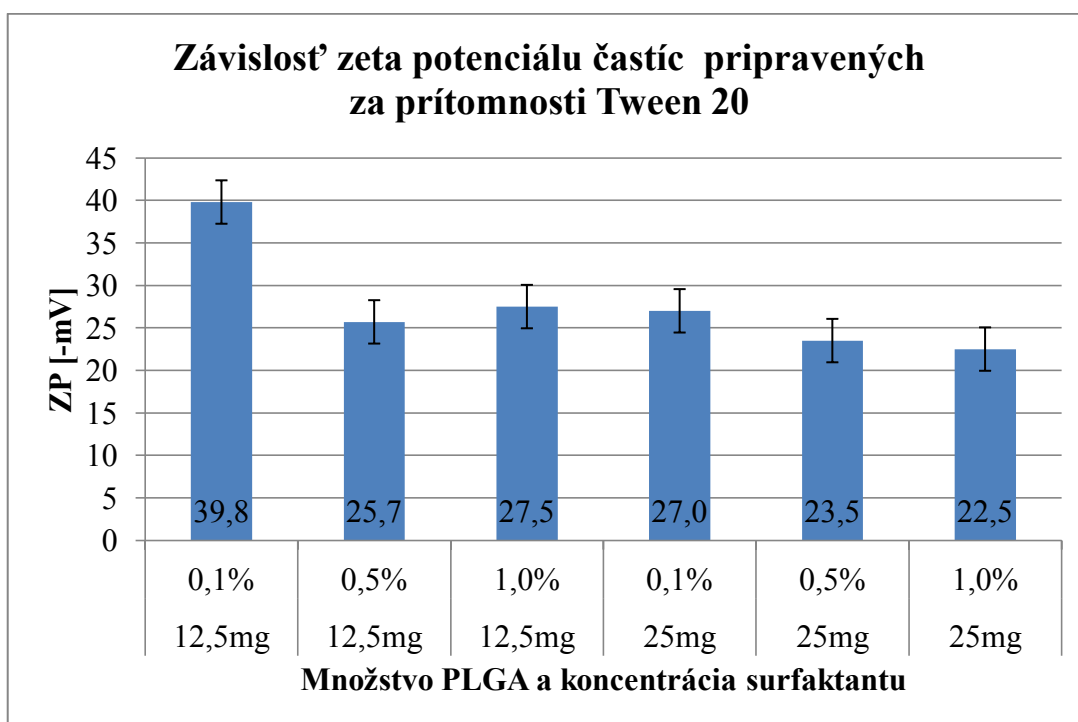
Graf 5-13 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde



Graf 5-14 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde

Tabuľka 5-10 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-39,8	±2,620
č.2	12,5mg	0,5%	-25,7	±2,100
č.3	12,5mg	1,0%	-27,5	±0,539
č.4	25mg	0,1%	-27,0	±1,200
č.5	25mg	0,5%	-23,5	0
č.6	25mg	1,0%	-22,5	0



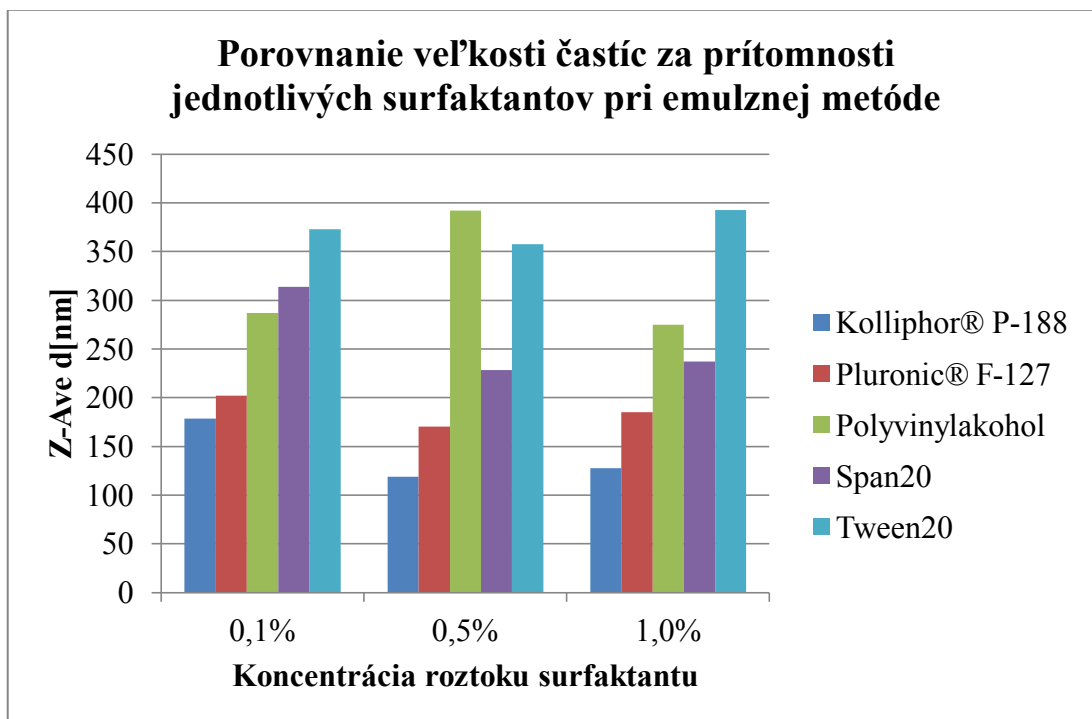
Graf 5-15 Závislosť zeta potenciálu častíc za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde

5.2 Porovnanie výsledkov pri emulznej metóde

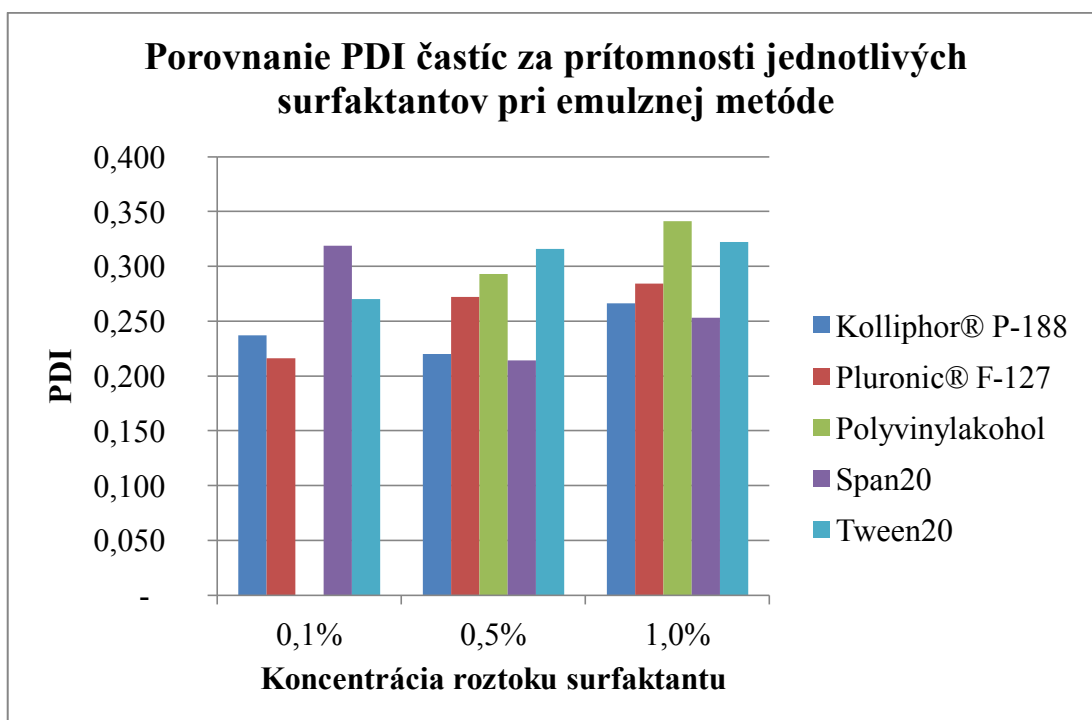
Tabuľka 5-11 Porovnanie výsledkov veľkosti častíc, PDI a ZP pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg

Názov surfaktantu	roztok	Priemerná Z-Ave d [nm]	Priemerný PDI	Priemerný ZP [mV]
Kolliphor® P-188	0,1%	178,7	0,237	-25,6
Kolliphor® P-188	0,5%	118,8	0,220	-22,1
Kolliphor® P-188	1,0%	127,6	0,266	-20,7
Pluronic® F-127	0,1%	202	0,216	-21,2
Pluronic® F-127	0,5%	170,1	0,272	-23,8
Pluronic® F-127	1,0%	185,1	0,284	-39,2
Polyvinylalkohol	0,1%	287,1	1,910	-12,9
Polyvinylalkohol	0,5%	392,1	0,293	-16,5
Polyvinylalkohol	1,0%	274,8	0,341	-19,9
Span20	0,1%	313,5	0,319	-46,0
Span20	0,5%	228,3	0,214	-33,7
Span20	1,0%	237,0	0,253	-34,6
Tween20	0,1%	372,8	0,270	-39,8
Tween20	0,5%	357,4	0,316	-25,7
Tween20	1,0%	392,4	0,322	-27,5

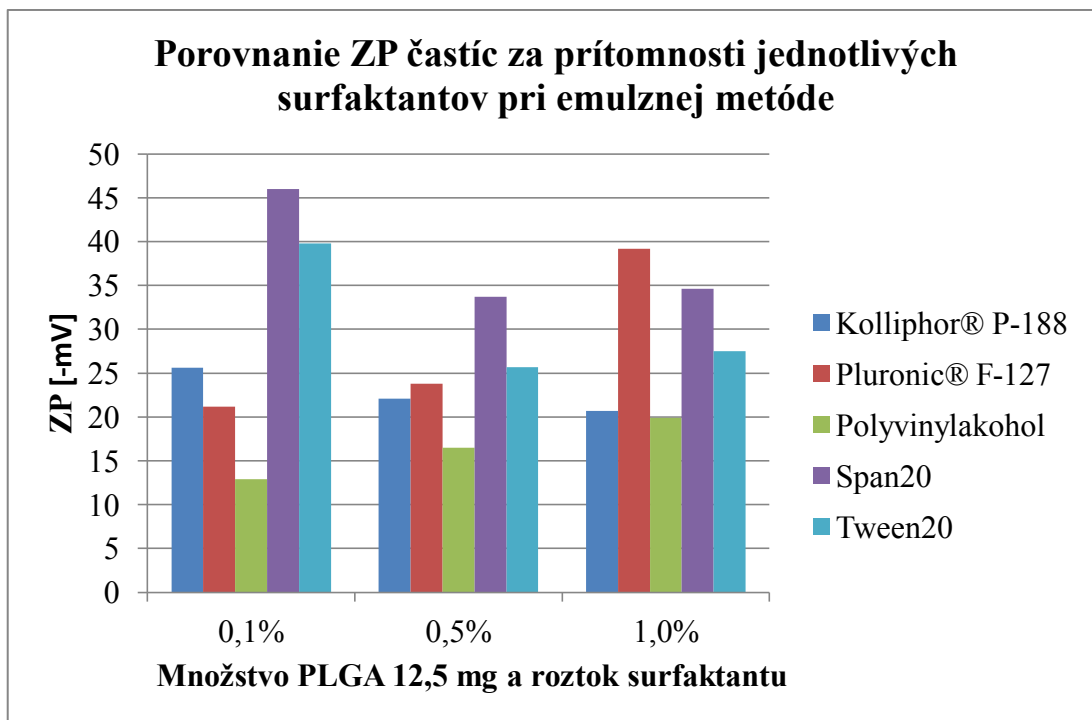
Graf 5-16 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg



Graf 5-17 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg



Graf 5-18 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg

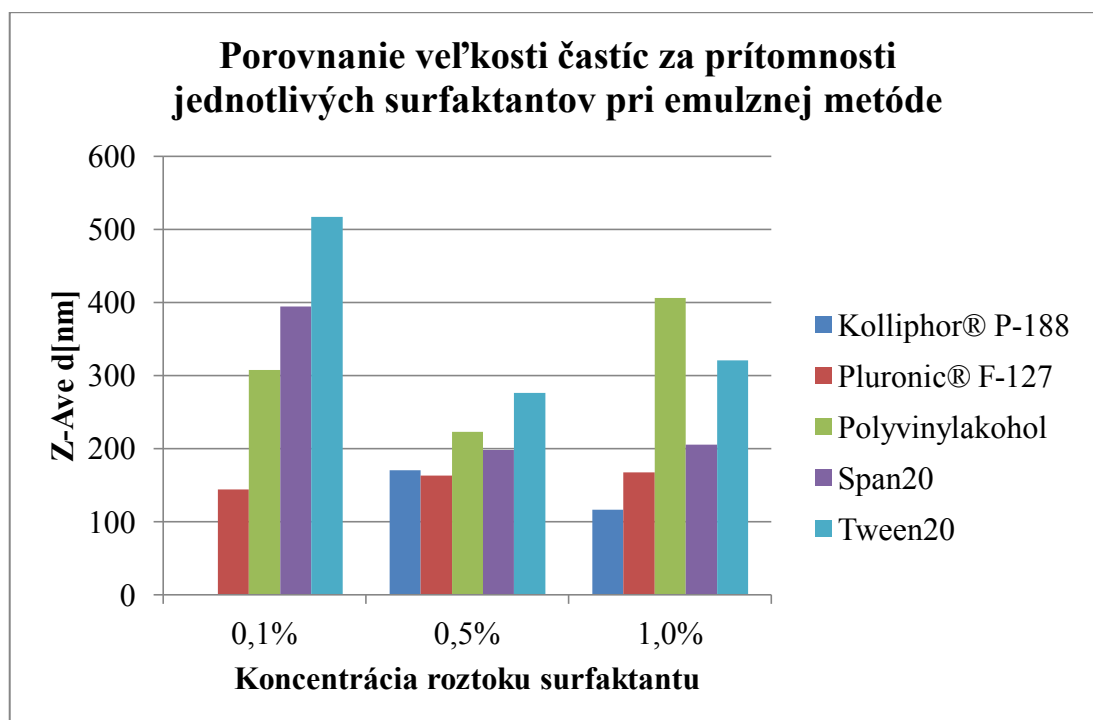


Tabuľka 5-12 Porovnanie veľkosti častíc, PDI a ZP pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25 mg

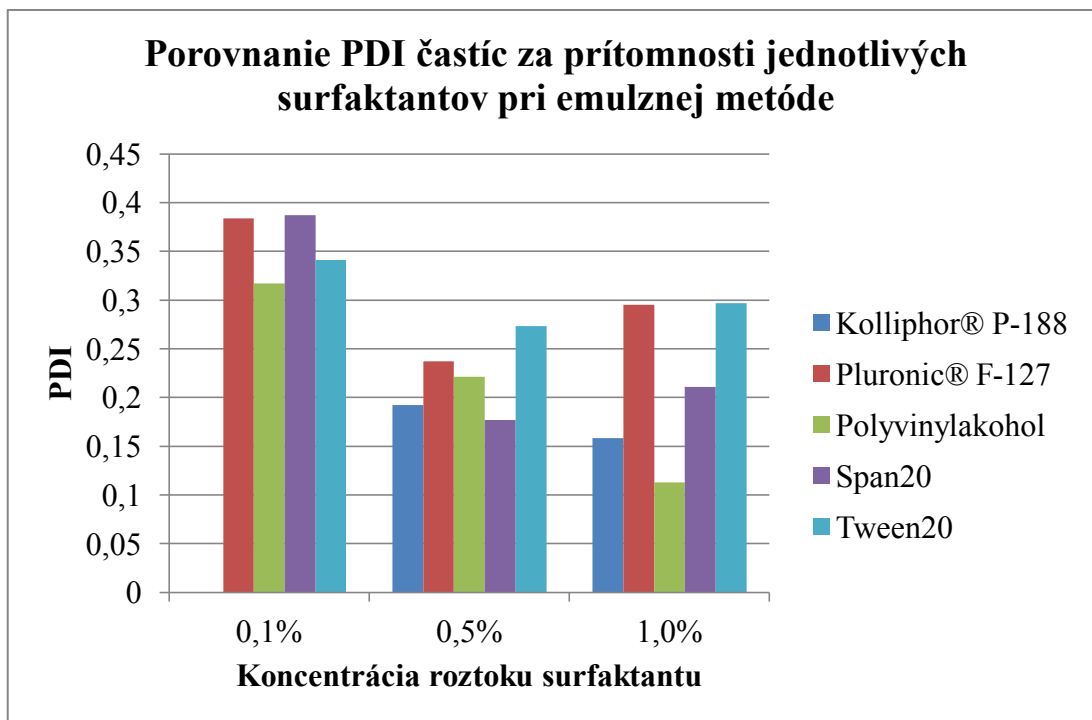
Názov surfaktantu	roztok	Priemerná Z-Ave d [nm]	Priemerný PDI	Priemerný ZP [mV]
Kolliphor® P-188	0,1%	0		
Kolliphor® P-188	0,5%	169,9	0,192	-19,1
Kolliphor® P-188	1,0%	116,2	0,158	-17,5
Pluronic® F-127	0,1%	143,5	0,384	-23,6
Pluronic® F-127	0,5%	163,1	0,237	-22,6
Pluronic® F-127	1,0%	167,3	0,295	-12,5
Polyvinylakohol	0,1%	307,6	0,317	-10,6
Polyvinylakohol	0,5%	222,7	0,221	-14,2
Polyvinylakohol	1,0%	406,0	0,113	-16,5
Span20	0,1%	394,4	0,387	-37,6

Názov surfaktantu	roztok	Priemerná Z-Ave d [nm]	Priemerný PDI	Priemerný ZP [mV]
Span20	0,5%	198,1	0,177	-35,3
Span20	1,0%	205,0	0,211	-33,2
Tween20	0,1%	516,8	0,341	-27,0
Tween20	0,5%	276,2	0,273	-23,5
Tween20	1,0%	320,8	0,297	-22,5

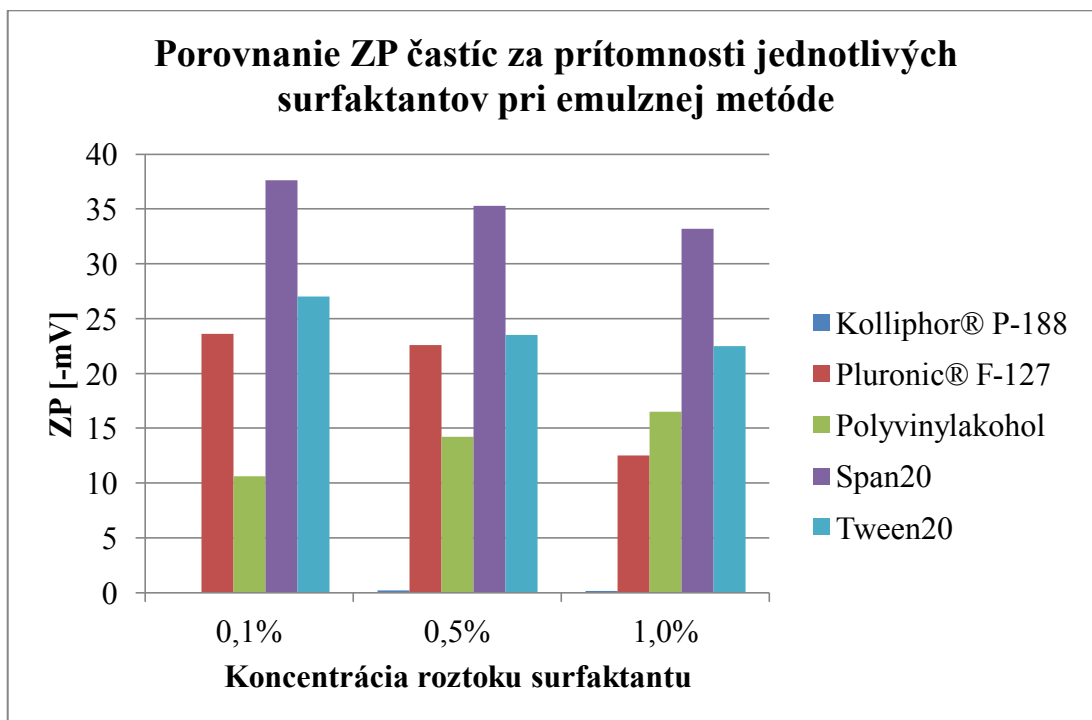
Graf 5-19 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25 mg



Graf 5-20 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25 mg



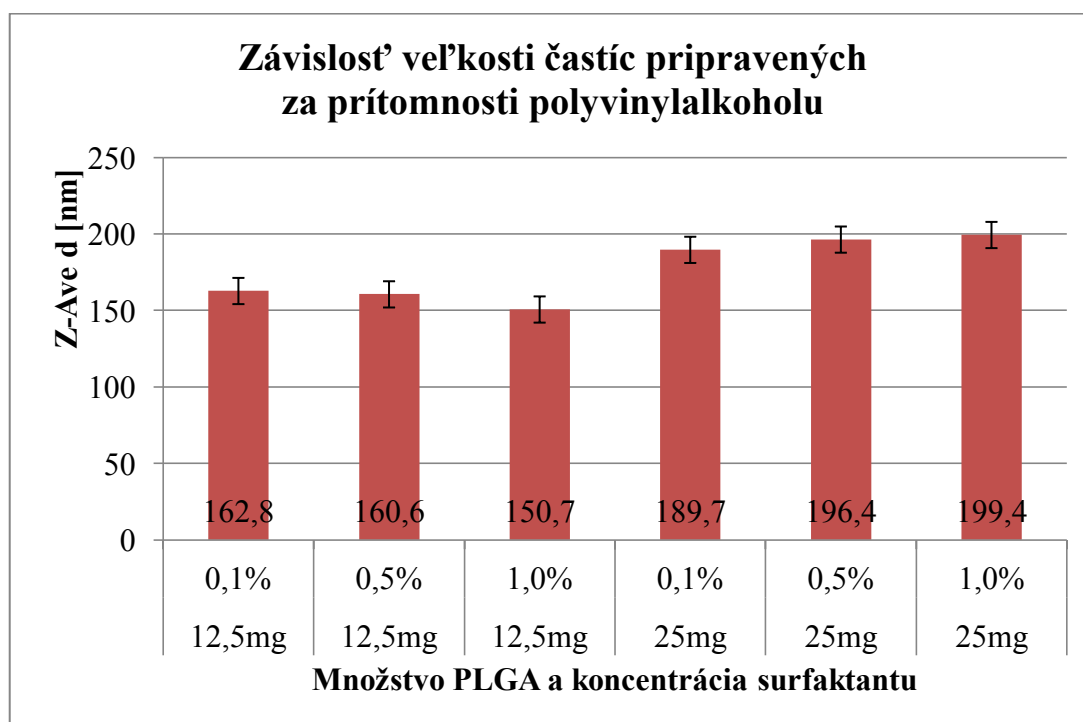
Graf 5-21 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25mg



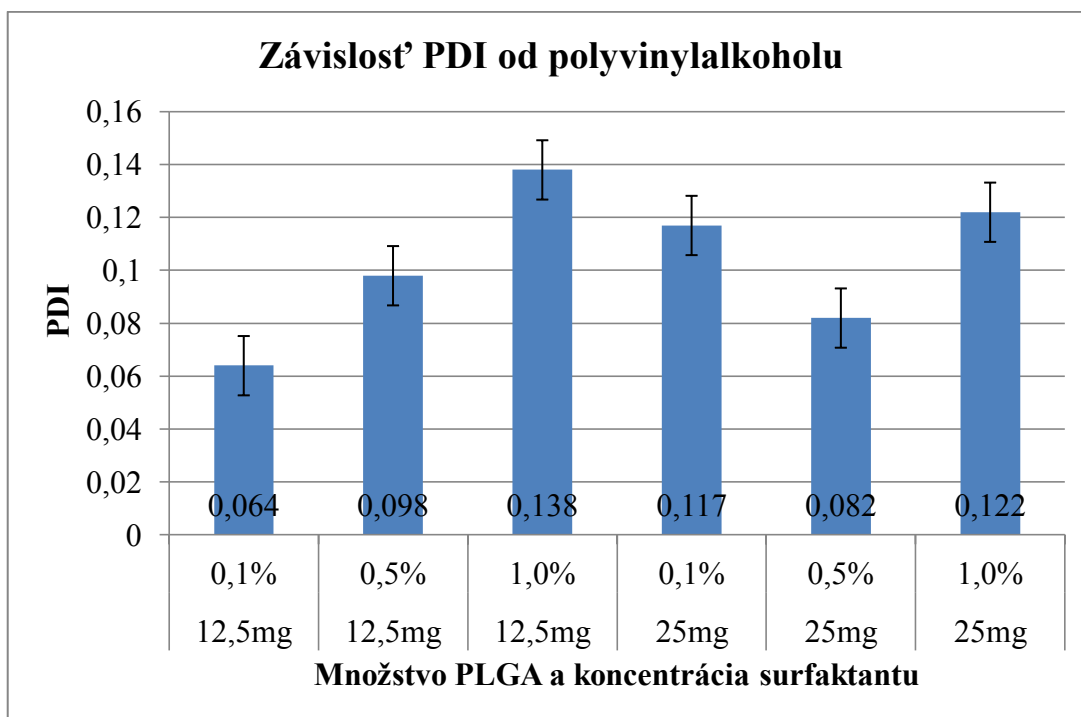
5.3 Nanoprecipitácia

Tabuľka 5-13 Veľkosť častíc a PDI pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	162,8	±1,015	0,064	±0,019
č.2	12,5mg	0,5%	160,6	±1,002	0,098	±0,020
č.3	12,5mg	1,0%	150,7	±0,600	0,138	±0,028
č.4	25mg	0,1%	189,7	±0,651	0,117	±0,027
č.5	25mg	0,5%	196,4	±2,074	0,082	±0,027
č.6	25mg	1,0%	199,4	±1,124	0,122	±0,024



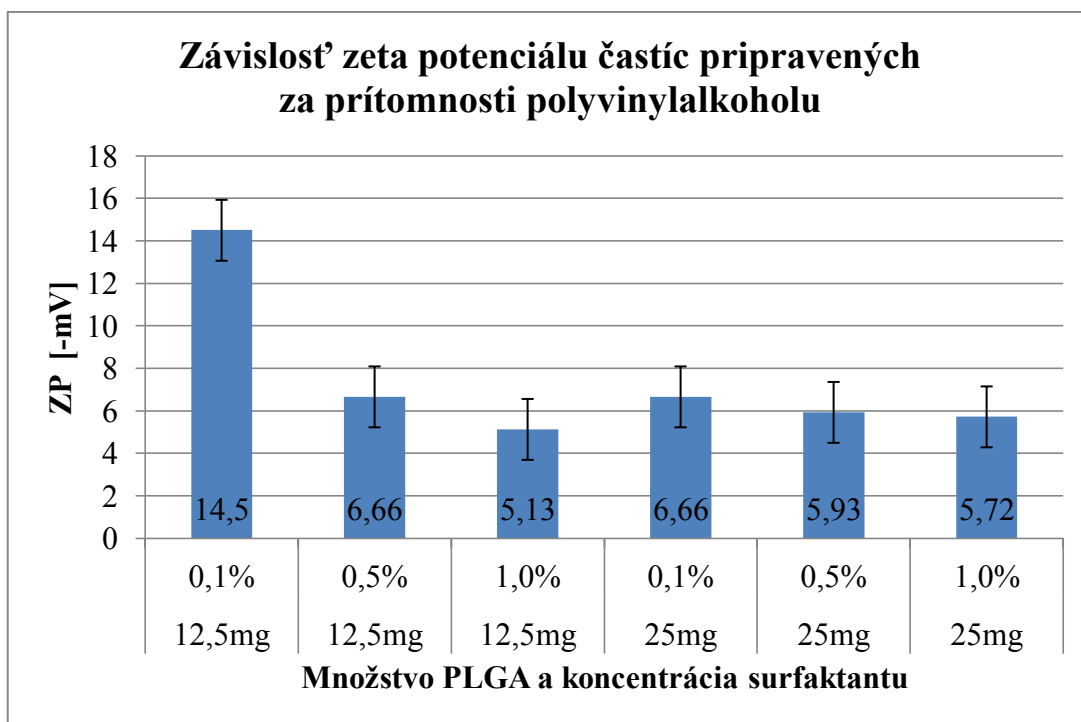
Graf 5-22 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii



Graf 5-23 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii

Tabuľka 5-14 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-14,5	±0,173
č.2	12,5mg	0,5%	-6,66	±1,510
č.3	12,5mg	1,0%	-5,13	±1,080
č.4	25mg	0,1%	-6,66	±1,610
č.5	25mg	0,5%	-5,93	0
č.6	25mg	1,0%	-5,72	0

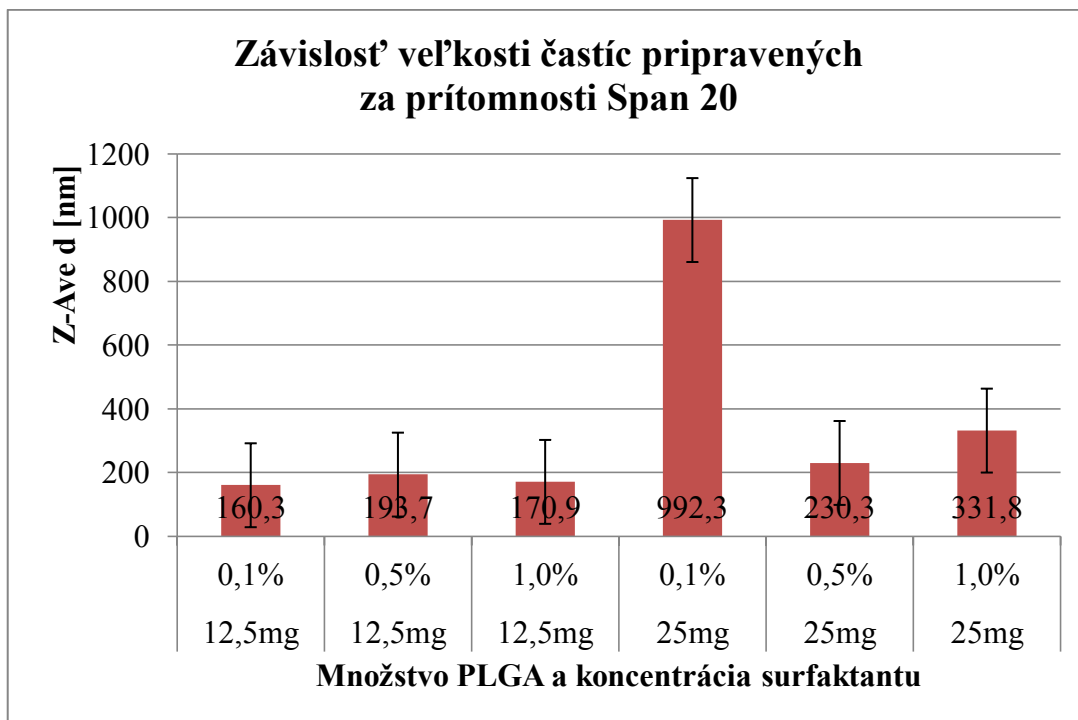


Graf 5-24 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii

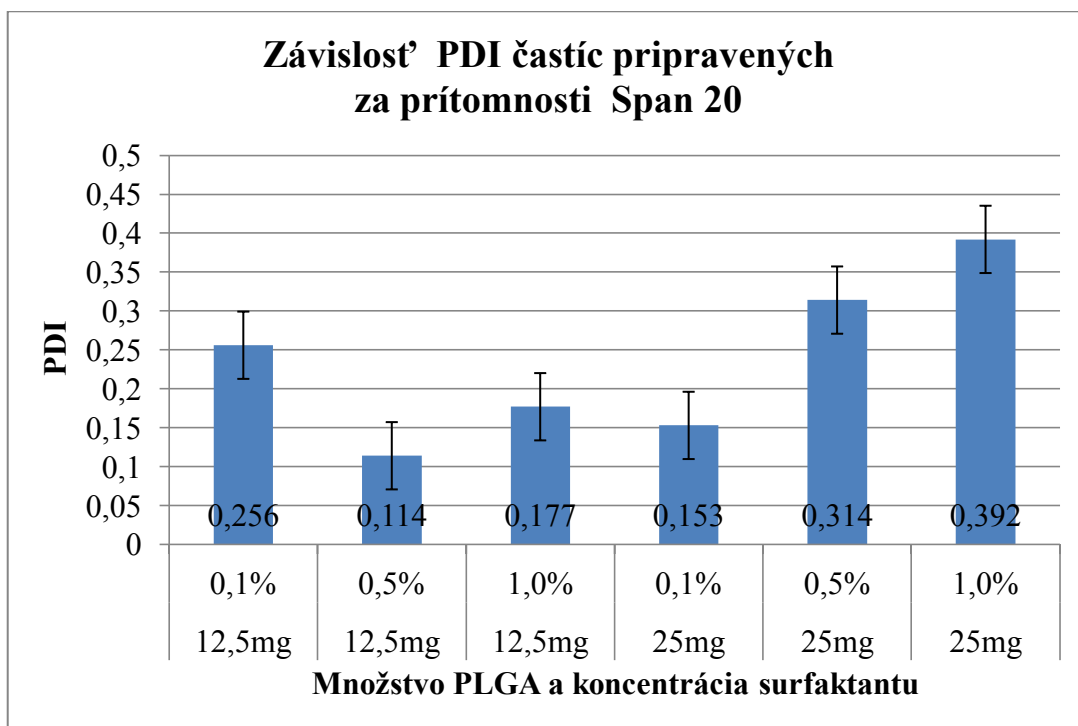
Tabuľka 5-15 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná Odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	160,3	±1,301	0,256	±0,018
č.2	12,5mg	0,5%	193,7	±3,553	0,114	±0,007
č.3	12,5mg	1,0%	170,9	±1,664	0,177	±0,017
č.4	25mg	0,1%	992,3	±28,94	0,153	±0,134
č.5	25mg	0,5%	230,3	0	0,314	0
č.6	25mg	1,0%	331,8	0	0,392	0

Poznámka: Pri vzorkách č. 2 a č.3 bola nutná filtrácia (membránový filter 0,8 µm).



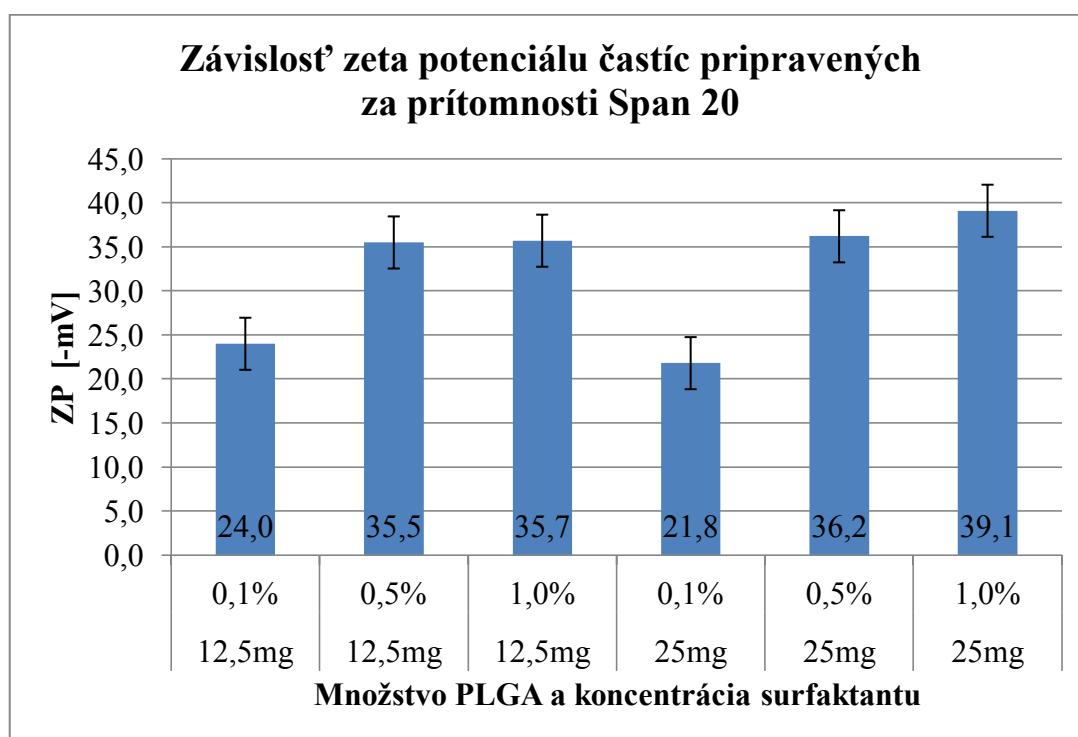
Graf 5-25 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii



Graf 5-26 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii

Tabuľka 5-16 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii

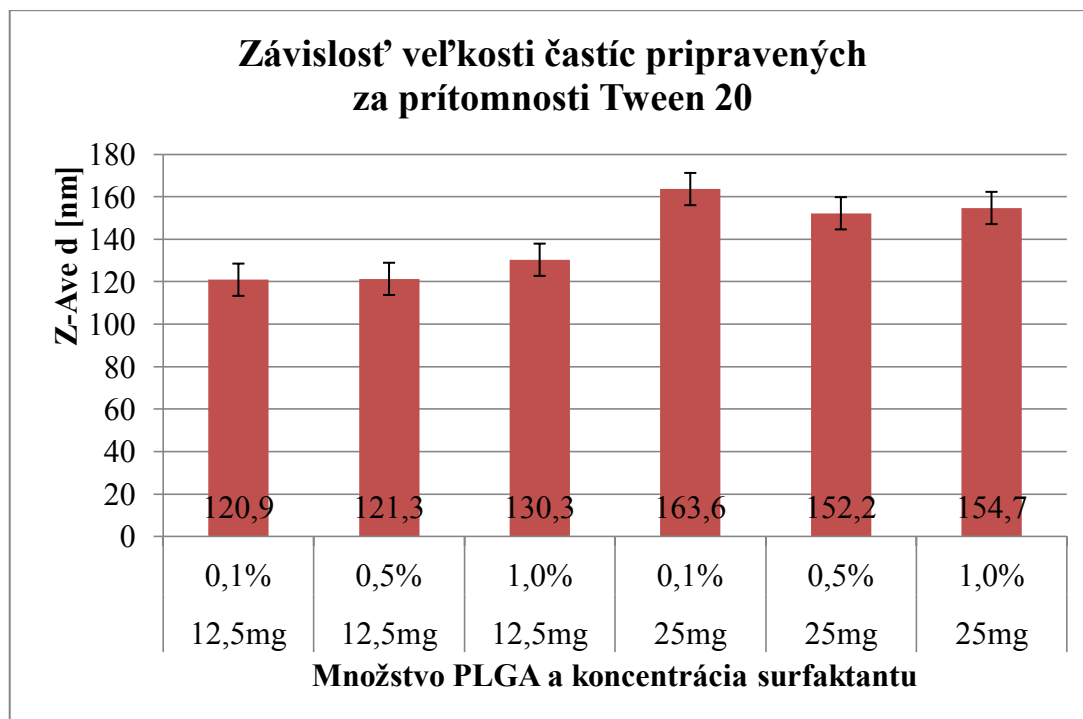
Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-24,0	±0,058
č.2	12,5mg	0,5%	-35,5	±1,190
č.3	12,5mg	1,0%	-35,7	±2,420
č.4	25mg	0,1%	-21,8	0
č.5	25mg	0,5%	-36,2	±0,566
č.6	25mg	1,0%	-39,1	±1,350



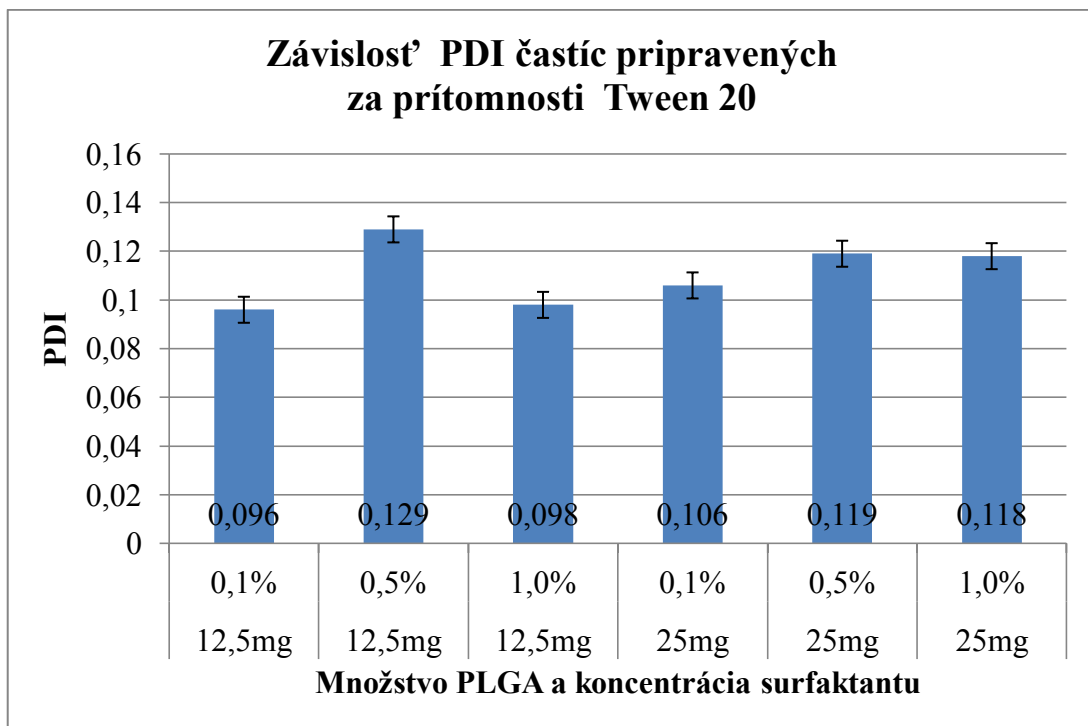
Graf 5-27 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii

Tabuľka 5-17 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	120,9	±0,700	0,096	±0,021
č.2	12,5mg	0,5%	121,3	±0,656	0,129	±0,024
č.3	12,5mg	1,0%	130,3	±2,066	0,098	±0,023
č.4	25mg	0,1%	163,6	±1,762	0,106	±0,014
č.5	25mg	0,5%	152,2	±2,339	0,119	±0,009
č.6	25mg	1,0%	154,7	±2,026	0,118	±0,014



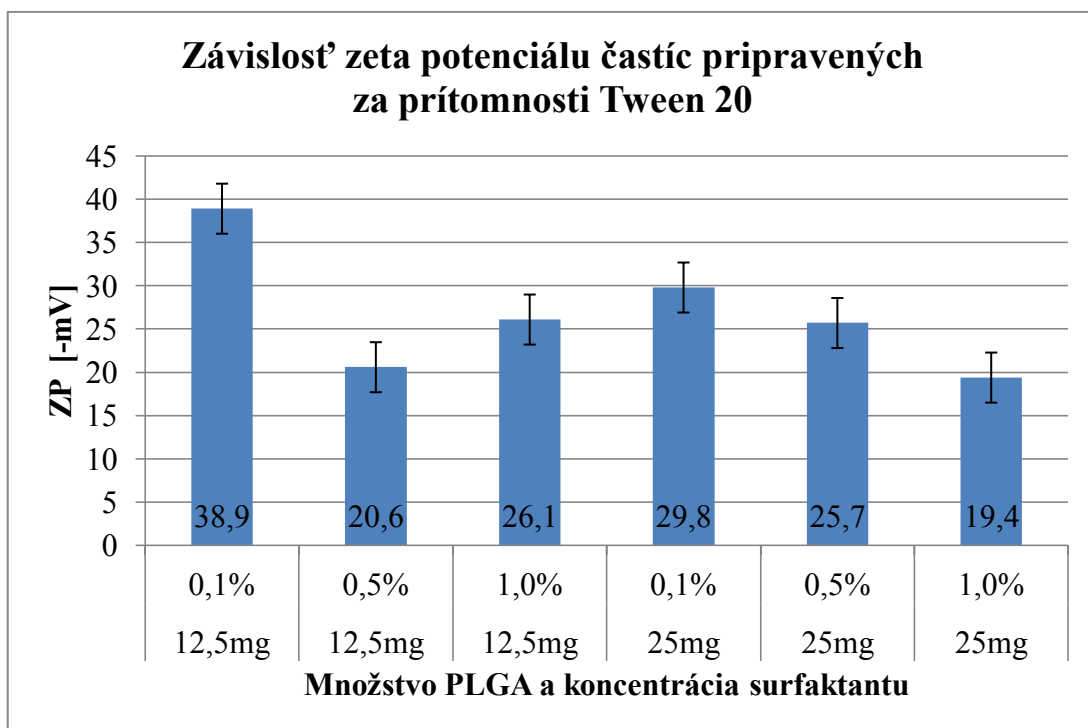
Graf 5-28 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii



Graf 5-29 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii

Tabuľka 5-18 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerný ZP [mV]	Smerodajná odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-38,9	0
č.2	12,5mg	0,5%	-20,6	±0,404
č.3	12,5mg	1,0%	-26,1	±0,854
č.4	25mg	0,1%	-29,8	±0,566
č.5	25mg	0,5%	-25,7	±0,971
č.6	25mg	1,0%	-19,4	0



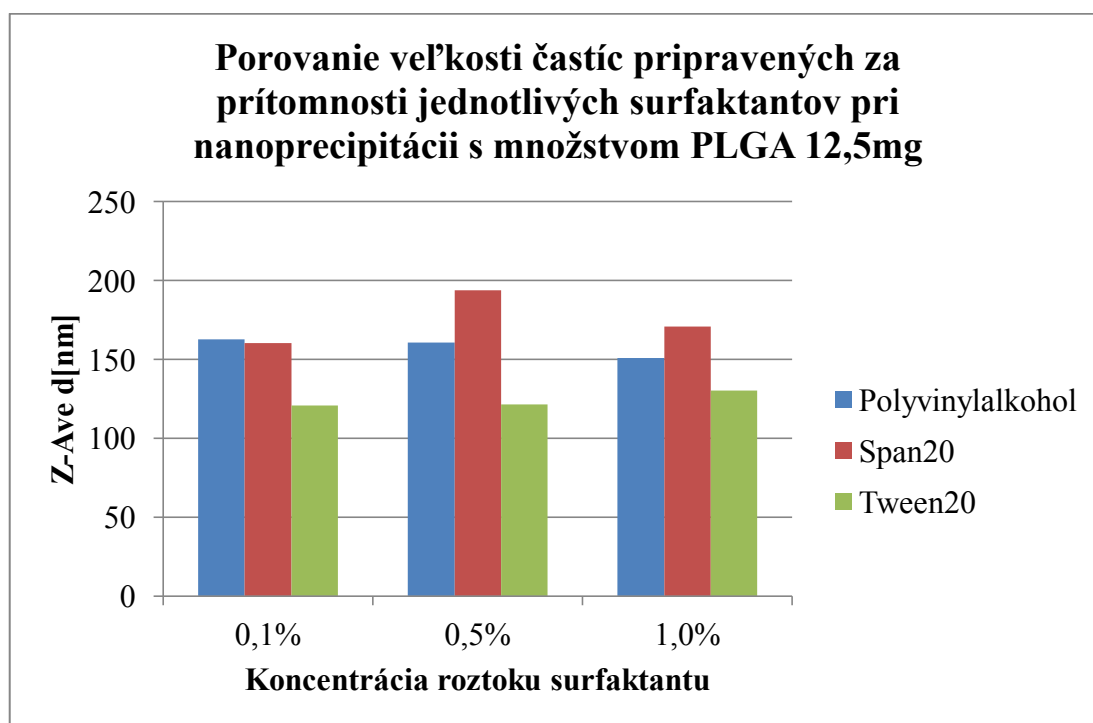
Graf 5-30 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii

5.4 Porovnanie výsledkov pri nanoprecipitácii

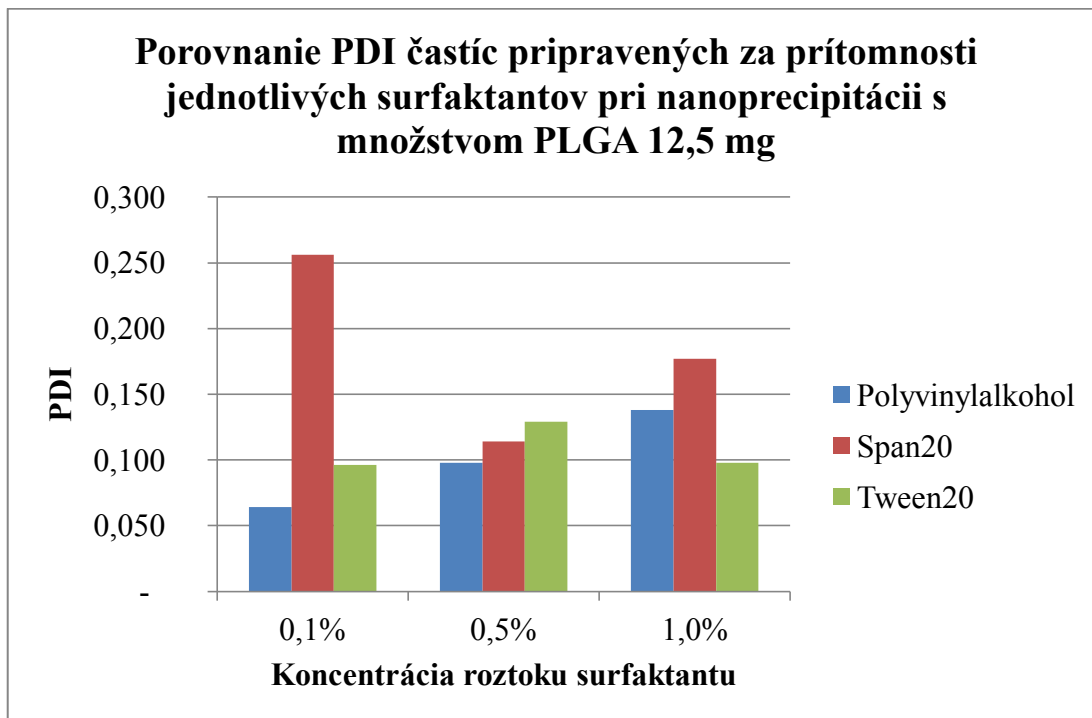
Tabuľka 5-19 Porovnanie veľkosti častíc pripravených za prítomnosti surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg

Názov surfaktantu	roztok	Priemerná Z-Ave d [nm]	Priemerný PDI	Priemerný ZP [mV]
Polyvinylalkohol	0,1%	162,8	0,064	-14,5
Polyvinylalkohol	0,5%	160,6	0,098	-6,66
Polyvinylalkohol	1,0%	150,7	0,138	-5,13
Span20	0,1%	160,3	0,256	-24,0
Span20	0,5%	193,7	0,114	-35,5
Span20	1,0%	170,9	0,177	-35,7

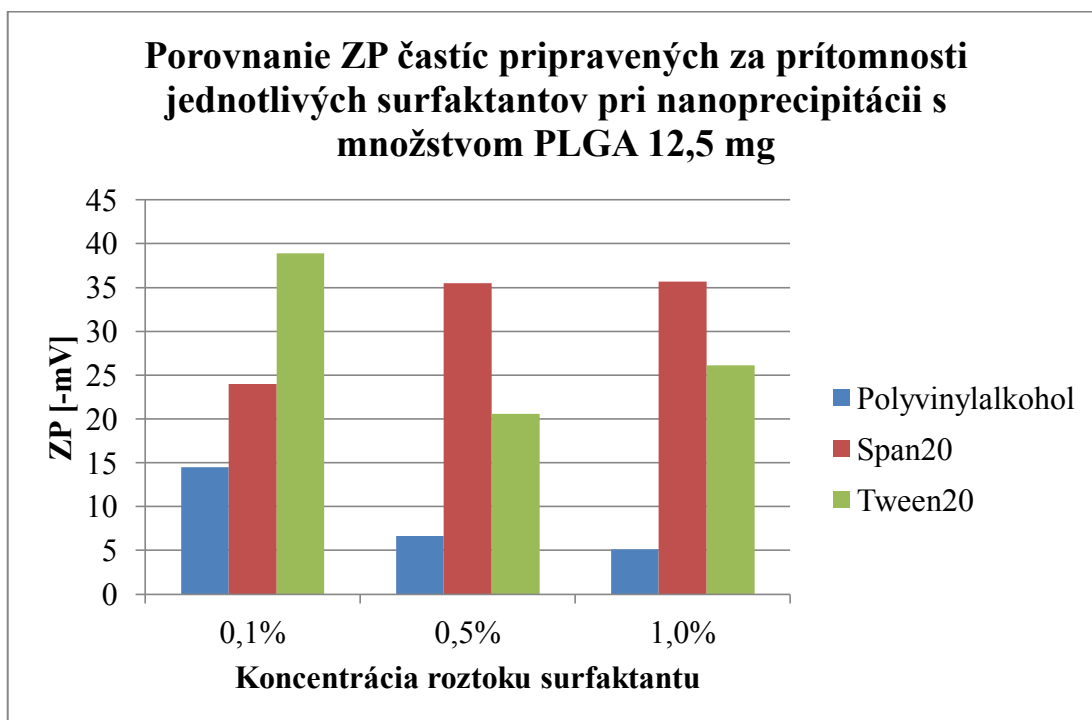
Názov surfaktantu	roztok	Priemerná Z-Ave d [nm]	Priemerný PDI	Priemerný ZP [mV]
Tween20	0,1%	120,9	0,096	-38,9
Tween20	0,5%	121,3	0,129	-20,6
Tween20	1,0%	130,3	0,098	-26,1



Graf 5-31 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg



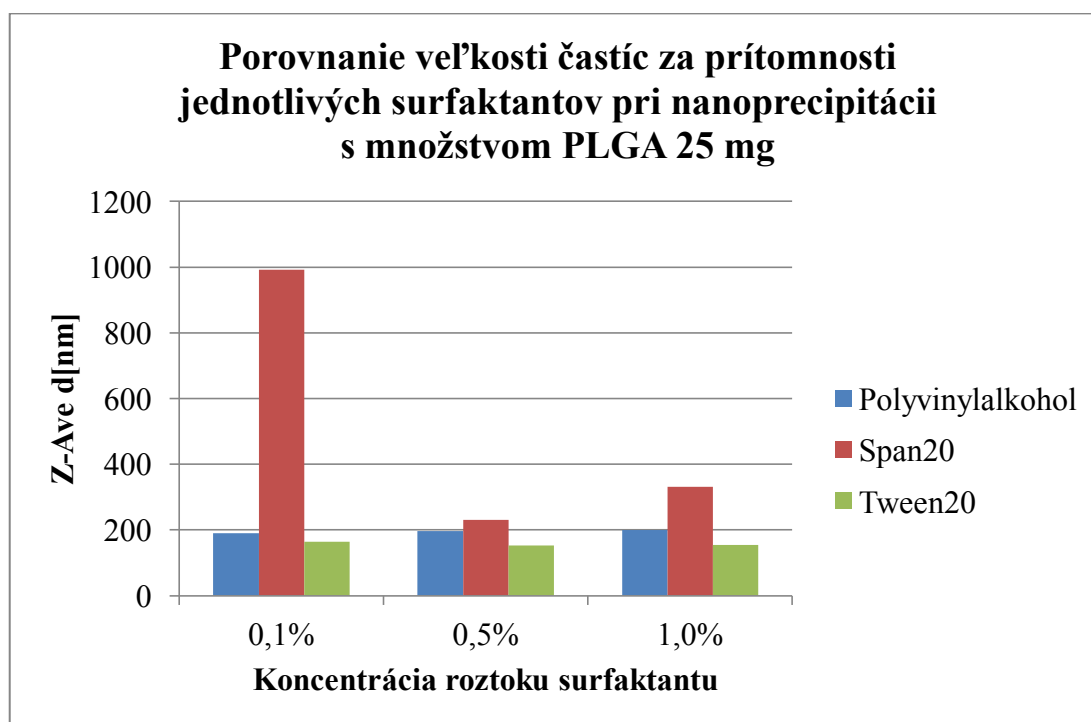
Graf 5-32 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktatnov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg



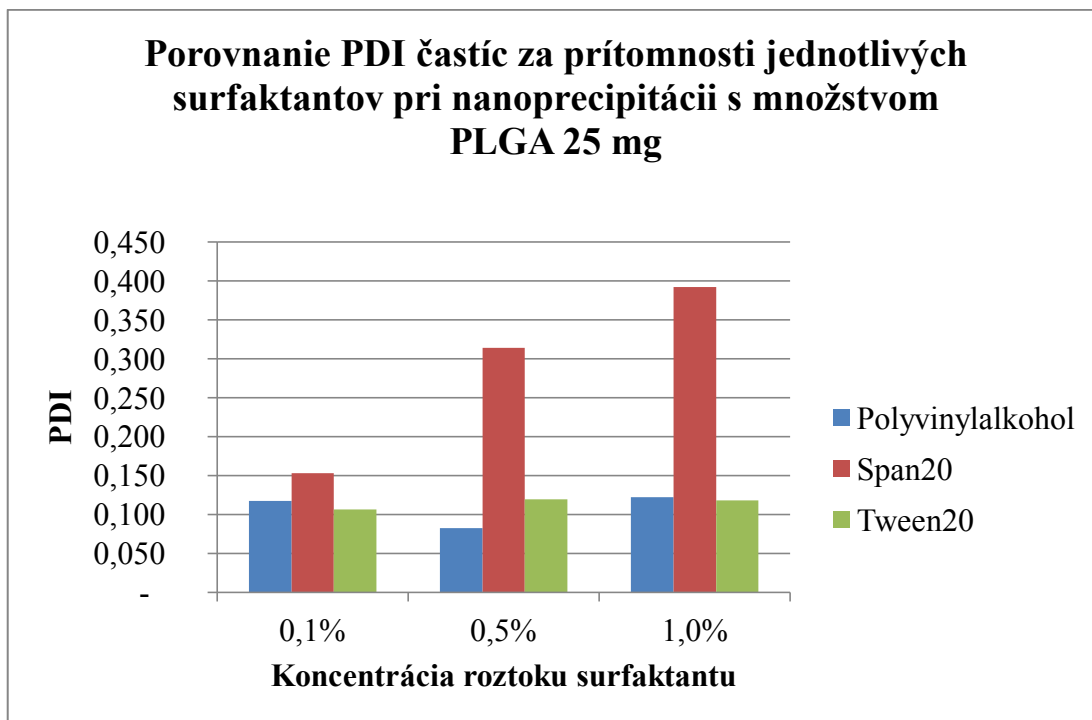
Graf 5-33 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg

Tabuľka 5-20 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg

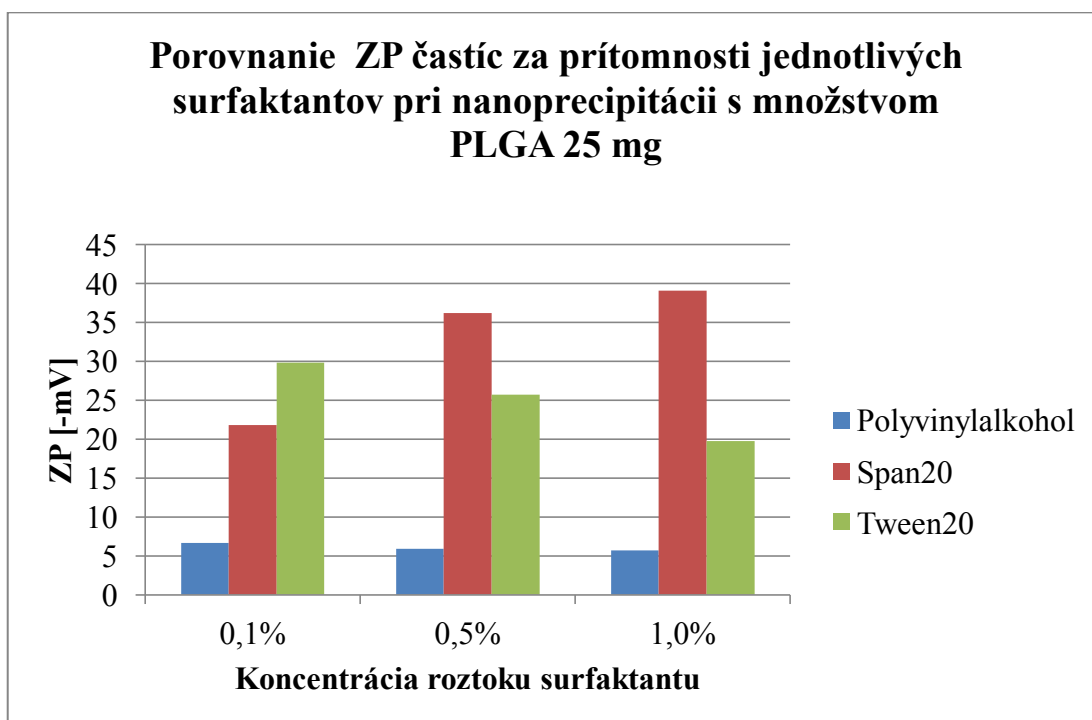
Názov surfaktantu	roztok	Priemerná Z-Ave d [nm]	Priemerný PDI	Priemerný ZP [mV]
Polyvinylalkohol	0,1%	189,7	0,117	-6,66
Polyvinylalkohol	0,5%	196,4	0,082	-5,93
Polyvinylalkohol	1,0%	199,4	0,122	-5,72
Span20	0,1%	992,3	0,153	-21,8
Span20	0,5%	230,3	0,314	-36,2
Span20	1,0%	331,8	0,392	-39,1
Tween20	0,1%	163,6	0,106	-29,8
Tween20	0,5%	152,2	0,119	-25,7
Tween20	1,0%	154,7	0,118	-19,74



Graf 5-34 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg



Graf 5-35 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg



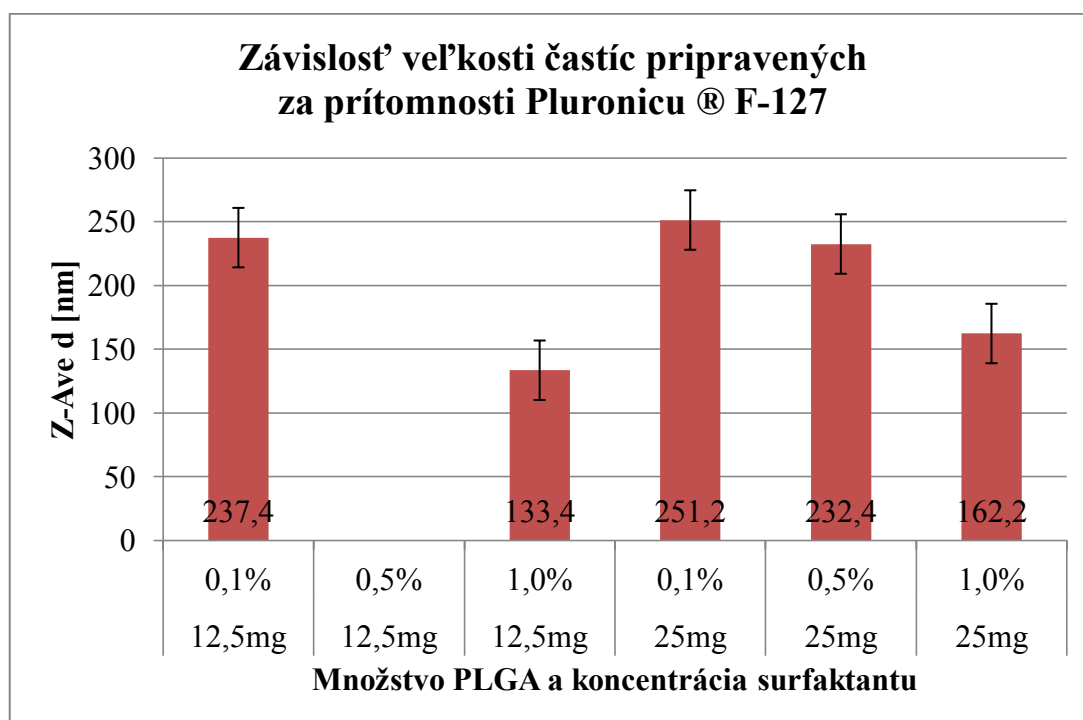
Graf 5-36 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg

5.5 Mikroenkapsulácia

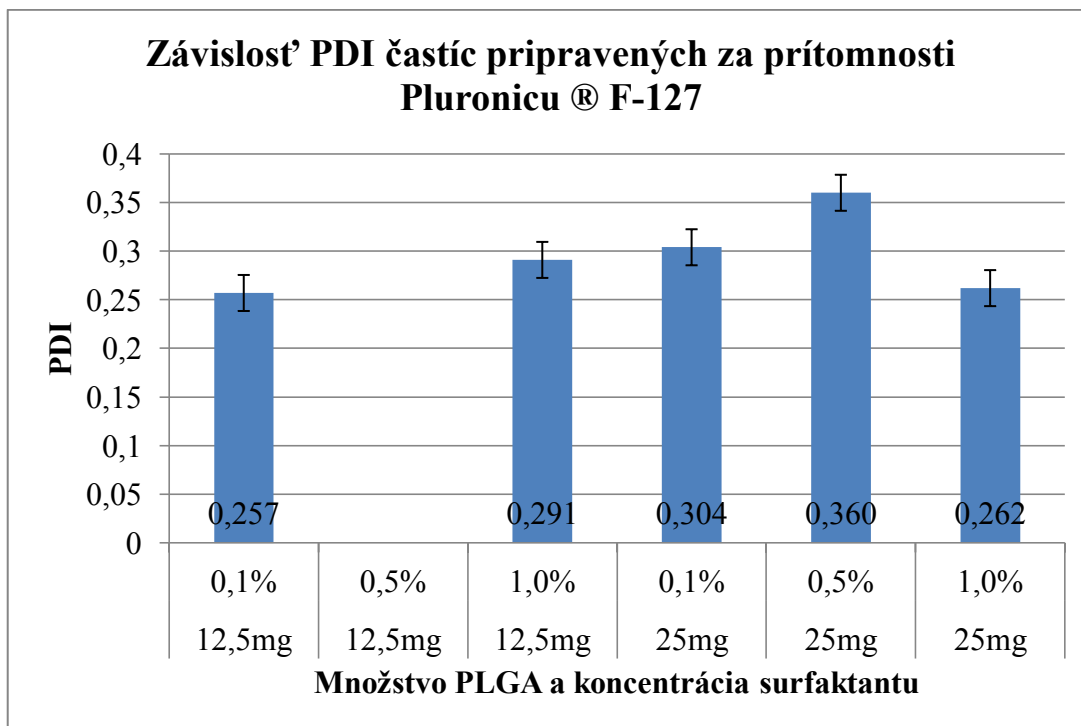
Tabuľka 5-21 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Priemerná Z-Ave d [nm]	Smerodajná odchýlka Z-Ave	Priemerný PDI	Smerodajná odchýlka PDI
č.1	12,5mg	0,1%	237,4	0	0,257	0
č.2	12,5mg	0,5%				
č.3	12,5mg	1,0%	133,4	±2,079	0,291	±0,037
č.4	25mg	0,1%	251,2	0	0,304	0
č.5	25mg	0,5%	232,4	0	0,360	0
č.6	25mg	1,0%	162,2	0	0,262	0

Poznámka: Vzorka č.2 - došlo k chybe pri príprave. Nemerané veličiny.



Graf 5-37 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii

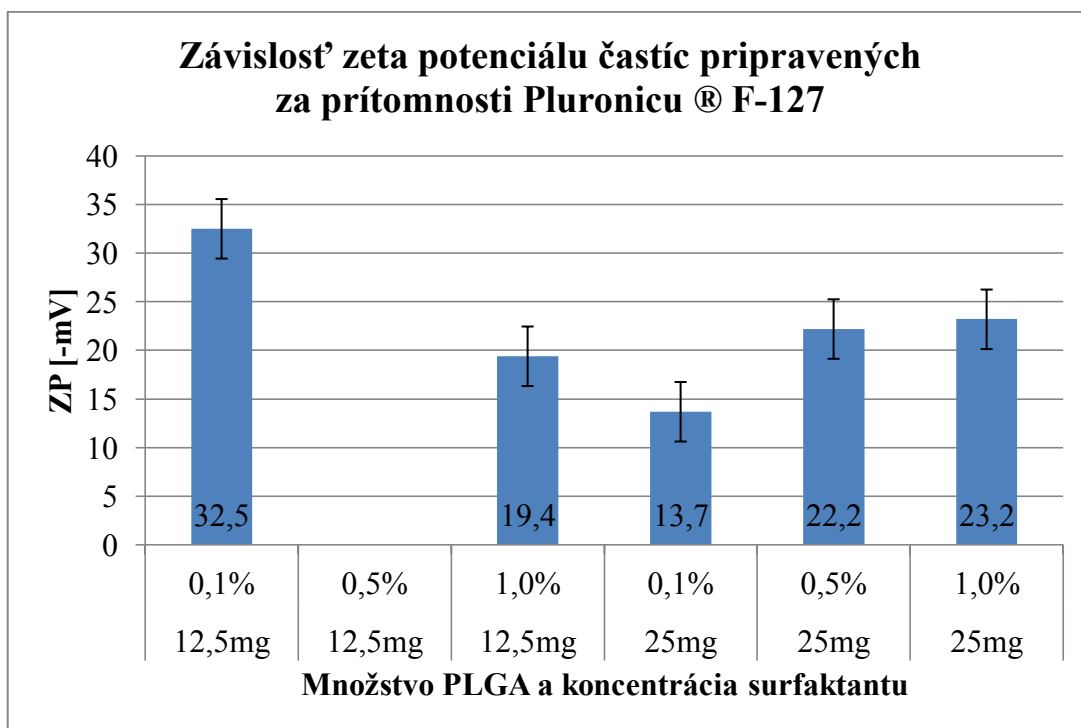


Graf 5-38 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii

Tabuľka 5-22 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	ZP [mV]	odchýlka ZP
č.1	12,5mg	0,1%	-32,5	0
č.2	12,5mg	0,5%		
č.3	12,5mg	1,0%	-19,4	0
č.4	25mg	0,1%	-13,7	0
č.5	25mg	0,5%	-22,2	0
č.6	25mg	1,0%	-23,2	±0,451

Poznámka: Vzorka č.2 nameraná veličina.



Graf 5-39 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii

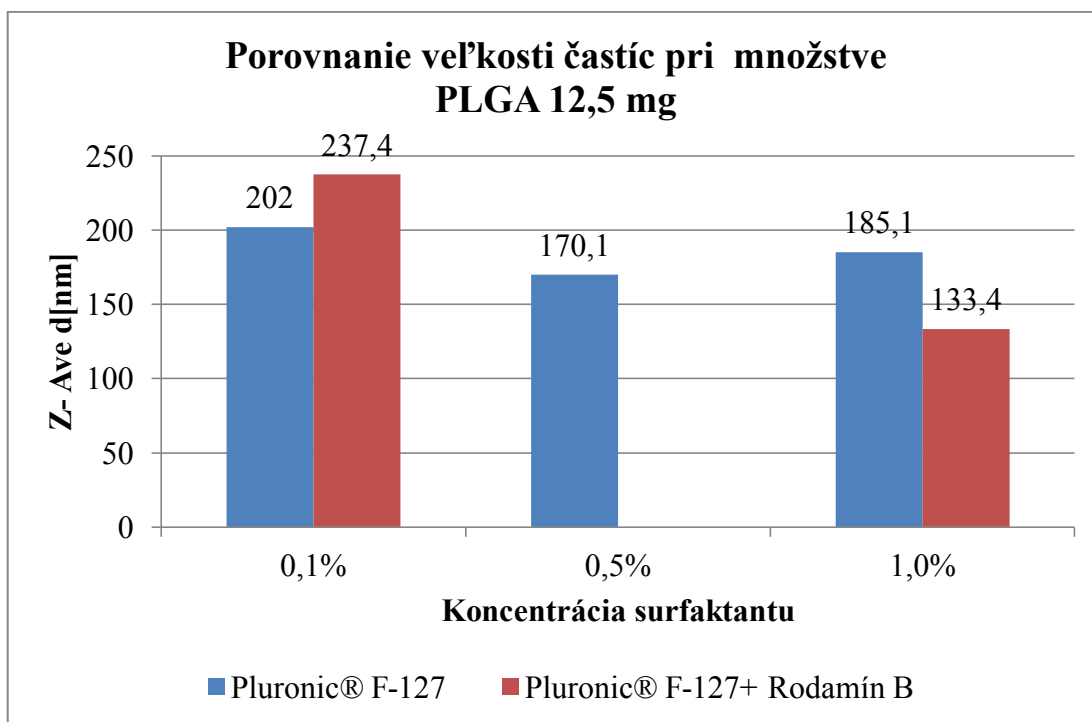
Tabuľka 5-23 Enkapsulačná efektívnosť rodamínu B

Vzorka	Množstvo PLGA	Roztok surfaktantu	Absorbancia pri 556 nm	Koncentrácia [µg/ml]	Enkapsulačná efektívnosť [%]
č.1	12,5 mg	0,1%	0,410	3,460	4,44
č.2	12,5 mg	1,0%	1,957	13,123	16,82
č.3	12,5 mg	0,1%	0,794	5,859	6,73
č.4	12,5 mg	0,5%	0,774	5,734	8,69

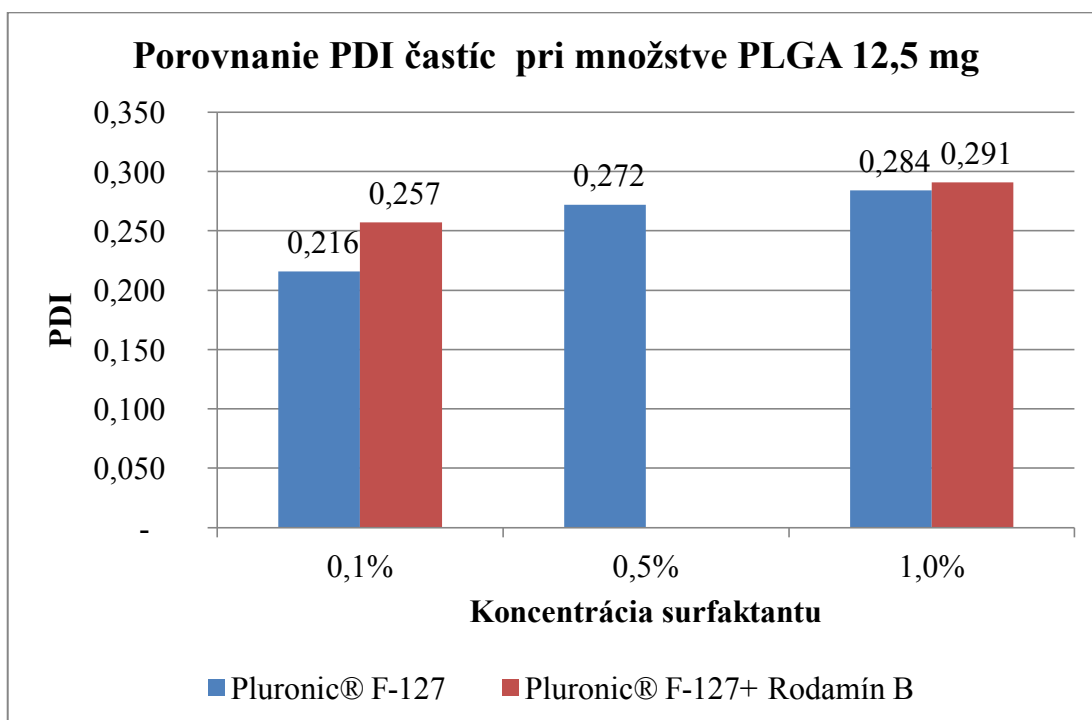
5.6 Porovnanie výsledkov u nanočastíc s enkapsulovaným rodamínom B a bez enkapsulovaného rodamínu B

Tabuľka 5-24 Porovnanie výsledkov veľkosti častíc, indexu polydispersity a zeta potenciálu pri množstve PLGA 12,5 mg a 25,0 mg

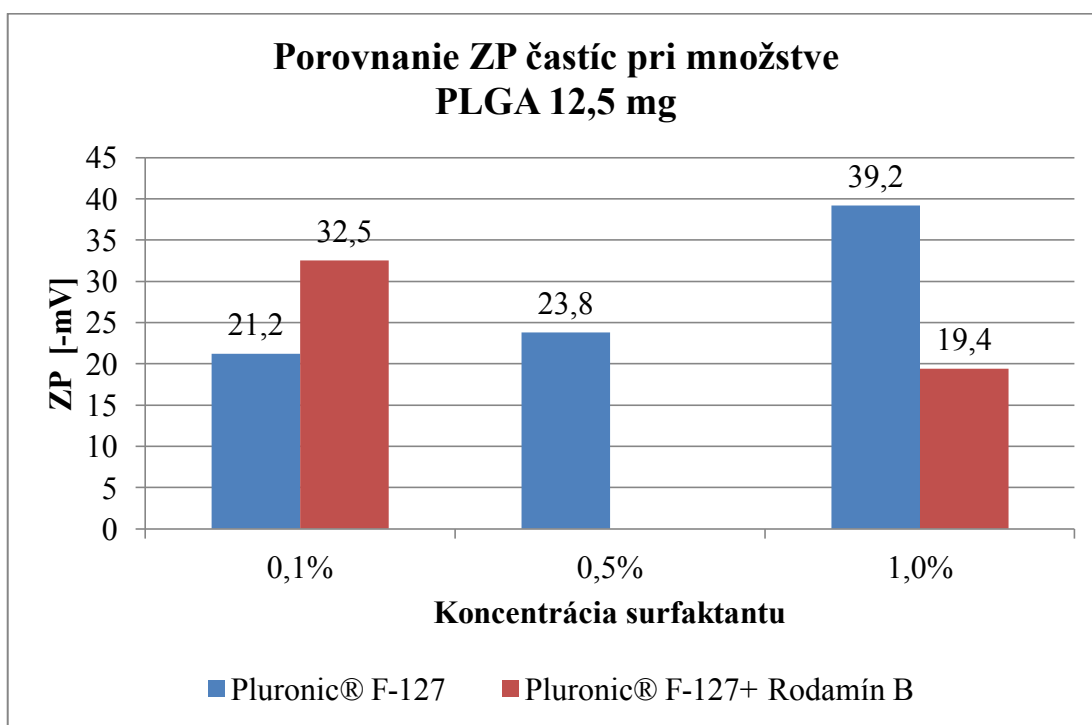
Vzorka	Názov surfaktantu	Množstvo PLGA	roztok	Priemerná Z-Ave d [nm]	Priemerný PDI	Priemerný ZP [mV]
č.1	Pluronic® F-127	12,5mg	0,1%	202,0	0,216	-21,2
č.2	Pluronic® F-127	12,5mg	0,5%	170,1	0,272	-23,8
č.3	Pluronic® F-127	12,5mg	1,0%	185,1	0,284	-39,2
č.4	Pluronic® F-127 + Rodamín B	12,5mg	0,1%	237,4	0,257	-32,5
č.5	Pluronic® F-127 + Rodamín B	12,5mg	0,5%			
č.6	Pluronic® F-127 + Rodamín B	12,5mg	1,0%	133,4	0,291	-19,4
č.7	Pluronic® F-127	25,0mg	0,1%	143,5	0,384	-23,6
č.8	Pluronic® F-127	25,0mg	0,5%	163,1	0,237	-22,6
č.9	Pluronic® F-127	25,0mg	1,0%	167,3	0,295	-12,5
č.10	Pluronic® F-127 + Rodamín B	25,0mg	0,1%	251,2	0,304	-13,7
č.11	Pluronic® F-127 + Rodamín B	25,0mg	0,5%	232,4	0,360	-22,2
č.12	Pluronic® F-127 + Rodamín B	25,0mg	1,0%	162,2	0,262	-23,2



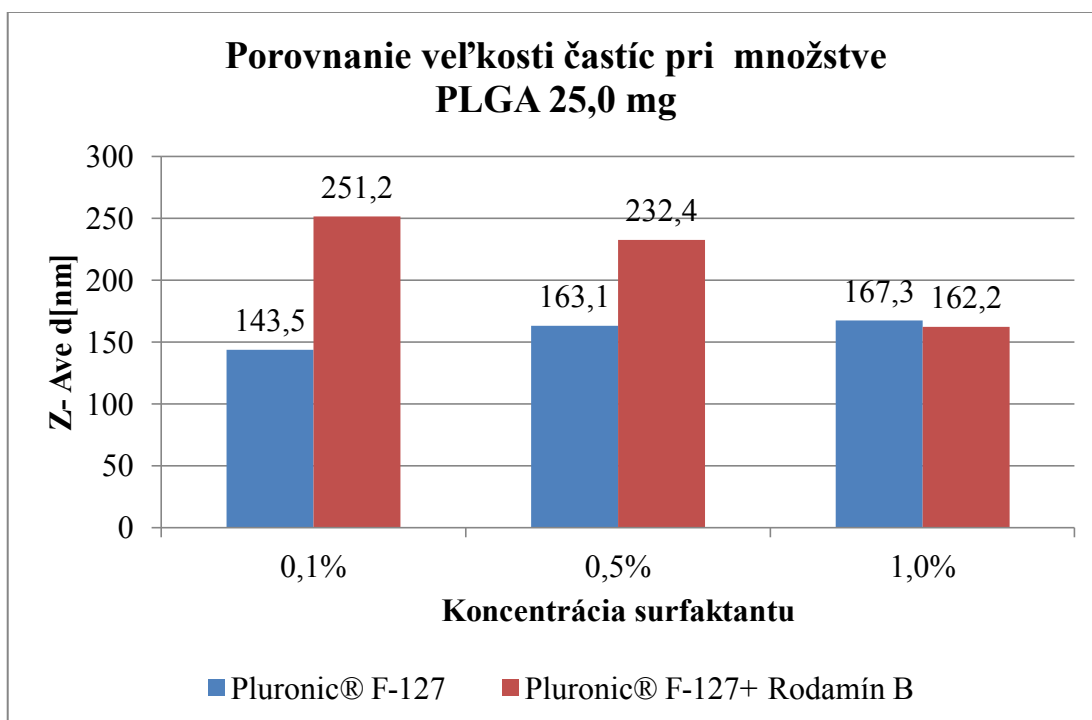
Graf 5-40 Porovnanie veľkosti častíc pri množstve PLGA 12,5 mg bez rodamínu B a s rodamínom B



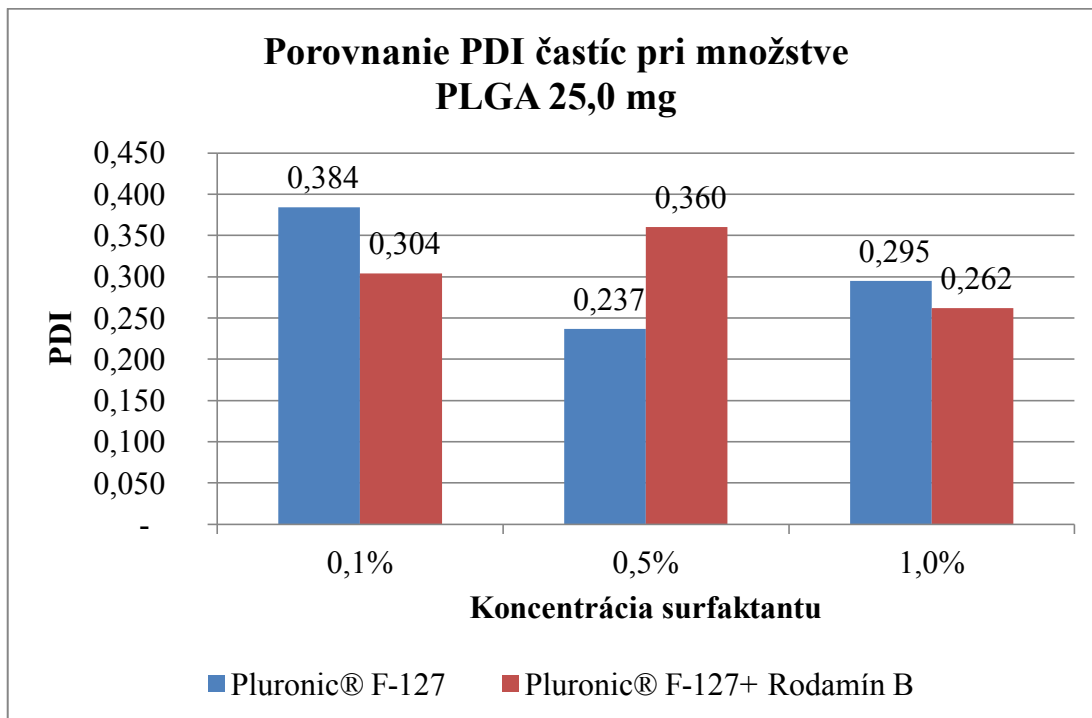
Graf 5-41 Porovnanie výsledkov PDI častíc pri množstve PLGA 12,5 mg bez rodamínu B a s rodamínom B



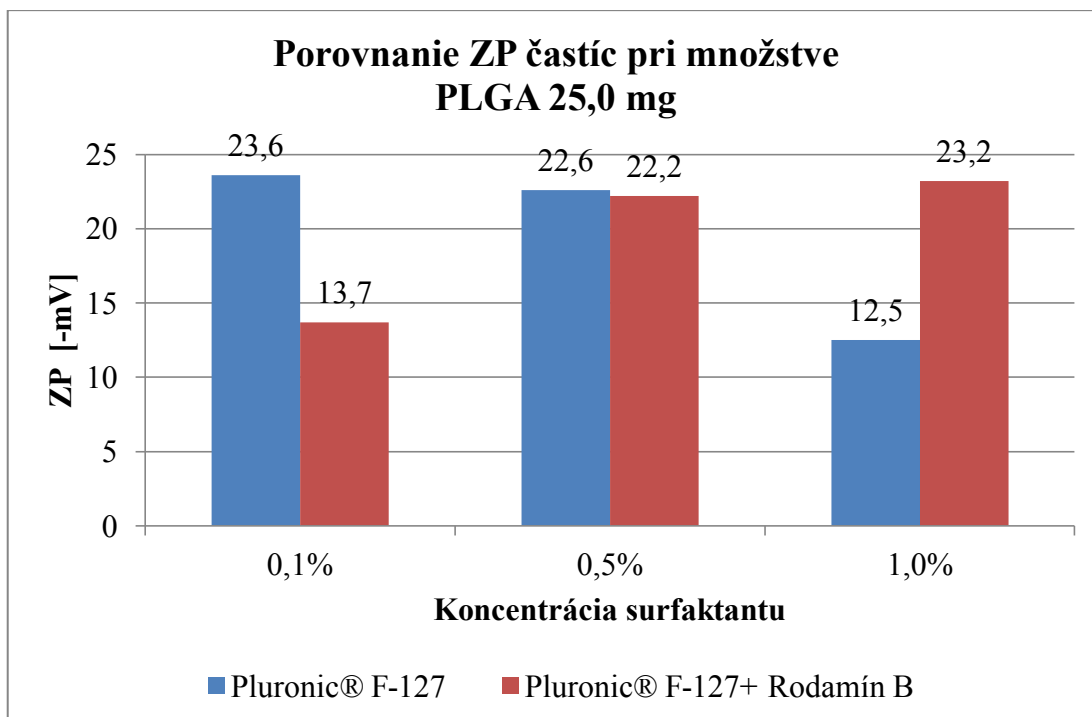
Graf 5-42 Porovnanie ZP častíc pri množstve PLGA 12,5 mg bez rodamínu B a s rodamínom B



Graf 5-43 Porovnanie veľkosti častíc pri množstve PLGA bez rodamínu B a bez rodamínu B



Graf 5-44 Porovnanie PDI častíc pri množstve PLGA 25 mg bez rodamínu B a s rodamínom B



Graf 5-45 Porovnanie ZP častíc pri množstve PLGA 25 mg bez rodamínu B a s rodamínom B

6 Diskusia

6.1 Všeobecné poznámky k experimentálnej časti

Nanočasticové systémy sú v dnešnej dobe populárne pre ich využitie v cielenej distribúcii liečiv. Pre prípravu nanočastíc sa volia materiály, ktoré sú biokompaktibilné a biodegradovateľné, čo zaručuje ich nízku toxicitu na organizmus. Pri experimentálnej časti sa používala PLGA v množstve 12,5mg a 25,0mg. Na rozpúšťanie polyméru boli použité organické rozpúšťadlá dichlórmetán a acetón. Ako vodná fáza bola použitá čistená voda s pridaným surfaktantom v troch rôznych koncentráciách. Skúšané surfaktanty boli Kolliphor® P188, Pluronic® F127, polyvinylalkohol, Span 20 a Tween 20. Príprava nanočastíc sa skúšala viacerými metódami. Po odparení rozpúšťadla bola u hotových nanočastíc stanovovaná ich veľkosť, index polydisperzity a zeta potenciál. Miera enkapsulácie sa stanovovala spektrofotometricky. Namerané hodnoty veľkosti častíc, indexu polydisperzity a zeta potenciálu pri emulznej metóde s použitím surfaktantov sú spracované v tabuľkách 5 - 1 až 5 - 10 a v grafoch 5 - 1 až 5 - 15. Pri nanoprecipitácii namerané hodnoty veľkosti častíc, indexu polydisperzity a zeta potenciálu sú spracované v tabuľkách 5 - 13 až 5 - 18 a v grafoch 5 - 22 až 5 - 30, pri použití jednotlivých surfaktantov. Pri mikroenkapsulácii sú namerané hodnoty spracované v tabuľkách 5 - 21, 5 - 22 a v grafoch 5 - 37 až 5 - 39.

6.2 Vplyv surfaktantu na veľkosť nanočastíc a index polydisperzity

Priaznivá hodnota pre veľkosť nanočastíc je pod 200 nm s nízkou hodnotou indexu polydisperzity.

Emulzná metóda

Pri emulznej metóde boli použité surfaktanty: Kolliphor® P188, Pluronic® F127, polyvinylalkohol, Span 20 a Tween 20 s koncentraciami 0,1%, 0,5%, 1,0%.

Pri množstve PLGA 12,5 mg vznikli častice s veľkosťou od 118,8 nm do 392,4 nm a s hodnotou indexu polydisperzity od 0,214 do 0,341

(viď. tabuľka 5 – 11 a grafické spracovanie 5 – 16 a 5 - 17). Najmenšie častice vznikli za prítomnosti 0,5% roztoku Kolliphoru® P188 a to s veľkosťou 118,8 nm a s nízkou mierou polydisperzity 0,220. Najväčšie častice vznikli za prítomnosti 1% roztoku Tweenu 20 a to s veľkosťou 392,4 nm, pričom hodnota indexu polydisperzity dosahovala veľkosť 0,322. Teda je možné predpokladať, že častice sa zhluchovali a tvorili agregáty. Z hľadiska veľkosti častíc a indexu polydisperzity je preto najvhodnejším surfaktantom pri množstve PLGA 12,5 mg Kolliphor® P188. Priaznivé výsledky boli dosiahnuté aj pri použití Pluronicu® F127, keďže pri 0,5% roztoku bola veľkosť častíc 170,1 nm a hodnota polydisperzity 0,272 (viď. tabuľka 5 – 11). Z grafu 5 – 16 je viditeľné, že na veľkosť častíc má vplyv typ použitého surfaktantu. V závislosti od koncentrácie boli dosiahnuté najlepšie hodnoty veľkosti častíc pri 0,5 % koncentrácii roztoku surfaktantu. Výnimku tvorí polyvinylalkohol, pri ktorom bola dosiahnutá najväčšia hodnota pri 0,5% koncentrácii. Čo sa týka miery polydisperzity, pri všetkých vzorkách použitých pri emulznej metóde boli dosiahnuté hodnoty PDI podobné (viď. tabuľka 5 – 11). Za prítomnosti polyvinylalkoholu a Tweenu 20 vzniknuté častice dosahovali najväčšie hodnoty veľkosti častíc.

Pri množstve PLGA 25 mg pri emulznej metóde (viď. tabuľka 5 – 12) boli získané za prítomnosti surfaktantov pri koncentráciách 0,1%, 0,5%, 1% hodnoty veľkosti častíc od 116,2 nm do 516,8 nm a index polydisperzity dosahoval hodnoty od 0,113 do 0,387. Najmenšie nanočastice vznikli za prítomnosti 1% roztoku Kolliphoru® P188 s veľmi nízkou mierou polydisperzity (PDI = 0,158). U 0,1% roztoku Kolliphoru® P188 nedošlo ku vzniku nanočastíc, keďže polymér vypadol z roztoku a príslušné hodnoty neboli namerané. Častice s najmenším PDI a to s hodnotou 0,113 boli zaznamenané za prítomnosti 1% polyvinylalkoholu. Pričom najväčšie PDI bolo zaznamenané za prítomnosti 0,1% Span 20 a to 0,387. Najväčšie častice vznikli za prítomnosti 0,1% roztoku Tweenu 20 a to 516,8 nm, pričom pri koncentráciách 0,5% a 1% boli dosiahnuté hodnoty veľkosti častíc 276,2 nm a 320,8 nm. Dôvodom je pravdepodobne nedostatočná koncentrácia použitého surfaktantu Tweenu 20 na množstvo PLGA 25 mg. Pri použití Pluronicu® F127 boli

získané častice s veľkosťou od 143,5 nm do 167,3 nm, v závislosti od použitej koncentrácie surfaktantu. Tieto dosiahnuté hodnoty boli optimálne. Index polydisperzity častíc dosahoval hodnoty od 0,237 do 0,384.

Ak porovnáme tabuľky výsledkov 5 – 11 a 5 - 12, z nich je viditeľné, že pri množstve PLGA 25 mg vznikli za prítomnosti surfaktantov spravidla menšie častice ako pri množstve PLGA 12,5 mg. Napríklad u Pluronicu® F127 vo všetkých troch koncentráciách bola dosiahnutá menšia veľkosť častíc pri množstve PLGA 25 mg. Pri množstve PLGA 12,5 mg s koncentráciou 0,1% bola veľkosť vzniknutých nanočastíc 202 nm, pričom pri množstve PLGA 25 mg s koncentráciou 0,1% bola veľkosť 143,5 nm (vid'. graf 5 – 16 a 5 – 19). Z hľadiska hodnôt PDI je najvhodnejšia koncentrácia 0,5% u väčšiny surfaktantov. 0,1% koncentrácia surfaktantu je príliš nízka a dochádza k zhlukovaniu častíc, pričom 1% koncentrácia surfaktantu je zase príliš vysoká v niektorých prípadoch a PDI je tak vyššie ako pri 0,5% koncentrácii (vid'. graf 5 – 17 a 5 – 20).

Nanoprecipitácia

Pri nanoprecipitácii boli použité surfaktanty: polyvinylalkohol, Span 20 a Tween 20 s koncentraciami 0,1%, 0,5%, 1,0%.

Pri množstve PLGA 12,5 mg dosahovali hodnoty veľkosti vzniknutých častíc od 120,9 nm do 193,7 nm. Hodnoty indexu polydisperzity sa pohybovali v rozmedzí od 0,064 do 0,256 (vid'. tabuľka 5 – 19). Najmenšie častice vznikli za prítomnosti 0,1% roztoku Tween 20 a to s veľkosťou 120,9 nm a s veľmi nízkou mierou polydisperzity (PDI = 0,096). Najväčšie častice vznikli za prítomnosti 0,5% roztoku Spanu 20 a to 193,7 nm s indexom polydisperzity 0,114. Veľkosť vznikajúcich častíc je ovplyvnená najmä typom použitého surfaktantu, pri jednotlivých koncentráciách v rámci jedného surfaktantu nie sú veľké rozdiely v hodnotách veľkosti častíc. Hodnoty indexu polydisperzity sú spravidla veľmi nízke pri všetkých vzorkách (vid'. graf 5 – 32).

Pri množstve PLGA 25 mg dosahovali hodnoty veľkosti vzniknutých častíc od 152,2 nm do 992,3 nm. Hodnoty indexu polydisperzity sa pohybovali v rozmedzí od 0,082 do 0,392 (vid'. tabuľka 5 – 20 a grafické spracovanie 5 – 34 a 5 – 35).

Najmenšie častice vznikli za prítomnosti 0,5% koncentrácie roztoku Tweenu 20 s nízkou mierou polydisperzity (PDI = 0,119). Najväčšie častice vznikli pri použití 0,1% roztoku Spanu 20 a to s hodnotou 992,3 nm, pričom hodnota polydisperzity bola nízka 0,153. Pri použití 0,5% a 1% roztoku Spanu 20 vznikli častice s podstatne menšou veľkosťou ako pri použití 0,1% Spanu 20 (230,3 nm, 331,8 nm). Dôvodom je pravdepodobne nedostatočná koncentrácia použitého surfaktantu Spanu 20 na množstvo PLGA 25 mg. Pri porovnaní hodnôt polydisperzity v rámci Spanu 20 bola najlepšia hodnota u 0,1% roztoku Spanu 20 (PDI = 0,153), pričom hodnoty u 0,5% a 1% roztoku Span 20 sú výrazne vyššie (0,314; 0,392) vid' graf 5 – 35.

Pri porovnaní použitého množstva PLGA 12,5 mg a 25 mg čo sa týka veľkosti častíc aj polydisperzity boli pri všetkých vzorkách s množstvom 12,5 mg PLGA dosahované optimálnejšie parametre (tabuľka 5 – 19 a 5 – 20).

Metóda nanoprecipitácie sa ukázala ako vhodnejšia ako emulzná metóda, preto že v mnohých prípadoch sa tak získali častice s vhodnejšími parametrami. Pri nanoprecipitácii boli získané častice s menšou veľkosťou aj mierou polydisperzity ako pri metóde emulznej. Stabilita častíc však najviac závisela od typu použitého surfaktantu.

6.3 Vplyv surfaktantu na zeta potenciál nanočastíc

Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál, ktorý súvisí so stabilitou suspenzií a emulzií. Všeobecne sú stabilné suspenzie a emulzie s hodnotou zeta potenciálu ± 30 mV.

Emulzná metóda

Pri množstve PLGA 12,5 mg bol meraný zeta potenciál častíc za prítomnosti surfaktantov: Kolliphor® P188, Pluronic® F127, polyvinylalkohol, Span 20 a Tween 20 s koncentraciami 0,1%, 0,5%, 1,0%.

Hodnoty zeta potenciálu sú spracované v tabuľke 5 – 11 a grafické spracovanie v grafe 5 – 18. Rozmedzie zeta potenciálu u všetkých vzoriek je od – 12,9 mV do – 46 mV. Najlepšie hodnoty zeta potenciálu boli dosahované za prítomnosti Span 20 ako surfaktantu pri všetkých troch koncentráciách: pri 0,1% (-46,0mV),

0,5% (-33,7 mV), 1% (-34,6 mV). Z hľadiska stability nanočastíc sa dosiahli dobré hodnoty aj u Tweenu 20, a to najmä pri koncentrácii 0,1% (-39,8 mV). Najmenšia stabilita nanočastíc bola pri použití polyvinylalkoholu pri všetkých koncentráciách: pri 0,1% (-12,9mV), 0,5% (-16,5 mV), 1% (-19,9 mV).

Pri množstve PLGA 25 mg bol meraný zeta potenciál častíc za prítomnosti surfaktantov: Kolliphor® P188, Pluronic® F127, polyvinylalkohol, Span 20 a Tween 20 s koncentraciami 0,1%, 0,5%, 1,0%.

Hodnoty zeta potenciálu sú spracované v tabuľke 5 – 12 a grafické spracovanie v grafe 5 – 21. Rozmedzie zeta potenciálu u všetkých vzoriek je od – 10,6 mV do – 37,6 mV. Najlepšie hodnoty zeta potenciálu boli dosahované za prítomnosti Span 20 ako surfaktantu pri všetkých troch koncentráciách: pri 0,1% (-37,6 mV), 0,5% (-35,3 mV), 1% (-33,2 mV). Najmenšia stabilita nanočastíc bola pri použití polyvinylalkoholu pri všetkých koncentráciách: pri 0,1% (-10,6mV), 0,5% (-14,2 mV), 1% (-16,5 mV).

V prípade množstva PLGA 12,5 mg boli dosiahnuté lepšie hodnoty zeta potenciálu u všetkých vzoriek ako u pri množstve PLGA 25 mg. Dôvodom je pravdepodobne vznik menšieho počtu častíc a vrstva iontov je hustejšia na povrchu nanočastíc.

V prípade zeta potenciálu je viditeľný veľmi zaujímavý fenomén. U niektorých surfaktantov hodnota ZP so zvyšujúcou koncentráciou surfaktantu rastie a u niektorých naopak klesá (vid'. graf 5 – 18 a 5 – 21). Napríklad v tabuľke 5 – 12 je viditeľné, že pri použití 0,1% Pluronic® F127 je hodnota ZP = - 23,6 mV, pri 0,5 % je hodnota ZP = - 22,6 mV a pri 1% ZP = - 12,5 mV. Naopak pri polyvinylalkohole s koncentráciou 0,1 % je hodnota ZP = - 10,6 mV, pri 0,5 % je ZP = - 14,2 mV, pri 1% je ZP = - 16,5 mV.

Nanoprecipitácia

Pri množstve PLGA 12,5 mg bol meraný zeta potenciál častíc za prítomnosti surfaktantov: polyvinylalkohol, Span 20 a Tween 20 s koncentraciami 0,1%, 0,5%, 1,0%.

Hodnoty zeta potenciálu sú spracované v tabuľke 5 – 19 a grafické spracovanie v grafe 5 – 33. Rozmedzie zeta potenciálu u všetkých vzoriek je od – 5,13 mV do -38,9 mV. Najlepšie hodnoty zeta potenciálu boli dosahované za prítomnosti Tweenu 20 ako surfaktantu pri koncentrácii 0,1% (-38,9 mV) a za prítomnosti Spanu 20 pri koncentráciách 0,5% (-35,5 mV), 1% (-35,7 mV). Najmenšia stabilita nanočastíc bola pri použití polyvinylalkoholu pri všetkých koncentráciách: pri 0,1% (-14,5mV), 0,5% (-6,66 mV), 1% (-5,13 mV).

Pri množstve PLGA 25 mg bol meraný zeta potenciál častíc za prítomnosti surfaktantov: polyvinylalkohol, Span 20 a Tween 20 s koncentraciami 0,1%, 0,5%, 1,0%. Hodnoty zeta potenciálu sú spracované v tabuľke 5 – 20 a grafické spracovanie v grafe 5 – 36.

Rozmedzie zeta potenciálu u všetkých vzoriek je od – 5,72 mV do – 39,1 mV. Najlepšie hodnoty zeta potenciálu boli dosahované za prítomnosti Spanu 20 pri koncentráciách 0,5% (-36,2 mV), 1% (-39,1 mV). Najmenšia stabilita nanočastíc bola pri použití polyvinylalkoholu pri všetkých koncentráciách: pri 0,1% (-6,66 mV), 0,5% (-5,93 mV), 1% (-5,72 mV).

Hodnota zeta potenciálu vzniknutých nanočastíc závisí predovšetkým od typu použitého surfaktantu. Nie je pozorovateľná vo výsledkoch závislosť veľkosti a PDI vzniknutých nanočastíc. Všeobecne najoptimálnejšie hodnoty boli dosiahnuté pri použití Spanu 20 a Tweenu 20.

V prípade zeta potenciálu je viditeľný veľmi zaujímavý fenomén aj v tomto prípade. U niektorých surfaktantov hodnota zeta potenciálu so zvyšujúcou koncentraciou surfaktantu rastie a u niektorých naopak klesá (vid'. graf 5 – 33 a 5 – 36). Napríklad v tabuľke 5 – 20 je viditeľné, že pri použití 0,1% Span 20 je hodnota zeta potenciálu - 21,8 mV, pri 0,5 % je hodnota zeta potenciálu - 36,2 mV a pri 1% je hodnota zeta potenciálu - 39,1 mV. Naopak pri polyvinylalkohole 0,1 % je hodnota zeta potenciálu - 6,66 mV, pri 0,5 % je - 5,93 mV, pri 1% je - 5,72 mV.

6.4 Hodnotenie enkapsulácie rodamínu B

Pri mikroenkapsulácii sa použila lipofilná látka – rodamín B. Pri príprave sa používal polymér PLGA v množstve 12,5 mg a 25 mg, a ako rozpúšťadlo dichlórmetán. Zo surfaktantov sa zvolil Pluronic® F127 v koncentráciách 0,1%, 0,5%, 1,0%. Použitá bola emulzná metóda príprava nanočastíc.

V tabuľke 5 – 24 a grafoch 5 – 40 až 5 – 45 sú porovnané získané výsledky u nanočastíc bez enkapsulovaného rodamínu B a s enkapsulovaným rodamínom B. Nanočastice pripravované s enkapsulovaným rodamínom B nadobúdali veľkosť častíc od 133,4 nm do 251,2 nm a PDI od 0,257 do 0,360. Hodnoty polydisperzity sa príliš neodlišujú od seba.

Pri porovnávaní veľkosti častíc nanočastice s enkapsulovaným rodamínom B nadobúdajú väčšie hodnoty ako bez enkapsulovaného rodamínu B. Dôvodom je zväčšenie častíc kvôli inkorporácii rodamínu B do nanočastíc. Pri vzorke č. 6 v tabuľke 5 – 24 je výnimka, pravdepodobne nedošlo k inkorporácii rodamínu B. Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc s enkapsulovaným rodamínom B boli od -13,7 mV do – 32,5 mV. Tieto hodnoty poukazujú na nízku stabilitu vzniknutých nanočastíc. Odlišujú sa od hodnôt u prázdnych nanočastíc, pravdepodobne inkorporáciou rodamínu B došlo k zmene elektrických vlastností nanočastíc.

Enkapsulačná efektívnosť rodamínu B znázorňuje tabuľka 5 – 23. Hodnoty enkapsulačnej efektivity boli od 4,44% do 16,82%.

7 Záver

Teoretická časť práce bola zameraná na typy nanočastíc, ich distribúciu a ich využitie. Jej súčasťou sú aj metódy prípravy nanočastíc a definícia ich vlastností.

V experimentálnej časti práce boli nanočastice pripravované emulznou metódou a metódou nanoprecipitácie. Zisťoval sa vplyv použitých surfaktantov: Kolliphoru® P188, Pluronicu® F127, polyvinylalkoholu, Spanu 20 a Tweenu 20 s koncentraciami 0,1%, 0,5%, 1,0%, na výsledné vlastnosti nanočastíc. Boli merané veličiny veľkosť častíc, index polydisperzity a zeta potenciál pomocou prístroja Zetasizer. Cieľom bolo získať častice s veľkosťou pod 200 nm s nízkou mierou polydisperzity a dostatočnou stabilitou.

Pri voľbe metódy je vhodnejšie použiť nanoprecipitáciu, pretože hodnotené parametre boli optimálnejšie ako pri emulznej metóde pri použití rovnakého surfaktantu v rovnakej koncentrácii.

Pri emulznej metóde pre dosiahnutie optimálnej veľkosti nanočastíc a PDI sa preukázali ako najvhodnejšie na základe dosiahnutých výsledkov Kolliphor® P188 a Pluronic® F127, pričom ich stabilita bola nízka okrem Pluronicu® F127 s koncentraciou 1% na množstvo PLGA 12,5 mg ($ZP = -39,2$ mV). Pri použití ostatných surfaktantov pri emulznej metóde vznikli väčšie častice. Najvyššia stabilita pri emulznej metóde bola dosiahnutá pri použití Span 20 pri množstve 12,5 mg a 25 mg.

Pri nanoprecipitácii boli získavané častice s výrazne menšou veľkosťou a PDI ako pri emulznej metóde. Veľmi priaznivé výsledky boli dosiahnuté pri použití Tweenu 20 vo všetkých troch koncentráciách na množstvo PLGA 12,5 mg, ako z hľadiska veľkosti, tak aj z hľadiska miery polydisperzity častíc (veľkosti častíc od 120,9 nm do 130,3 nm a PDI od 0,096 do 0,129). Avšak z hľadiska stability častíc boli získané najoptimálnejšie hodnoty zeta potenciálu pri použití Span 20 pri koncentráciách 0,5% ($-35,5$ mV) a 1% ($-35,7$ mV).

Pri enkapsulácii rodamínu B boli získané častice s veľkosťou od 131,4 nm do 251,2 nm a PDI od 0,257 do 0,360. Stabilita častíc však bola nízka. Enkapsulačná efektívnosť rodamínu B dosahovala nízke hodnoty.

8 Zoznam tabuliek

Tabuľka 5-1 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde.....	35
Tabuľka 5-2 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde.....	37
Tabuľka 5-3 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde.....	38
Tabuľka 5-4 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde.....	39
Tabuľka 5-5 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde.....	40
Tabuľka 5-6 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde.....	42
Tabuľka 5-7 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde.....	43
Tabuľka 5-8 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde.....	44
Tabuľka 5-9 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde.....	45
Tabuľka 5-10 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde.....	47
Tabuľka 5-11 Porovnanie výsledkov veľkosti častíc, PDI a ZP pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg.....	48
Tabuľka 5-12 Porovnanie veľkosti častíc, PDI a ZP pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25 mg.....	50
Tabuľka 5-13 Veľkosť častíc a PDI pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii.....	53
Tabuľka 5-14 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii.....	54

Tabuľka 5-15 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii.....	55
Tabuľka 5-16 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii.....	57
Tabuľka 5-17 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii.....	58
Tabuľka 5-18 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii.....	59
Tabuľka 5-19 Porovnanie veľkosti častíc pripravených za prítomnosti surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg	60
Tabuľka 5-20 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg	63
Tabuľka 5-21 Veľkosť častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii	65
Tabuľka 5-22 Zeta potenciál častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii	66
Tabuľka 5-23 Enkapsulačná efektívnosť rodamínu B	67
Tabuľka 5-24 Porovnanie výsledkov veľkosti častíc, indexu polydisperzity a zeta potenciálu pri množstve PLGA 12,5 mg a 25,0 mg.....	68

9 Zoznam grafov

Graf 5-1 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde.....	36
Graf 5-2 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde.....	36
Graf 5-3 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Kolliphoru® P-188 pri emulznej metóde.....	37
Graf 5-4 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde.....	38
Graf 5-5 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde.....	39
Graf 5-6 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri emulznej metóde.....	40
Graf 5-7 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde.....	41
Graf 5-8 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde.....	41
Graf 5-9 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri emulznej metóde.....	42
Graf 5-10 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde.....	43
Graf 5-11 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde.....	44
Graf 5-12 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri emulznej metóde.....	45
Graf 5-13 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde.....	46
Graf 5-14 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde.....	46

Graf 5-15 Závislosť zeta potenciálu častíc za prítomnosti Tween 20 pri emulznej metóde.....	47
Graf 5-16 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg	49
Graf 5-17 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg	49
Graf 5-18 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 12,5 mg	50
Graf 5-19 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25 mg	51
Graf 5-20 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25 mg	52
Graf 5-21 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri emulznej metóde s množstvom PLGA 25mg	52
Graf 5-22 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii	53
Graf 5-23 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii	54
Graf 5-24 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti polyvinylalkoholu pri nanoprecipitácii	55
Graf 5-25 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii.....	56
Graf 5-26 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii.....	56
Graf 5-27 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Span 20 pri nanoprecipitácii	57
Graf 5-28 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii.....	58
Graf 5-29 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii.....	59

Graf 5-30 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Tween 20 pri nanoprecipitácii	60
Graf 5-31 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg	61
Graf 5-32 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktatnov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg	62
Graf 5-33 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 12,5 mg	62
Graf 5-34 Porovnanie veľkosti častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg	63
Graf 5-35 Porovnanie PDI častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg	64
Graf 5-36 Porovnanie ZP častíc za prítomnosti jednotlivých surfaktantov pri nanoprecipitácii s množstvom PLGA 25 mg	64
Graf 5-37 Závislosť veľkosti častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii	65
Graf 5-38 Závislosť PDI častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii	66
Graf 5-39 Závislosť zeta potenciálu častíc pripravených za prítomnosti Pluronicu® F-127 pri mikroenkapsulácii	67
Graf 5-40 Porovnanie veľkosti častíc pri množstve PLGA 12,5 mg bez rodamínu B a s rodamínom B	69
Graf 5-41 Porovnanie výsledkov PDI častíc pri množstve PLGA 12,5 mg bez rodamínu B a s rodamínom B	69
Graf 5-42 Porovnanie ZP častíc pri množstve PLGA 12,5 mg bez rodamínu B a s rodamínom B	70
Graf 5-43 Porovnanie veľkosti častíc pri množstve PLGA bez rodamínu B a bez rodamínu B	70
Graf 5-44 Porovnanie PDI častíc pri množstve PLGA 25 mg bez rodamínu B a s rodamínom B	71

Graf 5-45 Porovnanie ZP častíc pri množstve PLGA 25 mg bez rodamínu B a s rodamínom B 71

10 Zoznam obrázkov

Obrázok 3-1 Nanočastice a nanosféry	11
Obrázok 3-2 Dendriméry	12
Obrázok 3-3 Polymerné micely	13
Obrázok 3-4 Lipozómy	14
Obrázok 3-5 Vzorec hydrolyzy polyestérov v organizme	16
Obrázok 3-6 Vzorec Poly- ϵ -kaprolaktonu	16
Obrázok 3-7 Všeobecný vzorec Polyalkylkyanoakrylátu	17
Obrázok 3-8 Vzorec želatíny	17
Obrázok 3-9 Aktívny a pasívny cieleň transport	21
Obrázok 3-10 Odparovanie rozpúšťadla	26
Obrázok 3-11 Nonoprecipitácia	27
Obrázok 4-1 Kalibračná krivka rodamínu B	34

11 Použitá literatura

1. **Rabišková, M.** Využití nanočásticových systémů v medicíně. *Remédia*. 2008, 18(1), s. 89-97. ISSN 0862-8947.
2. **Švecová, D.** Nanotechnologie v medicíně. *Dermatolgia v praxi*. 2017, 11(2), s. 43-47. ISSN 1337-1746.
3. **Rabišková, M.** Částicové systémy. *Štúdijský materiál*. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. s. 1-3. CZ.1.07./2.2.00//28.0194.
4. **Tammam, Salma N., Azzazy Hassan M.E., Lamprecht A.** Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2014, 10, s. 1-23. ISSN 1550-7033.
5. **Hans, M.L., Lowman, A.M.** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, 6(4), s. 319-327. ISSN 1359-0286.
6. **Rabišková, M.** Nanočástice pro léčivé formy. *Remedia*. 2007, 17(5), s. 495-501. ISSN 0862-8947.
7. **Murthy, Shashi K.** Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *International Journal of Nanomedicine*. 2007, 2(2), s. 129-141. ISSN 1178-2013.
8. **Rabišková, M.** Částicové léčivé formy. *Praktické lékařství*. 2005, 1, s. 32-34. ISSN 1801-2434.
9. **Danhier F., Ansorena E., Silva J.M. Coco R., La Breton A., Prát V.** PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012, 161(2), s. 505-522. ISSN 0168-3659.
10. **AUTOR, NEZNÁMY.** <https://www.wikiskripta.eu>. [Online] [Datum: 23. 5 2018.] Dostupný na www: https://www.wikiskripta.eu/w/Aktivn%3%ad_imunizace.
11. **Gregory A.E, Titball R., Williamson D.** **Vaccine delivery using nanoparticles.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [Online] 23. 5 2018. Dostupný na www: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3607064>.
12. **Zhao L. et al.** Nanoparticle vaccines. *Science Direct*. [Online] 2014. [Datum: 23. 5 2018.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X13016319>.

13. **Saraiva C. et al.** Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016, 235, s. 34-37. ISSN 0168-3659.
14. **Nikalje, P.A.** **Nanotechnology and its Applications in Medicine.** <https://www.omicsonline.org/>. [Online] 2015. [Datum: 23. 5 2018.] <https://www.omicsonline.org/open-access/nanotechnology-and-its-applications-in-medicine-2161-0444-1000247.php?aid=41535>.
15. **Rao J.P., Geckeler K.E.** Polymer nanoparticles Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 2011, 36(7), s. 887-913. ISSN 0079-6700.
16. **Reis C.P, Neufeld R.J.,Ribeiro A.J., Veiga F.** Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006, 2, s. 8-21. ISSN 15499634.
17. **Mužiková, J.** Granulometrie. *Štúdijský materiál*. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. s. 1-7. CZ.1.07.ú2.2.00/28.0194.
18. **Štaud, F.** **Absorbce.** <https://intranet.faf.cuni.cz>. [Online] [Datum: 20. 7 2018.] https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KFLT/?path=farmakologie%20i%20-%20zimn%C3%AD%20semestr%5Cfarmakologie%20i%20-%20dokumenty%5Csp%20farmacie_p%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ky%20farmakologie%20i_texty.
19. **AUTOR, NEZNÁMY, Zeta potencial analysis of nanoparticles.** <https://nanocomposix.com/>. [Online] 9 2012. [Datum: 20. 7 2018.] https://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/nanoComposix_Guidelines_for_Zeta_Potential_Analysis_of_Nanoparticles.pdf.
20. **Dittrich, M.** Farmaceutické suspenze. *Štúdijský materiál*. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. s. 1-10. CZ.1.07./2.2.00/28.0194.
21. **Lee B.K., Yun Y., Park K.** PLA Micro-and Nano-Particles. *Advanced Drug Delivery Reviews Journal Impact*. 2016, 107, s. 176-191. ISSN 0169-409X.
22. **Göpferich, A.,.** Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 1996, 17(2), s. 103-114. ISSN 0142-9612.

23. **Dittrich, M., Snejdrová, E.,** Cyclic Swelling as a Phenomenon Inherent to Biodegradable Polyesters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, 103, s. 3560-3566. ISSN 1520-6017.
24. **Snejdrova, E., Dittrich, M., Drastík, M.,** Plasticized branched aliphatic oligoesters as potential mucoadhesive drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, 458(2), s. 282-286. ISSN 0378-5173.
25. **Maxa, J., Dittrich, M.,** Use of synthetic biodegradable polymers in medicine. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2001, 50(1), s. 28-34. ISSN 1210-7816.
26. **Hickey, J. W., Santos, J.L., Williford, J.-M., Mao H.-Q.,** Control of Polymeric Nanoparticle Size to Improve Therapeutic Delivery. *Journal of Controlled Release*. 2015, 219, s. 536-547. ISSN 0168-3659.
27. **Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., Car, H.,** Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*. 2012, 64, s. 1020-1037. ISSN 1734-1140.
28. **Faraji, A.H., Wipf, P.,** Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2009, 17(8), s. 2950-2962. ISSN 2941-3220.
29. **Leroux, J.-C., Allémann, E., De Jaeghere, F., Doelker, E., Gurny, R.,** Biodegradable nanoparticles - From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1996, 39 (2-3), s. 339-350. ISSN 0168-3659.