

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutickej technológie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**PRÍPRAVA POLYMÉRNÝCH FLUORESCENČNÝCH
NANOČASTÍC**

Hradec Králové, 2021

Daniela Širajová

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

V Hradci Králové

.....

Daniela Širajová

Rada by som na tomto mieste poďakovala PharmDr. Ondřejovi Holasovi, PhD. za odborné vedenie, trpezlivosť a cenné rady pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Veľká vďaka tiež patrí Mgr. Barbore Boltnarovej za ochotu a pomoc v laboratóriu a Kataríne Kostíkovej za psychickú podporu a pomoc.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. ABSTRAKT | 6 |
| 2. ABSTRACT | 7 |
| 3. ÚVOD A CIEĽ PRÁCE | 8 |
| 4. TEORETICKÁ ČASŤ | 9 |
| 4.1 Nanotechnológia | 9 |
| 4.2 Nanočasticový nosičový systém | 9 |
| 4.2.1 Typy nanonosičov | 10 |
| 4.2.1.1. Lipozómy | 10 |
| 4.2.1.2 Pevné lipidové častice | 11 |
| 4.2.1.3 Uhlíkové nanotrubičky | 11 |
| 4.2.1.4 Dendriméry | 11 |
| 4.2.1.5 Polymérne nanočastice | 12 |
| 4.2.1.5.1 PLGA nanočastice | 13 |
| 4.3 Príprava polymérnych nanočastíc | 14 |
| 4.3.1 Nanoprecipitácia | 14 |
| 4.3.2 Metóda vyoľovania | 15 |
| 4.3.3 Emulzne difúzna vyparovacia metóda | 16 |
| 4.3.4 Polymerizácia | 17 |
| 4.4 Cielená distribúcia časticových systémov | 18 |
| 4.4.1 Pasívny targeting | 18 |
| 4.4.2 Aktívny targeting | 18 |
| 4.5 Úprava povrchu nanočastíc | 19 |
| 4.6 Inkorporácia liečiv | 21 |
| 4.7 Uvoľňovanie liečiva | 21 |
| 4.8 Charakterizácia nanočastíc | 22 |
| 4.8.1 Veľkosť a tvar nanočastíc | 22 |
| 4.8.1.1 Dynamický rozptyl svetla | 23 |
| 4.8.1.2 TEM a SEM | 23 |
| 4.8.2 Zeta potenciál | 24 |
| 4.8.3 Polydisperzita | 25 |
| 5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 26 |
| 5.1 Použité suroviny | 26 |
| 5.1.1 PLGA polyméry | 26 |

| | |
|---|----|
| 5.1.2 Fluoresceín | 26 |
| 5.1.3 Stabilizátor (poloxamér 407) | 27 |
| 5.1.4 Povrchovo aktívna látka | 27 |
| 5.1.5 Rozpúšťadlá | 28 |
| 5.2 Použité prístroje | 28 |
| 5.3 Použité metódy | 28 |
| 5.3.1 Príprava nanočastíc | 28 |
| 5.3.2 Centrifugácia | 29 |
| 5.3.3 Meranie enkapsulácie fluoresceínu | 29 |
| 5.3.4 Enkapsulačná efektivita | 30 |
| 5.3.5 Analýza nanočastíc na Zetasizeri | 30 |
| 5.3.6 Disolúcia | 31 |
| 6. VÝSLEDKY A DISKUSIA | 32 |
| 6.1 Enkapsulačná efektivita | 32 |
| 6.2 Veľkosť častíc | 38 |
| 6.2.1 Polydisperzita častíc | 41 |
| 6.3 Zeta potenciál | 42 |
| 6.4 Disolúcia | 45 |
| 7. ZÁVER | 46 |
| 8. POUŽITÉ SKRATKY | 47 |
| 9. ZOZNAM OBRÁZKOV | 48 |

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Školiteľ: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Poslucháč: Daniela Širajová

Názov diplomovej práce: Príprava polymérnych fluorescenčných nanočastíc

Nanočastice založené na biodegradovateľných polyesteroch sú široko využívanou platformou pre ciele dodanie liečiv a ich následné riadené uvoľňovanie.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo pripraviť a optimalizovať prípravu polymérnych nanočastíc s fluorescenčným farbivom ako modelovou látkou. Na prípravu nanočastíc bola použitá metóda nanoprecipitácie. Hodnotili a porovnávali sa nanočastice pripravené z dvoch druhov polymérov PLGA (COOH terminovaný a esterom terminovaný). Na optimalizovanie prípravy bola použitá povrchovo aktívna látka a stabilizátor v rôznych koncentračných pomeroch. Povrchovo aktívnou látkou bol cholát sodný v koncentráciách 0,1%, 0,5%, 1%, 2% a 5%. Nanočastice boli stabilizované poloxamérom Pluronic F-127 v koncentráciách 0,1%, 0,5% a 1%. Nanočastice sa porovnávali z hľadiska enkapsulačnej efektivity, veľkosti častíc a zeta potenciálu. V disolučnom experimente sa hodnotilo a porovnávalo množstvo uvoľneného fluoresceínu v závislosti na čase (48 hodín), ktorý prebiehal s PLGA zakončeným kyselinou a cholátom sodným v koncentráciách 0,1 % a 2 %.

Nanočastice pripravené z oboch polymérov v prítomnosti rôznej koncentrácie cholátu a Pluronic F-127 sú v inkorporácii fluoresceínu rovnako výhodné a dochádza k takmer kompletnej enkapsulácii. Mierny pokles enkapsulačnej efektivity spôsobila zvyšujúca sa koncentrácia cholátu sodného. Stabilizátor Pluronic F-127 nemal na hodnotu enkapsulácie pravdepodobne žiaden vplyv. Veľkosť nanočastíc pripravených z polyméru terminovaného karboxylom v prítomnosti zvyšujúcej sa koncentrácie cholátu vykazovala klesajúci trend až do koncentrácie cholátu 5 %, keď bola hodnota veľkosti nanočastíc vyššia. U nanočastíc tvorených polymérom PLGA terminovaný esterom v prítomnosti cholátu sodného bola nameraná so zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu vyššia hodnota veľkosti nanočastíc. Pridaním stabilizátora v rôznych koncentráciách sa hodnota veľkosti nanočastíc pripravených z polyméru PLGAA mierne zvýšila.

Kľúčové slová: PLGA, nanočastice, fluoresceín, nanoprecipitácia, enkapsulačná efektivita

2. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Student: Daniela Širajová

Title of thesis: Preparation of polymeric fluorescent nanoparticles

Nanoparticles based on biodegradable polyesters are a widely used platform for targeted drug delivery and subsequent controlled release.

The aim of this diploma thesis was to prepare and optimize the preparation of polymeric nanoparticles with a fluorescent dye as a model substance. The nanoprecipitation method was used to prepare the nanoparticles. Nanoparticles prepared from two types of PLGA polymers (COOH terminated and ester terminated) were evaluated and compared. The surfactant and stabilizer were used in various concentration ratios to optimize the preparation. The surfactant was sodium cholate at concentrations of 0.1%, 0.5%, 1%, 2% and 5%. The nanoparticles were stabilized with Pluronic F-127 poloxamer at concentrations of 0.1%, 0.5% and 1%. Nanoparticles were compared in terms of encapsulation efficiency, particle size and zeta potential. In a dissolution experiment, the amount of fluorescein released was evaluated and compared as a function of time (48 hours) with acid-terminated PLGA and sodium cholate at concentrations of 0.1% and 2%.

Nanoparticles prepared from both polymers in the presence of different concentrations of cholate and Pluronic F-127 are equally advantageous in fluorescein incorporation and almost complete encapsulation occurs. The slight decrease in encapsulation efficiency was caused by the increasing concentration of sodium cholate. The Pluronic F-127 stabilizer had probably no effect on the encapsulation value. The size of the nanoparticles prepared from the carboxyl-terminated polymer in the presence of increasing cholate concentrations showed a decreasing trend up to a cholate concentration of 5% when the nanoparticle size value was higher. For ester-terminated PLGA polymer nanoparticles in the presence of sodium cholate, a higher nanoparticle size value was measured with increasing cholate concentration. By adding a stabilizer at various concentrations, the size value of the nanoparticles prepared from the PLGAA polymer was slightly increased.

Keywords: PLGA, nanoparticles, fluorescein, nanoprecipitation, encapsulation efficiency

3. ÚVOD A CIEĽ PRÁCE

Nanotechnológia ako jedna z nových vedných disciplín má skvelú perspektívu v rôznych oblastiach výskumu a vývoja. Veľmi sľubný rozvoj nastal hlavne v oblasti medicíny, keď je možné vytvoriť také nanočastice, ktoré v sebe budú obsahovať liečivo a to dopraví na špecifické miesto, kde bude pôsobiť na špecifické tkanivo. Nanočastice teda slúžia ako nosiče liečiv, ktoré majú tiež schopnosť liečivá ochrániť pred ich nechcenou či skorou degradáciou, môžu predĺžiť ich účinok či zabrániť nežiaducim účinkom.

Enkapsulácia predstavuje jednu z viacerých možností, ako môžeme liečivo inkorporovať do nanočastice. Najideálnejšia situácia nastáva vtedy, ak sa do nanočastíc enkapsuluje celé množstvo liečiva a nanočastice pritom zostávajú stále rovnako stabilné a dostupné pre špecifické tkanivo.

Cieľom tejto práce bolo pripraviť a optimalizovať prípravu nanočastíc s enkapsulovaným fluorescenčným farbivom fluoresceínom. Táto zlúčenina bola zvolená ako modelová molekula s nízkou rozpustnosťou vo vode a molekulovou hmotnosťou blízkou liečivám, ktoré budú v rámci tohto projektu enkapsulované neskôr. Sledovanými parametrami bola veľkosť, distribúcia veľkosti, zeta potenciál a enkapsulačná efektívnosť.

4. TEORETICKÁ ČASŤ

4.1 Nanotechnológia

Nanotechnológia patrí medzi nové vedné disciplíny, ktoré spájajú poznatky z fyziky, chémie, inžinierstva či molekulárnej biológie. Zmyslom tohto vedného odboru je skúmať nanoštruktúry a ich vlastnosti a interpretovať tieto znalosti do praxe v podobe vzniku nových materiálov a zariadení. (1)

V súčasnosti má nanotechnológia široké množstvo uplatnení napríklad v zdravotníctve, kde sa čoraz viac využíva ako nosič liečiva pre rôzne ochorenia. Takisto sa aplikuje aj v poľnohospodárstve, forenznej vede, elektronike či vesmíre. (2)

V posledných rokoch došlo k výraznému prílivu poznatkov z oblasti medicíny, ktoré sa týkajú dôležitých procesov v ľudskom tele. Vďaka týmto informáciám bolo možné vytvoriť nové možnosti liečby rôznych ochorení. Ide o liečbu biologicky aktívnymi látkami ako sú peptidové hormóny, protilátky, rastové hormóny, enzýmy, vakcíny a veľa ďalších, ktorých aplikácia je väčšinou parenterálna. Existuje však aj možnosť perorálneho podania, ktoré je výhodné z hľadiska zvýšenia kompliance pacienta. Toto podanie je limitované nízkou biodistribúciou (vysoké pH, degradácia enzýmov, zlá permeabilita črevnej sliznice). Riešením je enkapsulácia daných biologik do nanočastíc, ktoré ich chránia pred skorou degradáciou a inaktiváciou. (3)

4.2 Nanočasticový nosičový systém

Nanočasticový nosičový systém je systém, ktorý je schopný liečivo dispergovať, adsorbovať, enkapsulovať a konjugovať, a to v rozmedzí od 1nm do 1000nm. (4)

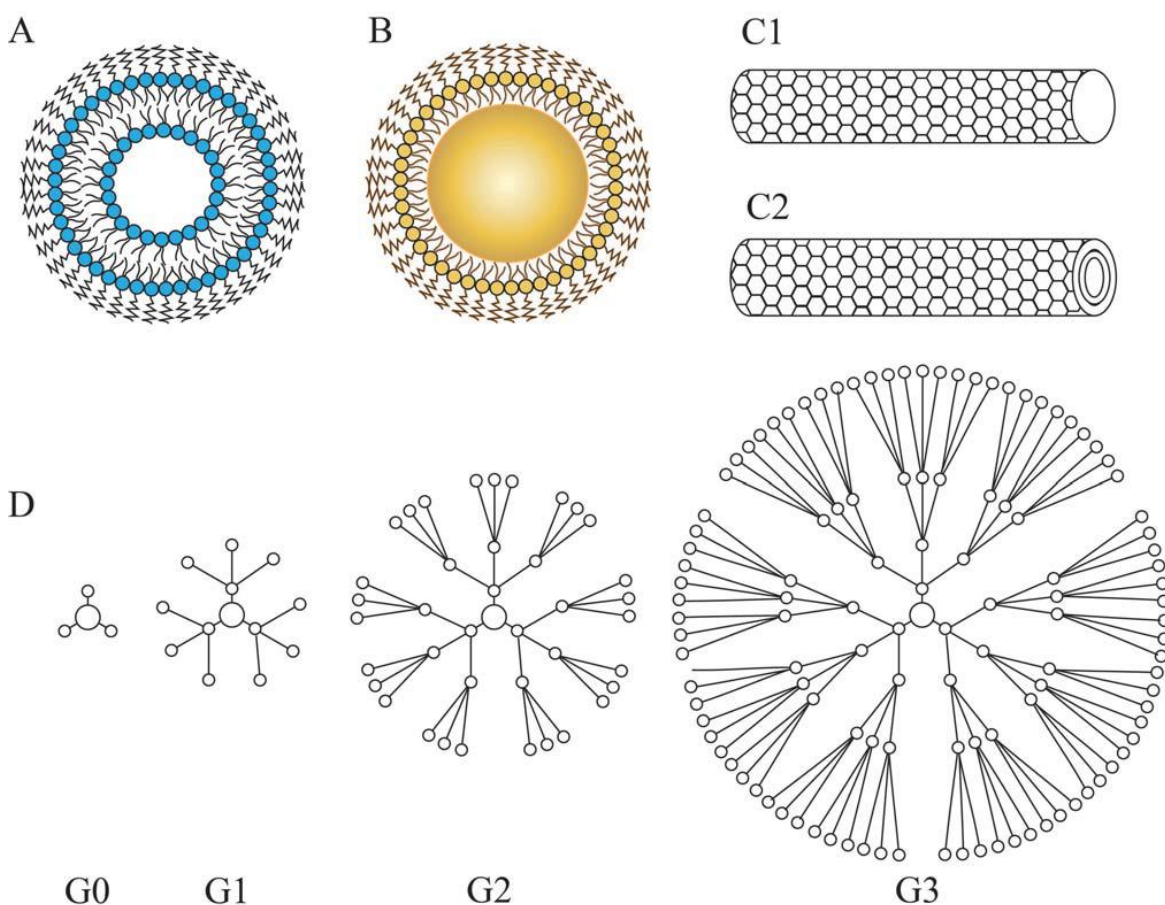
Medzi jeho hlavné prínosy, čo sa týka oblasti farmácie a medicíny, patrí zlepšenie dodania liečiva ťažko rozpustného vo vode, cielené doručenie liečiva do určitého orgánu, tkaniva alebo buniek, spoločné dodanie dvoch a viac liečiv v rámci kombinovanej terapie. Tento systém má potenciál vo zvýšení biologického účinku liečiva pravdepodobne vďaka blokácii enzymatickej degradácie liečiva, zlepšuje sa aj jeho medzibunková penetrácia. Taktiež je pomocou neho možné ovplyvniť aj dĺžku pôsobenia liečiva v špecifických tkanivách a znížiť toxický alebo nežiaduci účinok liečiv. Mnoho ťažko liečiteľných ochorení (rakovina, AIDS, tuberkulóza, atď.) je možné liečiť na základe týchto systémov. (2; 4; 5)

Nanočastice majú využitie v dodávaní hydrofilných, hydrofóbných liečiv či proteínov do rôznych orgánov a štruktúr v organizme. Medzi štyri najzásadnejšie charakteristiky, ktoré budú popísané v tejto práci a ktoré musia nanočastice spĺňať, patrí veľkosť, povrchový náboj, enkapsulačná efektívnosť a spôsob uvoľňovania. (6)

4.2.1 Typy nanonosičov

Nanočastice sú malé objekty, ktoré bývajú pripravené z rôznych materiálov, ktoré rozlišujeme na prírodné a syntetické, a tiež môžu byť anorganické alebo organickej povahy. Medzi popredné anorganické nanočastice patria zlaté nanočastice, ktoré sú významné najmä kvôli ich jednoduchšej úprave v oblasti tvaru či veľkosti. Je potrebné dodať, že nejde o biologicky odbúrateľné štruktúry a dochádza k ich hromadeniu v živých tkanivách. (7; 8; 9)

Veľkou výhodou väčšiny organických nanočastíc je ich biodegradovateľnosť. Výnimku z nich tvoria fullerény a uhlíkové nanotrubičky. (7)



Obrázok č. 1 Typy nanočastíc (11)

(A - lipozóm, B - pevná lipidová nanočastica, C 1,2 - uhlíkové nanotrubičky, D - diméry)

4.2.1.1. Lipozómy

Lipozómy sú vezikulárne útvary tvorené z lipidových dvojvrstiev, medzi ktorými sa nachádza vodná vnútorná fáza. Ich veľkosť je v rozmedzí od 20nm do 5 μ m. Majú schopnosť zapuzdriť lipofilné látky v lipidovej vrstve, ako aj hydrofilné látky vo vodnom vnútri, a preto majú potenciál v liečbe rakoviny. K ich ďalším výhodám patrí

biokompatibilita, biologická odbúrateľnosť, zlepšujú rozpustnosť, dodanie a distribúciu liečiva, je tu aj možnosť cieleného dodania liečiva. Avšak aj napriek týmto výhodám môžu lipozómy zle interagovať s krvnými zložkami kvôli nízkej chemickej a fyzikálnej stabilite, tá sa môže zvýšiť PEGylovaním. (4; 11; 12) Vykazujú aj nízku účinnosť enkapsulácie a rýchly únik hydrofilných liečiv z krvného riečiska, čo predstavuje problém pre uvoľňovanie rôznych liečiv. (6)

4.2.1.2 Pevné lipidové častice

Pevné lipidové častice patria medzi koloidy s veľkosťou od 50nm do 1000nm. Tvoria ich pevné lipidové jadro obklopené jednou vrstvou fosfolipidov alebo iných stabilizátorov. V jadre, ktoré má vysokú teplotu topenia, môže byť dispergované alebo rozpustené hydrofilné alebo hydrofóbne liečivo, poprípade aj kombinácia liečiv. Okrem schopnosti obsiahnuť väčšie množstvo liečiva s pomalým uvoľňovaním patrí medzi ďalšie výhody tohto typu nanočastíc zvýšená stabilita a rozpustnosť vo vode zle rozpustných liečiv, ochrana liečiv pred ich degradáciou vonkajšími vplyvmi či schopnosť modifikácie povrchu liečiva napr. PEG (polyetylén glykol), čím sa liečivo dokáže skryť pred mononukleárnym fagocytickým systémom a nebude fagocytované. (4; 11)

4.2.1.3 Uhlíkové nanotrubičky

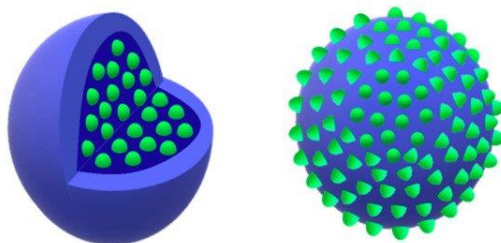
Uhlíkové nanotrubičky sa pripravujú z jednej vrstvy grafitu, ktorý sa označuje ako grafén. Tento grafén je následne možné zrolovať do nanotrubičky tvorenej z jednej alebo viacerých vrstiev s priemerom od 10 do 100nm a dĺžkou aj niekoľko mikrometrov. Liečivo je na ne možné naviazať priamo na ich povrch alebo do vnútra. Napriek tomu, že sú nanotrubičky nerozpustné vo všetkých rozpúšťadlách a sú toxické, je ich toxicita znížená kvôli ich dĺžke a priemeru. Vhodnou úpravou môžeme získať nanotrubičky, ktoré budú rozpustné vo vode, a tým sa stanú kompatibilné s plazmatickou membránou, čo umožní cytotoxickým liečivám ľahšie prenikanie do vnútra patologických buniek. (11; 13)

4.2.1.4 Dendriméry

Dendriméry, inak zvané tiež dendritické polyméry, sú rozvetvené 3D nanočastice o veľkosti od 10nm do 100nm, ktoré majú presne definovanú pravidelnú štruktúru. Stred dendrimérov tvorí jadro, pozostávajúce z iónov kovu alebo napríklad etyléndiamínu, na ktoré sa viažu monomérene jednotky. Každá vrstva týchto jednotiek sa označuje ako generácia. Liečivo je možné vložiť do jadra alebo ho naviazať na vetvený povrch, ktorý obsahuje veľké množstvo rôznych funkčných skupín. Na tie je možné tiež naviazať aj látky, ktoré by zvyšovali biokompatibilitu, biodegradáciu, zvyšovali rozpustnosť vo vode alebo pôsobili priamo na presne určené tkanivo. (4; 11; 12; 13)

4.2.1.5 Polymérne nanočastice

Polymérne nanočastice patria medzi jedny z najslubnejších nosičov liečiv. Ide o prevažne biologicky odbúrateľné štruktúry, pomocou ktorých je možné zlepšiť rozpustnosť vo vode nerozpustných liečiv, kontrolovať a predĺžiť pôsobenie liečiva v bunkách, znížiť toxicitu liečiva alebo ho ochrániť pred nechcenou degradáciou. (13; 14) Skladajú sa z jadra tvoreného z hustej polymérnej matrice schopnej enkapsulovať prevažne hydrofóbne liečivo a obalu, ktorý môže byť zložený z hydrofilného polyméru. Tento obal po intravenóznom podaní zabezpečuje stérickú stabilitu a maskuje nanočasticu. (15) Delia sa na nanosféry, čo sú útvary, ktoré môžu adsorbovať liečivo na svoj povrch alebo ich zachytiť vo vnútri častice a nanokapsuly, ktoré majú v jadre olejovú alebo vodnú fázu, kde sa nachádza rozpustené liečivo, obklopené polymérnou slupkou. (13; 14)



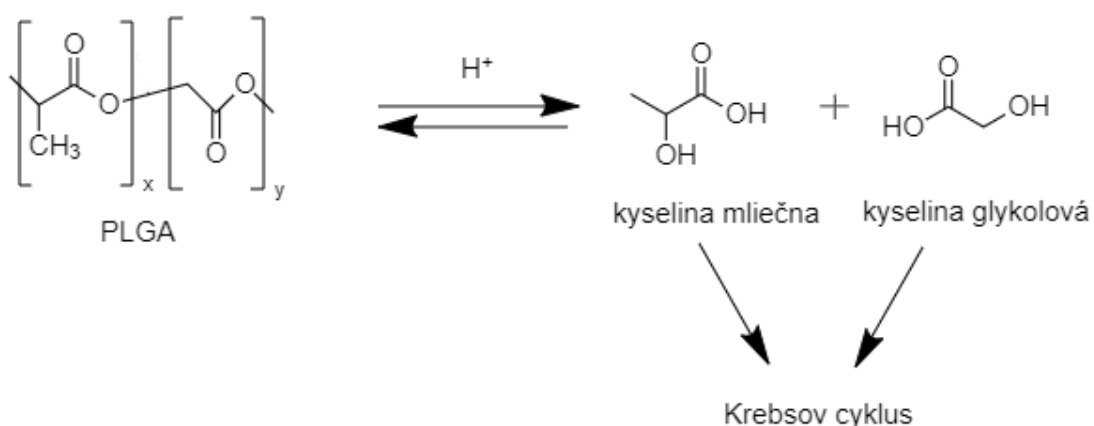
Obrázok č. 2 Nanokapsula a nanosféra (14)

Polymérne nanočastice majú veľké množstvo výhod, čo sa týka pôsobenia liečiva v organizme. Existuje však rozdiel medzi prírodnými a syntetickými polymérnymi nanočasticami. Nanočastice vzniknuté zo syntetického polyméru ako napríklad kyselina polyglutámová a kyselina polyglykolová (PGA), polyetylén glykol (PEG), kyselina polymliečna (PLA), poly(mliečna-co-glykolová) kyselina (PLGA), N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidový kopolymér (HPMA) sú vo svojom zložení oveľa homogénnejšie a čistejšie než tie, ktoré sú vzniknuté z prírodných polymérov, ako je želatína, chitosan, dextran či kolagén. Aj keď sú netoxické, ľahko biologicky odbúrateľné a lacné, pred ich využitím je nutné čistenie. (13) Taktiež majú syntetické polymérne nanočastice výhodu v tom, že sú schopné uvoľňovať liečivo aj niekoľko týždňov na rozdiel od krátkeho uvoľňovania liečiva z nanočastíc prírodného pôvodu. (16) Prínosné sú aj v oblasti spôsobu podávania liečiva, ktorý môže byť orálny, nazálny, parenterálny. (4)

Biologická degradácia sa odohráva súčasne alebo oddelene a býva enzymatického, chemického alebo mikrobiálneho pôvodu. Pôsobia na ňu rôzne faktory: chemická štruktúra a zloženie, fyzikálne a fyzikálne-chemické faktory, morfológia, spôsob degradácie, distribúcia, cesta podania, miesto účinku, atď. (17)

4.2.1.5.1 PLGA nanočastice

Nanočastice PLGA sú jedny z najrozšírenejších nanočastíc vo svete nanomedicíny a nanofarmácie. (2) Ide o syntetické, polyesterové nanočastice vytvorené kopolymerizáciou dvoch monomérov, a to kyseliny mliečnej (LA) a glykolovej (GA). (10; 19; 20) Ich syntetický pôvod im zabezpečuje veľké množstvo výhod ako napr. to, že sú veľmi čisté, a teda je ich možné ľahko reprodukovat'. Taktiež sú biokompatibilné a biodegradovateľné (4), pretože hydrolýzou PLGA in vivo, dochádza ku vzniku monomérov kyseliny mliečnej a glykolovej, ktoré sa bežne vyskytujú v ľudskom organizme, a vylúčia sa vo forme oxidu uhličitého a vody. (20) Možno konštatovať, že PLGA nepredstavujú žiadne nebezpečenstvo z hľadiska toxicity na organizmus. (2)



Obrázok č. 3 Hydrolýza PLGA (2)

PLA a PGA sú polyestery, ktoré sa medzi sebou líšia prítomnosťou metylovej skupiny na molekule PLA, na základe ktorej je PLA hydrofóbná. (14; 19) PGA sa rýchlo degraduje a vykazuje nízku rozpustnosť v organických rozpúšťadlách. PLA tvorí zmes D,L-laktidu, pričom PLLA je semikryštalická a PLGA amorfna látka a degraduje sa v porovnaní s PGA pomalšie, preto boli vytvorené kopolyméry PLGA s rôznymi pomermi GA a LA. (19)

Uvoľňovanie liečiva ovplyvňuje úprava povrchu PLGA nanočastíc, veľkosť častíc, pomocné látky, molekulová hmotnosť či rôzny pomer mliečnej a glykolovej skupiny. (2) Rýchlosť degradácie PLGA sa zvýši so zvýšením pomeru GA:LA a naopak. (19)

Dnes je možné použiť nanočastice v liečbe rôznych ochorení, ako materiál na výrobu chirurgických vstrebateľných stehov alebo chirurgických implantátov. (2; 10)

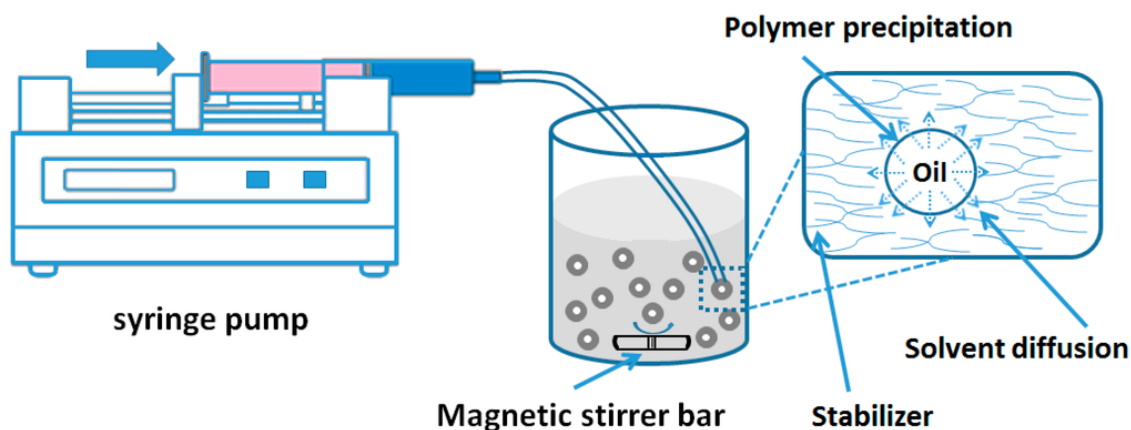
4.3 Príprava polymérnych nanočastíc

Metódy na prípravu polymérnych nanočastíc sa delia na: bottom-up a top-down. Medzi bottom-up metódy patrí emulzná a mikroemulzná polymerizácia, zrážacia polymerizácia a iné. Princípom vzniku nanočastíc pripravených týmito metódami je polymerizácia monomérov. Nanoprecipitácia, vysolovanie a emulzne difúzna vyparovacia metóda patria medzi top-down. Počas týchto metód vznikajú nanočastice z predpripraveného polyméru. (21)

4.3.1 Nanoprecipitácia

Nanoprecipitácia patrí medzi jednoduché metódy prípravy nanočastíc. Ide o zmiešanie dvoch miešateľných rozpúšťadiel. V polárnom rozpúšťadle, ktoré je miešateľné s vodou (napríklad acetón, acetonitril, etanol), je rozpustený polymér a liečivo. V druhom roztoku sa nachádza vodná fáza s povrchovo aktívnou látkou. Po pridaní polárneho roztoku do vodnej fázy, organické rozpúšťadlo difunduje do dispergačného média, ktoré má charakter antisolventu pre daný polymér a dochádza k precipitácii, teda vyzrážaniu polyméru, ktorý v sebe zachytí liečivo. Potom sa za zníženého alebo atmosférického tlaku odstráni organické rozpúšťadlo. Rýchly vznik nanočastíc je spôsobený Marangoniho efektom, pri ktorom dochádza k turbulenciám medzi fázami pomocou komplikovaných reakcií. (21; 22)

Táto metóda je výhodná pre hydrofóbne liečivá neprenikajúce do vodnej fázy tak jednoducho ako hydrofilné liečivá, ktorých množstvo vo vzniknutej nanočastici je vzhľadom k ich vlastnostiam výrazne nižšie. (10)



Obrázok č. 4 Metóda nanoprecipitácie (23)

Medzi hlavné výhody nanoprecipitácie patrí:

- prispôsobiteľná veľkosť nanočastíc pomocou rôznych excipientov
- používanie málo toxických rozpúšťadiel
- možnosť jednoduchého miešania bez ultrazvuku či zvyšovania teploty

Nevýhodou je:

- nutnosť vysokej solubilizácie liečiva v rozpúšťadle a nie vo vode
- čas potrebný na odparenie rozpúšťadla (21)

Dôležité faktory v procese nanoprecipitácie sú koncentrácia polyméru, koncentrácia a vlastnosti surfaktantu, pomer medzi pridaným polymérom a surfaktantom, vlastnosti rozpúšťadla, rýchlosť miešania vodnej fázy, rýchlosť a spôsob vstreknutia organickej fázy, viskozita a iné pomocné látky. Pridanie surfaktantu nemusí byť nutné, avšak po jeho pridaní sa nanočastice ochránia pred zhlukovaním, ktoré im hrozí počas dlhého skladovania. (18; 21)

4.3.2 Metóda vysolovania

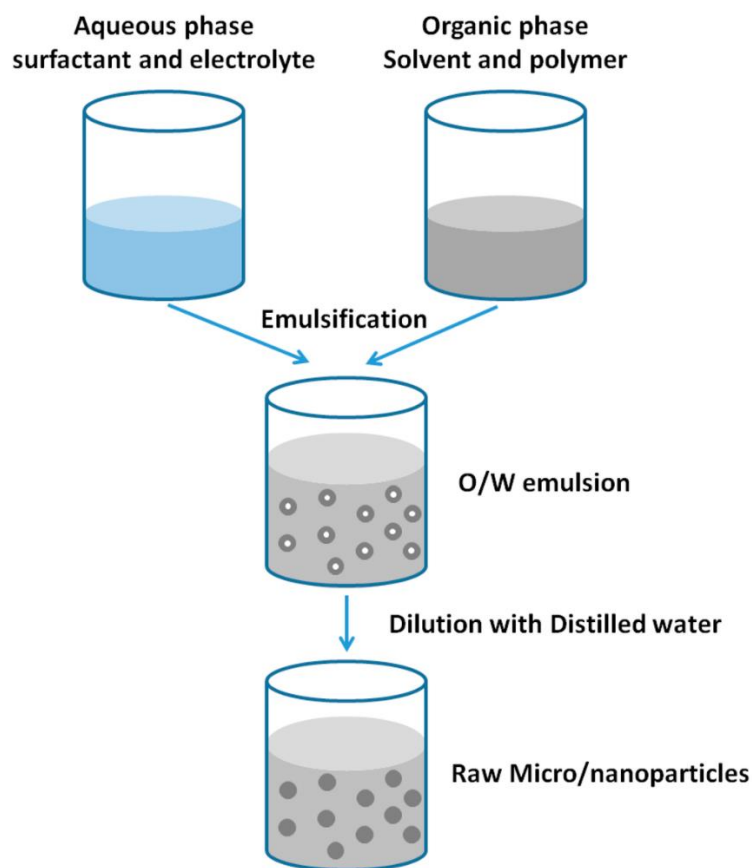
Metóda vysolovania patrí spolu s nanoprecipitáciou medzi top-down metódy. Organickú fázu tvorí polymér, ktorý sa rozpustí v organickom rozpúšťadle miešateľnom s vodou, ktorým môže byť acetón alebo tetrahydrofurán. Vo vodnej fáze sa nachádza emulgátor a vysoko koncentrované elektrolyty, ktoré nie sú rozpustné v rozpúšťadle. Najviac používanými elektrolytmi sú hexahydrát chloridu horečnatého v 60 %-nej koncentrácii a tetrahydrát octanu horečnatého v pomere polymér a elektrolyt 1:3. Organická fáza s polymérom sa emulguje do vodnej prostredníctvom silného šmykového napätia a stáleho miešania. Do tejto emulzie o/v sa rýchlo pridá čistá voda, prostredníctvom čoho dôjde k zníženiu iónovej sily v elektrolytoch. Organické rozpúšťadlo začne prenikať medzi molekuly vodnej fázy a dôjde k vzniku nanočastíc. Na záver sa nanočastice očistia od pridaných elektrolytov pomocou centrifúgy alebo filtrácie s priečnym tokom. (10; 21; 23)

Výhody tejto prípravy nanočastíc:

- málo energeticky náročný proces, ktorý využíva len miešanie
- časová úspora

Značnou nevýhodou je nutnosť odstránenia väčšieho množstva elektrolytu v čistiacom kroku tejto metódy. (21)

Túto metódu môže ovplyvniť koncentrácia polyméru a tiež jeho molekulová hmotnosť. Takisto je dôležitá koncentrácia a vlastnosti surfaktantu a rozpúšťadla, rýchlosť a doba miešania. (21)

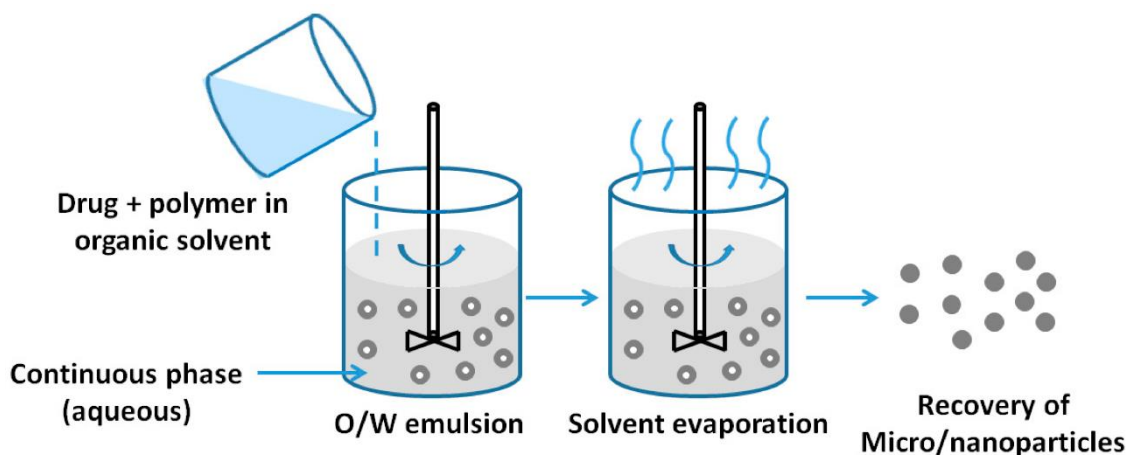


Obrázok č. 5 Metóda vysolovania (23)

4.3.3 Emulzne difúzna vyparovacia metóda

Táto metóda sa využíva prevažne pre hydrofóbne liečivá, pretože hydrofilné by sa mohli rozpustiť vo vodnej fáze a nedošlo by k ich enkapsulácii. Pre ne je výhodnejšia metóda dvojitej emulzie. Proces prípravy prebieha v dvoch krokoch. Najprv sa polymér rozpustí v organickom rozpúšťadle, ktoré je čiastočne miešateľné s vodou. Medzi najbežnejšie rozpúšťadlá patrí etylacetát alebo benzylalkohol. Pridá sa do vodnej fázy, v ktorej je rozpustený stabilizátor. V tomto kroku vzniknutej emulzie (o/v) je nutné použiť vysoké šmykové napätie, aby došlo k zmenšeniu veľkosti emulznej kvapky. Bez tohto napätia by mohlo dôjsť k Ostwaldovmu dozrievaniu, čo je znižovanie malých častíc na úkor väčších. V druhom kroku dochádza odparením rozpúšťadla k vzniku nanočastíc. Počas tejto metódy prípravy nanočastíc dochádza k difúzii molekúl rozpúšťadla do vodnej fázy, čo predstavuje hlavný rozdiel medzi touto metódou a metódou vysolovania, keď k difúzii nedochádza kvôli prítomnosti elektrolytov. (10; 21; 23)

V tejto metóde sa musí vziať do úvahy koncentrácia polyméru a rozpúšťadla, typ rozpúšťadla, molekulová hmotnosť surfaktantu. Dôležité je tiež správne zvoliť rýchlosť a dobu miešania a teplotu vody. (21)



Obrázok č. 6 Emulzne difúzna vyparovacia metóda (23)

Výhody:

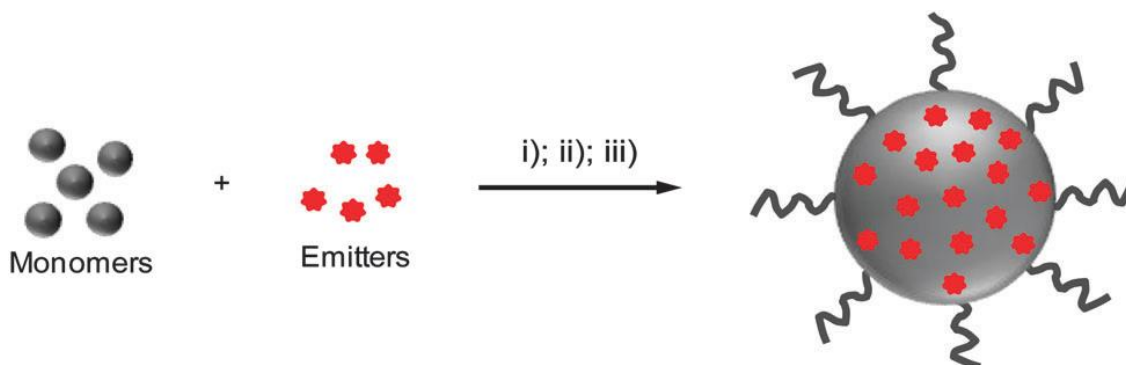
- použitie málo toxických rozpúšťadiel
- prídanie pomocných látok, ktoré ovplyvnia veľkosť nanočastíc
- možnosť zabudovania hydrofilných aj hydrofóbných zložiek

Nevýhody:

- energeticky náročný proces kvôli nutnosti využitia vysokej šmykovej sily
- časovo náročnejší proces kvôli nutnému odpareniu rozpúšťadla (21)

4.3.4 Polymerizácia

Počas tejto metódy dochádza k vzniku polymérnych nanočastíc z ich subjednotiek – monomérov. V rozpúšťadle sa nachádzajú organické žiariče a monoméry. Pomocou ultrazvuku dôjde k dispergácii stabilných olejových kvapôčok vo vodnom roztoku obsahujúcom emulgátor. V ďalšom kroku polymerizácie monomérov sa prídanim iniciátorov do tejto emulzie vytvoria disperzie nanočastíc. Pre vznik finálnych polymérnych nanočastíc je potrebné zaistiť odparenie rozpúšťadla. (24)



Obrázok č. 7 Polymerizácia (24)

4.4 Cielená distribúcia časticových systémov

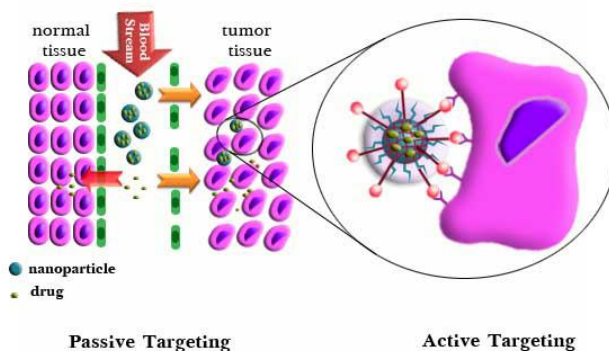
Targeting alebo tiež cieľené dodávanie liečiv je možné dosiahnuť buď pasívnym targetingom, ktorý je založený na rozdieloch medzi patologicky zmeneným a zdravým tkanivom, alebo pomocou naviazania špecifických ligandov na povrch nanočastíc, keď ide o aktívny targeting. (25)

4.4.1 Pasívny targeting

Pasívny targeting je zameraný na anatomické rozdiely v zdravom a poškodenom tkanive. Týka sa to prevažne nádorov, zápalových zmien endotelu v pečeni a hypoxiou poškodených buniek myokardu. Poškodené tkanivo sa vyznačuje väčšou vaskulárnou hustotou, netesnosťou a vyššou priepustnosťou. Cievny s takýmito vlastnosťami zvyšujú permeabilitu pre makromolekuly a nanočastice, ktoré môžu unikať z cievného riečiska a hromadiť sa v postihnutých bunkách. Navyše nie sú z tohto tkaniva odstraňované lymfatickým systémom, pretože v patologicky zmenených tkanivách lymfatické cievy chýbajú alebo nefungujú a nedochádza k ich odtoku. Princípom tohto cieľného podávania liečiv je efekt zvýšenej permeability a retencie (EPR). Účinok EPR býva ovplyvnený vlastnosťami poškodeného tkaniva a vlastnosťami nanočastíc, ako je veľkosť, povrchový náboj či povrchová modifikácia a hydrofobicita. Na rozdiel od aktívneho targetingu, nanočastica na svojom povrchu nemá naviazaný ligand pre určenie špecifického miesta pôsobenia. (2; 20; 26; 25)

4.4.2 Aktívny targeting

Tento spôsob dodávania liečiva do tkanív a buniek je výhodnejší než pasívny targeting alebo voľne dodávané liečivo. Je možné zamerať sa cieľene na tumorové bunky. Na povrch nanočastice sa naviaže špecifický ligand/marker, ktorý bude špecificky pôsobiť na receptory v cieľových bunkách. Takto pripravené nanočastice majú vyššiu afinitu k špecifickým bunkám a ľahšie penetrujú. Ligandami môžu byť peptidy, nukleové kyseliny, monoklonálne protilátky a ich fragmenty alebo aptaméry. (20; 26)

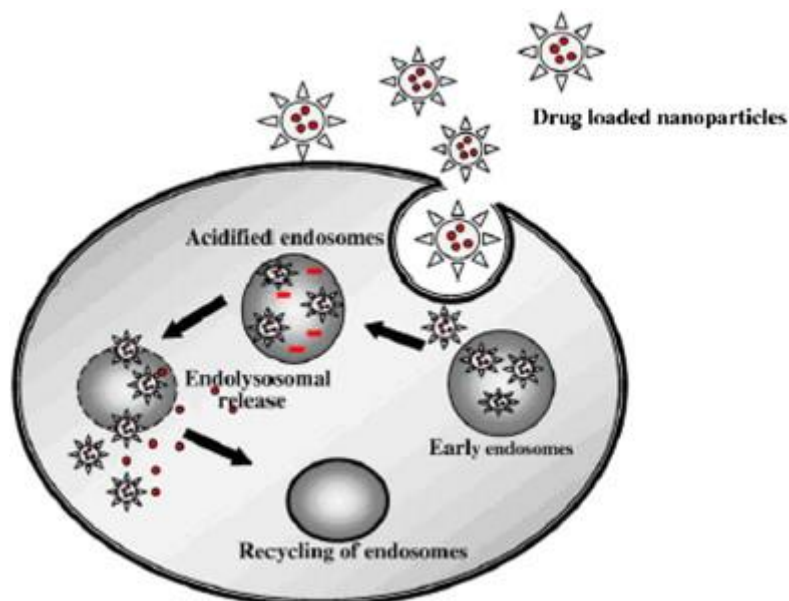


Obrázok č. 8 Pasívny a aktívny targeting (20)

4.5 Úprava povrchu nanočastíc

Nanočastice sú internalizované do buniek pomocou niekoľkých mechanizmov – fagocytózou, pinocytózou a endocytózou sprostredkovanou receptormi. (9) Fagocytóza je dej špecifický pre profesionálne požírače - makrofágy. Pinocytóza je dej, pri ktorom dochádza k pohlteniu častíc mechanizmom invaginácie každým typom buniek. Receptorom sprostredkovaná endocytóza je ešte viac selektívnejšia k určitému typu buniek. Na membráne bunky sa nachádza veľké množstvo receptorov, na ktoré je možné naviazať špecifické ligandy funkcionalizovaných nanočastíc. Po ich naviazaní dochádza k prenosu signálu do vnútra bunky. (27)

Ako znázorňuje obrázok č. 9, PLGA nanočastice sa uvoľňujú z endolizozómov a prenikajú do cytoplazmy. To je umožnené na základe vzájomného pôsobenia nanočastice a membrány vezikula, ktorá sa na istý čas destabilizuje. V danom momente sa nanočastice dostanú do cytosolu. Tieto nanočastice sú rozpoznávané mononukleárne fagocytickým systémom (MFS), ktorý ich identifikuje ako cudzie a vylúči krvným obehom do pečňových a slezinných buniek. Práve toto rozpoznanie je hlavnou prekážkou v oblasti cieleného dodávania liečiva. (9)

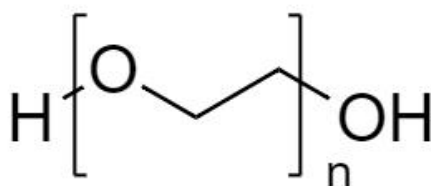


Obrázok č. 9 Vstup nanočastice do bunky (9)

Typ nanočastíc, ich príprava a úprava sú plne ovplyvňované typom účinnej látky, jej stabilitou, permeabilitou a uvoľňovaním. Organizmus považuje hydrofóbne častice za cudzie, a preto sú poľahky vychytávané MFS. (2) Tento problém sa dá vyriešiť povrchovou úpravou nanočastíc, kedy MFS nebude schopný takto upravenú časticu odhaliť. (9)

Najčastejšie sa častice upravujú pomocou polyetylénglykolu (PEG). Výhodou PEG je vysoká biokompatibilita a neiónickosť. Vďaka jeho hydrofilite sú častice s PEG viac rozpustné ako častice bez úpravy. Ďalším benefitom PEG je predĺženie biologického

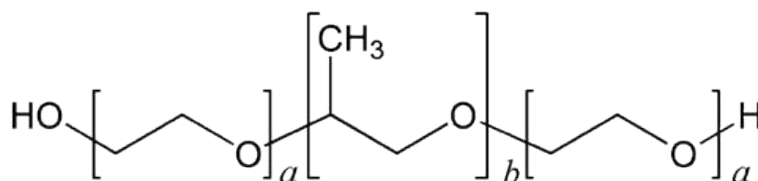
polčasu v krvnom riečisku a tiež fakt, že nie je toxický. Na zvýšenie bunkovej selektivity a internalizácie je možné na povrch nanočastíc naviazať špecifické ligandy cez pripojenie na PEG reťazce. (9; 23)



Obrázok č. 10 Štruktúra PEG (28)

Namiesto PEGu, je možné na povrch nanočastíc naviazať aj iné hydrofilné polyméry ako napr. poloxaméry, polysorbát 80, dextran a rôzne kopolyméry, čím dôjde k zmene ich povrchových vlastností.

Poloxaméry, medzi ktoré patrí aj Pluronic F-127 (poloxamer 407), sú neiónové triblokovo orientované látky (ABA), ktoré sa skladajú z hydrofilného polyetylénoxidu (PEO) a hydrofóbného polypropylénoxidu (PPO). (29; 30) V práci boli použité ako stabilizátory v rôznych koncentráciách.



Obrázok č. 11 Všeobecná štruktúra poloxaméru

Okrem cirkulácie a retencie, liečivo v organizme zohráva podstatnú rolu aj v hromadení sa v špecifickom mieste. Ide o pasívny a aktívny targeting, ktorý bol bližšie popísaný v predchádzajúcej kapitole. (2)

Dôležitú úlohu pri internalizácii nanočastíc vykazuje aj ich povrchový náboj. Bunkové membrány sú prirodzene nabité záporne, čo je dôvodom ľahšieho úniku kationických častíc z lyzozómu a umiestnenia okolo jadra bunky. Negatívne a neutrálne nabité častice preferujú umiestnenie v lyzozómoch. PLGA nanočastice sú nabité negatívne, a preto je vhodné ich povrch upraviť napríklad PEGyláciou alebo naviazaním chitosanu. (9)

4.6 Inkorporácia liečiv

Existujú dva rôzne spôsoby, ktorými môžeme zaviesť liečivo do nanočastice:

1. umiestnením liečiva do nanočastice počas procesu prípravy
2. adsorbciou liečiva na už pripravené nanočastice (2)

Ide o vloženie liečiva do reakčnej zmesi počas ich prípravy rôznymi vyššie spomenutými metódami alebo sa liečivo môže adsorbovať na nanočastice, ktoré už sú pripravené, na základe vloženia liečiva do roztoku s danými nanočasticami. (2) Prvý spôsob inkorporácie liečiva je výhodnejší, pretože je schopný zachytiť väčšie množstvo liečiva. (31)

Množstvo liečiva zabudovaného v nanočastici je ovplyvnené chemickou štruktúrou liečiva, typom polyméru, ale aj spôsobom inkorporácie účinnej látky. Ide o mechanizmus disperzie liečiva v polyméri, adsorpcie na povrch nanočastice a tvorby chemickej väzby medzi liečivou látkou a polymérom. U nanočastíc, ako látok koloidného charakteru, je stanovenie presného obsahu účinnej látky celkom problematické. Nepochybne úspešným spôsobom na separáciu enkapsulovaných nanočastíc od zmesi, ktorá obsahuje aj voľné liečivo je ultracentrifugácia alebo gélová filtrácia. (2)

Enkapsulačnú efektivitu liečiva je možné vypočítať z množstva enkapsulovaného liečiva pomocou nasledovného vzorca (2; 32):

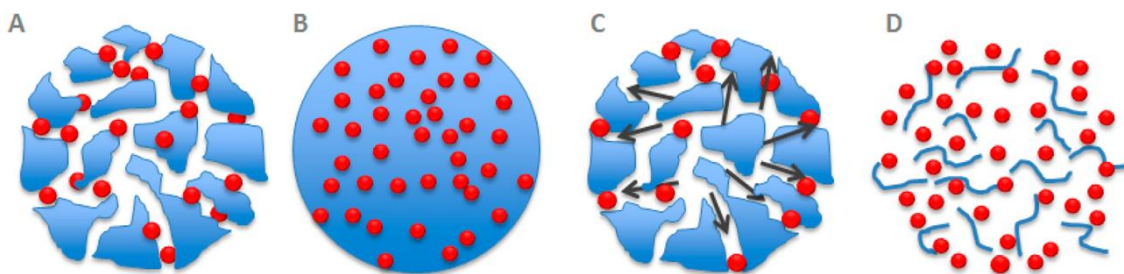
$$EE = \frac{\text{skutočné množstvo enkapsulovaného liečiva}}{\text{teoretické množstvo liečiva}} \times 100\%$$

4.7 Uvoľňovanie liečiva

Uvoľňovanie liečiva je dôležitý proces, keď sa liečivo, nachádzajúce sa v jadre nanočastice, dostáva na jej povrch, odkiaľ sa ďalej transportuje do vonkajšieho prostredia. (19)

Základné mechanizmy uvoľňovania liečiva (19):

- A difúzia liečiva cez vodné póry
- B difúzia z polymérnej matrice
- C hromadná erózia
- D povrchová erózia



Obrázok č. 12 Mechanizmy uvoľňovania liečiva (19)

A) Difúzia liečiva cez vodné póry

Dochádza k transportu liečiva, ktorého pohyb je náhodný a riadený koncentračným spádom. V štruktúre odbúrateľného polyméru vzniká pórovitá sieť, ktorej rýchlosť ovplyvňuje difúzia. Potom sa nanočastica začne plniť vodou, kedy sa s pribúdajúcim množstvom vody zväčšujú a násobia póry. V tejto fáze je liečivo transportované von z matrice.

B) Difúzia z polymérnej matrice

Tento proces prebieha difúzne, keď sa liečivo transportuje von z neodbúrateľnej častice alebo depotnej formy bez tvorby pórov. Rýchlosť nie je riadená koncentračným spádom, ale je konštantná a závislá len na permeabilite polyméru.

C) Hromadná a D) Povrchová erózia

Povrchová erózia je vhodnejšia pre liečivá citlivé na vodu, pretože ich chráni pomalý prílev vody do matrice. Ide o degradáciu matrice na jej povrchu, ktorá ďalej smeruje do vnútra a jej rýchlosť je závislá na rýchlosti prenikania vody. Hromadná erózia nastáva ak do matrice prenikne naraz veľké množstvo vody a dôjde k jej rovnomernej degradácii. Na rozdiel od hromadnej erózie je možné povrchovú eróziu kontrolovať a predikovať. (19)

4.8 Charakterizácia nanočastíc

Medzi základné vlastnosti nanočastíc, ktoré súvisia s ich pôsobením v živom organizme patrí veľkosť a tvar, polydisperzita a povrchový náboj. (33) Tieto parametre je potrebné zistiť a sú vyžadované v oblasti podávania liečiv v biomedicíne. (34) Celkový výsledný efekt nanočastíc in vivo môžu ovplyvniť aj malé odchýlky v jednej z týchto vlastností. (33)

4.8.1 Veľkosť a tvar nanočastíc

Zistenie veľkosti a tvaru definuje fyzikálne a fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré určujú ako sa budú nanočastice distribuovať v organizme, ako budú prenikať cez biologické membrány, kde sa budú hromadiť a ponúkajú aj informácie o ich bezpečnosti. (34) Častice s veľkosťou $<7\mu\text{m}$ sa nachádzajú v pľúcnych kapilárach, častice $0,1-7\mu\text{m}$ sú fagocytované MFS v pečeni alebo slezine. Veľkosť je zásadná mimo spomenutých

vlastností aj v eliminácii nanočastíc z organizmu. Pokiaľ ide o tvar nanočastíc, voľný pohyb vykazujú sférické nanočastice a tvarovo nepravidelné majú tendenciu sa zhlukovať v mieste rozdvojenia ciev. (33) Existujú rôzne spôsoby určovania veľkostí častíc. Medzi najpoužívanejšie metódy patria tie, ktoré súvisia s rozptylom svetla a mikroskopiou. (34)

4.8.1.1 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (DLS) inak zvaný tiež fotónová korelačná spektroskopia sa stáva čoraz viac využívanou metódou na charakterizáciu veľkosti nanočastíc. Je to dej, keď sú v rozpúšťadle suspendované nanočastice, ktorých sústavný pohyb je vyvolaný Brownovým pohybom. Ten podnietujú častice svojím vzájomným pôsobením sprevádzaným vznikom tepla. Monochromatický bodový laser zachytáva kolísajúcu intenzitu svetla spôsobenú práve spomínanými časticami. (34)

Záznam kolísania intenzity zahŕňa konštruktívne a deštruktívne interferencie rozptýleného svetla. Pomocou nich je možné odvodiť veľkosť častíc Stokes-Einstenovou rovnicou:

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

kde K_B je Boltzmannova konštanta, T - teplota, η – viskozita a r_h je hydrodynamický rádius. (35)

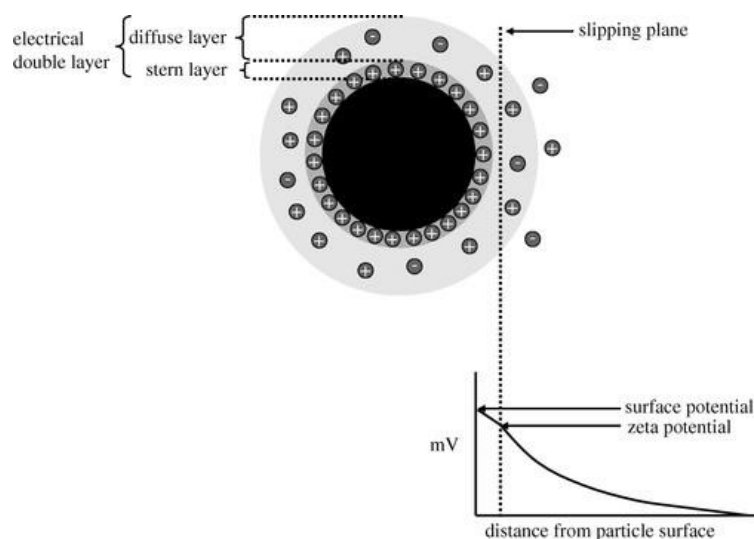
Táto metóda má veľa výhod. Jednou z nich je veľmi jednoduché a rýchle meranie, pri ktorom sa využíva minimálne množstvo vzorky, ktorá môže byť dispergovaná v ľubovoľnom čírom rozpúšťadle. (36) Výhodou je aj presnosť tohto merania pri určovaní veľkosti monodisperzných vzoriek a rozbor vzoriek v širokej škále koncentrácií. Nevýhodou bývajú prachové častice, ktoré ovplyvňujú intenzitu rozptylu a korelovanie veľkosti frakcií s určitým zložením v prítomnosti agregátov. Nepriaznivým aspektom DLS je aj limitovaná analýza vzoriek s rôzne veľkým rozdelením veľkosti a nesférický tvar nanočastíc. (35)

4.8.1.2 TEM a SEM

Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) je z oblasti mikroskopie najpreferovanejšou voľbou na zistenie veľkosti a distribúcie nanomateriálov s vyšším priestorovým rozlíšením než SEM (skenovacia elektrónová mikroskopia). Princíp tohto merania spočíva v prechode vákuovo chráneného elektrónového lúča cez rad šošoviek, ktorý dopadá na vodivú vzorku s husto osídlenými elektrónmi. (34)

4.8.2 Zeta potenciál

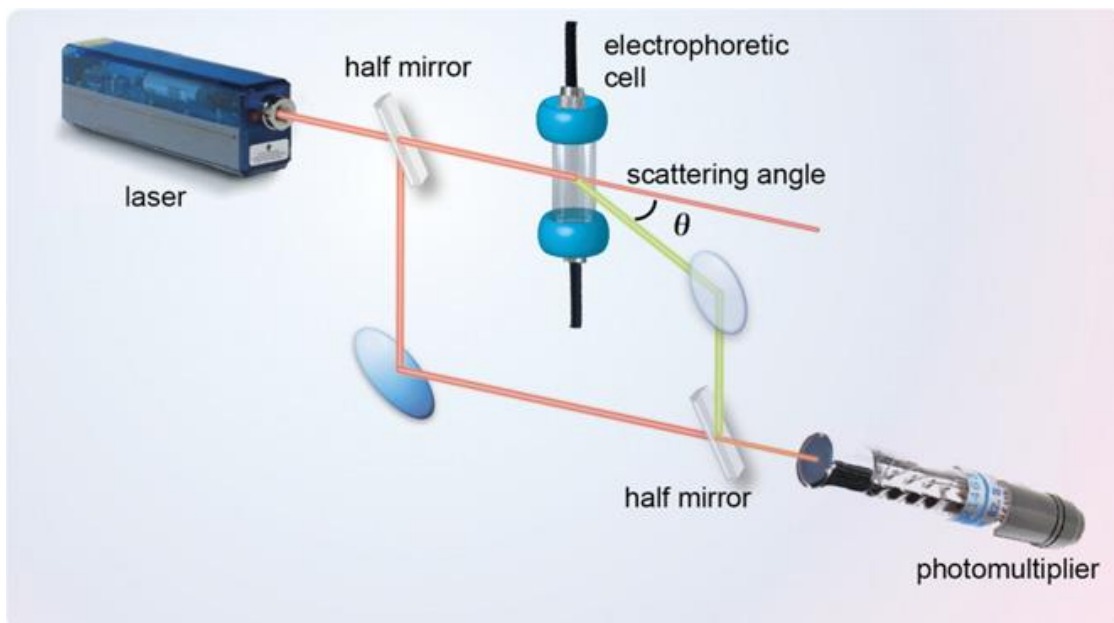
Povrchový náboj nanočastíc patrí medzi dôležité parametre, ktoré poskytujú informáciu, na koľko je daný disperzný systém stabilný. Ak v okolí častice stúpne počet protichodne nabitých iónov vytvorí sa okolo nej elektrická dvojvrstva tvorená z vonkajšej difúznej časti s menej pevne spútanými iónmi a z vnútornej (Sternovej) časti, kde sú naopak ióny pevne spútané. Ak sa pohybuje častica, pohybujú sa aj ióny v jej okolí. Difúzna časť obsahuje pomyselnú hranicu, kde častica a ióny tvoria stabilný celok. Veličina meraná na tejto hranici sa označuje ako zeta potenciál. (34; 37)



Obrázok č. 13 Znáznornenie elektrickej dvojvrstvy (37)

Nanočasticová disperzia v sebe musí zahŕňať nízku koncentráciu elektrolytov, ktoré sa budú pohybovať určitou rýchlosťou. Táto podmienka je dôležitá na meranie elektroforetickej mobility, na základe ktorej sa určuje zeta potenciál. (34) Hodnota zeta potenciálu by sa zvyčajne mala pohybovať okolo 30mV, pričom hodnoty vyššie signalizujú väčšiu stabilitu a hodnoty nižšie ukazujú na nestabilný, agregovaný, systém či flokuláciu a koaguláciu. (35)

Najbežnejšie používanou metódou na meranie povrchového náboja je technika elektroforetického rozptylu svetla. (35) Ide o metódu, v ktorej je pohyb nanočastíc v roztoku meraný aplikovaným oscilačným elektrickým poľom. Týmto sa líši od DLS, kde je základom Brownov pohyb častíc. (38) Princípom tohto merania je rozdelenie laserového lúča na dva, pričom jeden smeruje k vzorke a druhý je referenčný. Na stanovenie Dopplerovho posunu sa rozptýlené svetlo zo vzorky zlúči alebo opticky zmieša s referenčným lúčom. Rýchlosť nanočastíc je odvodená od Dopplerovho posunu a povrchový náboj sa ďalej meria pomocou rôznych matematických rovníc. (39)



Obrázok č. 14 Technika elektroforetického rozptylu svetla (38)

4.8.3 Polydisperzita

Polydisperzita charakterizuje stupeň odlišnosti distribúcie veľkosti častíc. Určuje sa pomocou polydisperzného indexu (PDI), tiež zvaného ako index heterogenity. Tento index sa vypočíta z dvoch údajov, a to M_w (hmotnostný priemer) / M_n (číselný priemer molekulevej hmotnosti). Výsledkom je bezrozmerné číslo, ktoré sa pohybuje od 0,0 až 1,0, pričom v praxi ide o hodnoty do 0,05, ktoré poukazujú na vysoko monodisperznú sústavu a hodnoty nad 0,7 napovedajú, že daný systém je polydisperzný a nie je vhodné ho merať pomocou DLS. (40)

5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Použité suroviny

Purasorb PDLG 5002A, Corbion, Holandsko

Purasorb PDLG 5002, Corbion, Holandsko

Fluoresceín, Merck, Praha, Česká republika

Cholát sodný, Merck, Praha, Česká republika

Poloxamér 407, Pluronic® F-127, Merck, Praha, Česká republika

Acetón, PENTA s.r.o., Chrudim, Česká republika

Čistená voda, Katedra farmaceutickej technológie FaF UK

Fyziologický roztok pufovaný fosfátom (PBS), tablety, Merck, Praha, Česká republika

5.1.1 PLGA polyméry

V tejto diplomovej práci boli použité 2 typy biodegradovateľných polymérov, a to Purasorb PDLG 5002A (PLGAA) a Purasorb PDLG 5002 (PLGAE), ktoré sú komerčne dostupné.

Purasorb 5002A

lineárny polymér PLGA, 50:50 (LA/GA), acid terminated

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

Purasorb 5002

lineárny polymér PLGA, 50:50 (LA/GA), ester terminated

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

5.1.2 Fluoresceín

Fluoresceín bol použitý k enkapsulácii ako modelové liečivo. Charakteristická je preň oranžovo-červená farba. Vyskytuje sa vo forme prášku a je nerozpustný vo vode. Rozpúšťa sa v etanole, metanole, acetóne či v zriedených zásadách, keď vykazuje zeleno-žltú fluorescenciu. Je citlivý na pH. Výhodou je jeho jednoduchá merateľnosť pomocou spektrofotometrie. (41)

$M_r = 332,31\text{ g/mol}$

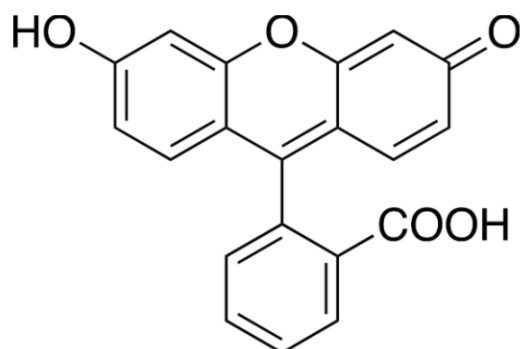
Rozpustnosť vo vode = 0,005 g/100 ml (20 °C)

$\log P = 3,4$

$pK_a = 6,4$

excitačné spektrum = 494nm

emisné spektrum = 521nm



Obrázok č. 15 Chemická štruktúra fluoresceínu

5.1.3 Stabilizátor (poloxamér 407)

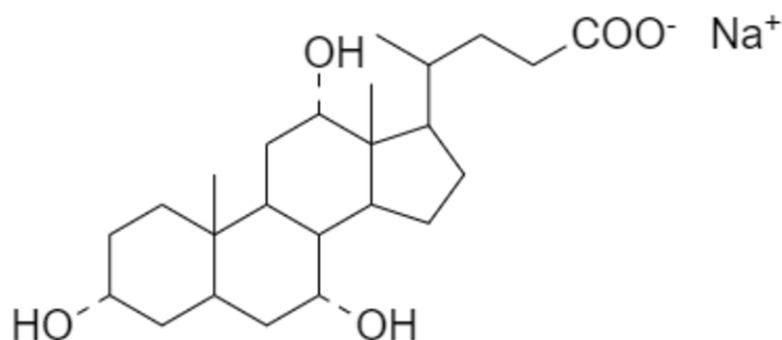
Poloxamér 407 (Pluronic[®] F-127) bol použitý ako stabilizátor v príprave nanočastíc metódou nanoprecipitácie vo forme vodného roztoku v koncentráciách 0,1 %, 0,5 % a 1 %. Ide o triblokový neiónový kopolymér tvorený z dvoch monomérnych jednotiek – etylénoxidu a propylénoxidu, vo formulácii PEO-PPO-PEO. (42)

Mn = 12 600 g/mol, HLB (hydrofilne-lipofilná rovnováha) = 18-23

5.1.4 Povrchovo aktívna látka

Cholát sodný bol použitý ako povrchovo aktívna látka vo forme vodného roztoku v koncentráciách 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % a 5 %. Patrí medzi soli žlčových kyselín s amfifilnými vlastnosťami. Základný skelet tvorí hydrofóbne steroidné jadro, na ktorom sú naviazané 3 hydroxylové skupiny a 1 karboxylový zvyšok. Ide o látku, ktorá má schopnosť zvýšiť absorpciu liečiva a uľahčiť tak jeho prechod cez biologické membrány. (43)

Mr = 430,6 g/mol



Obrázok č. 16 Chemická štruktúra cholátu sodného

5.1.5 Rozpúšťadlá

Acetón bol použitý v procese prípravy organickej fázy ako rozpúšťadlo fluoresceínu, a tiež aj pri rozpúšťaní polymérov PLGAA a PLGAE.

Čistená voda bola použitá ako rozpúšťadlo v príprave vodnej fázy nanoprecipitácie – vznik vodného roztoku povrchovo aktívnej látky a stabilizátora. Tiež bola použitá pre doplnenie objemu nanosuspenzie po odparení acetónu a v hodnotení nanočastíc pomocou Zetasizeru – odobratie časti nanosuspenzie, zriedenie vodou a meranie.

0,01M PBS bol použitý ako rozpúšťadlo nanočastíc pre kvantifikáciu pomocou Plate readera a zároveň ako pufrovacie činidlo, keďže je fluoresceín citlivý na pH a svetlo. Taktiež bol použitý aj ako redispergačné a disolučné médium v disolučnom experimente. (pH = 7,4 pri 25°C)

5.2 Použité prístroje

Analytické váhy Ohaus Discovery (Ohaus, Greifensee, Švajčiarsko)

Váhy Kern 440-53N (Kern, Balingen, Nemecko)

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

Centrifúga Micro 7 (Fischer Scientific, Hampton, USA)

Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK)

Plate reader Synergy 2 (BioTek Instruments, USA)

Vodná lázeň GFL 1083, GFL (Burgwedel, Nemecko)

5.3 Použité metódy

5.3.1 Príprava nanočastíc

V experimente bola pre prípravu nanočastíc využitá metóda nanoprecipitácie, ktorá je popísaná v kapitole 4.3.1.

Postup:

1. Príprava vodnej fázy

Vodnú fázu tvorilo 10 ml vodného roztoku buď samostatne povrchovo aktívnej látky, alebo povrchovo aktívnej látky so stabilizátorom v rôznych koncentračných pomeroch. Povrchovo aktívna látka bola cholát sodný v koncentráciách 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % a 5 % (m/V). Pluronic F-127 ako stabilizátor bol použitý v koncentráciách 0,1 %, 0,5 % a 1 %

(m/V). Vodná fáza teda vznikla rozpustením cholátu sodného v čistenej vode za stáleho miešania na magnetickej miešačke.

2. Príprava organickej fázy

Organická fáza pozostávala z polyméru PLGAA alebo PLGAE, fluoresceínu a acetónu. Na analytických váhach bol do vialky vždy navážený jeden z polymérov (PLGAA alebo PLGAE) $30 \pm 0,05$ mg a fluoresceín 20 μ g. Potom došlo k rozpusteniu obsahu vialky v 1 ml acetónu.

3. Príprava nanosuspenzie

Pripravená organická fáza sa pomocou mikropipety kontinuálne pridala do vodnej fázy za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Postupne došlo k vytvoreniu nanosuspenzie a odpareniu acetónu, ktorý sa odparil približne za 90 minút. V pripravenej nanosuspenzii bolo množstvo odparené behom prípravy nahradené čistenou vodou a potom bola nanosuspenzia centrifugovaná.

5.3.2 Centrifugácia

Z každej pripravenej nanosuspenzie boli odobrané 2 ml, ktoré boli prenesené do mikroskúmavky (typ eppendorf) a následne centrifugované. Centrifugácia prebiehala pri podmienkach: 15090 RPM (otáčky za minútu), preťaženie 21130 G, teplota 4 °C, čas 20 minút. Po zakoncentrovaní vzoriek bol odobratý supernatant v množstve 100 μ l, ktorý sa ďalej upravil a hodnotil v Plate readeri.

5.3.3 Meranie enkapsulácie fluoresceínu

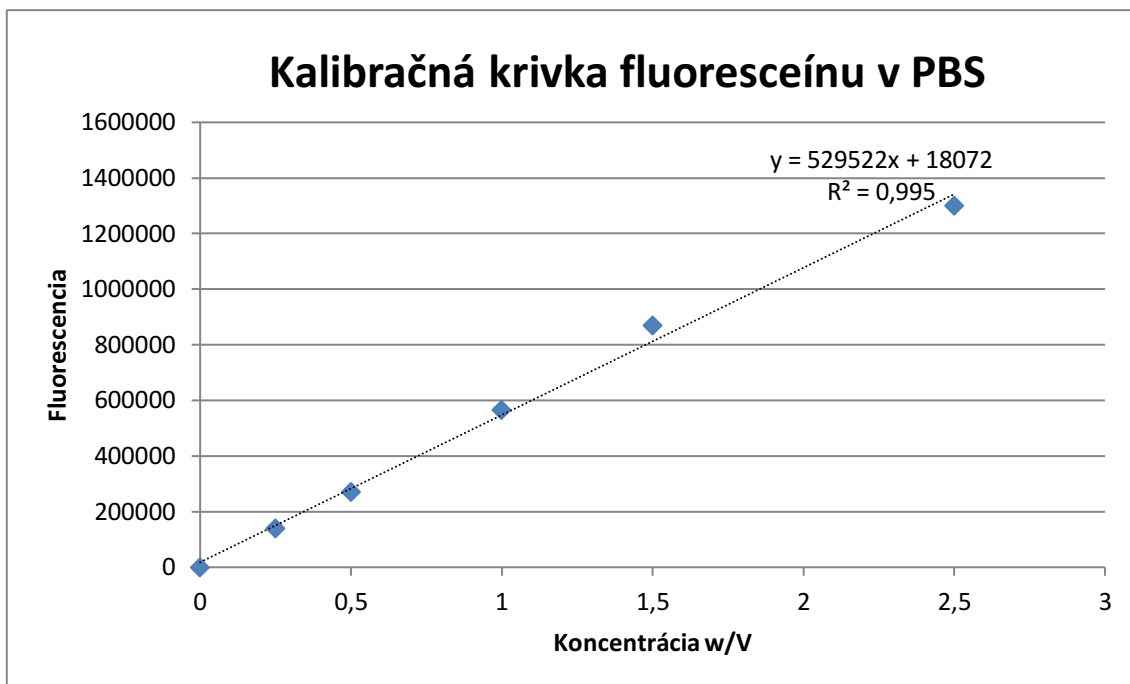
Odobraný supernatant (100 μ l) bol rozpustený v 1900 μ l 0,01M roztoku PBS. Z danej vzorky bolo odobraných 150 μ l, ktoré sa v triplicate preniesli na viacjamkovú doštičku. Tá sa vložila do Plate readera, v ktorom prebehlo meranie fluorescencie. Podmienky merania: excitácia 459/10, emisia 590/35, Top 510, GAIN 80.

Pred meraním enkapsulovaného liečiva (fluoresceínu) v supernatante bola najprv zmeraná a zostavená kalibračná krivka pre rôzne koncentrácie fluoresceínu v PBS. Týmto spôsobom bola získaná hodnota fluorescencie vzorky, z ktorej bola pomocou rovnice kalibračnej krivky vypočítaná koncentrácia fluoresceínu.

Rovnica kalibračnej krivky:

$$y = 529522x + 18072$$

(y – nameraná hodnota fluorescencie, x – koncentrácia enkapsulovaného fluoresceínu)



Obrázok č. 17 Kalibračná priamka fluoresceínu v PBS

5.3.4 Enkapsulačná efektivita

Hodnota EE udáva, koľko percent z celkovej navážky liečiva (fluoresceínu) bolo aj reálne enkapsulovaných v polymérnych nanočasticiach. EE sa zisťovala zo supernatantu.

Vzorec pre výpočet EE:

$$EE = \frac{\text{navážka fluoresceínu} - \text{voľný fluoresceín}}{\text{teoretické množstvo liečiva}} \times 100\%$$

5.3.5 Analýza nanočastíc na Zetasizeri

Z každého vzorku bola odobraná časť nanosuspenzie, ktorá bola zriedená čistenou vodou v pomere 1:10 a potom analyzovaná v Zetasizeri. Pomocou tohto prístroja bola meraná veľkosť častíc, index polydisperzity a zeta potenciál. Na hodnotenie veľkosti častíc a indexu polydisperzity boli použité plastové kyvety bez elektród metódou dynamického rozptylu svetla (popísaná v kapitole 4.8.1.1) a meranie zeta potenciálu prebiehalo v kyvetách s kapilárou (typ DTS1060) metódou elektroforetického rozptylu svetla (popísaná v kapitole 4.8.2).

5.3.6 Disolúcia

1. Podľa vyššie spomenutého postupu prípravy (kapitola 5.3.1) bola vytvorená nanosuspénzia, pričom koncentrácia vodného roztoku cholátu bola 0,1 % a 2 % a na prípravu organickej fázy bol použitý polymér PLGAA.

2. Pripravená nanosuspénzia bola prenesená do štyroch 2 ml mikroskúmaviek (typu eppendorf) a centrifugovaná za podmienok: 9285 RPM (otáčky za minútu), preťaženie 9000 G, teplota 4 °C, čas 15 minút. Po prvom cykle bol odobraný supernatant a nanočastice v sedimente boli redispergované v čistenej vode. Po druhom cykle bol znova odobraný supernatant a nanočastice v sedimente boli redispergované v roztoku PBS. Potom bol obsah z dvoch mikroskúmaviek zmiešaný a prenesený do celulózovej membrány (MWCO 6000-8000 g/mol), ktorej oba konce sa navzájom zlepili lepidlom.

3. Membrána s roztokom nanočastíc bola vložená do vialky, do ktorej bolo napipetovaných 10 ml disolučného média – roztok PBS. Vialka bola vložená do trepacej vodnej lázne. Teplota bola nastavená na 37 °C. V daný časový bod sa 10 ml disolučného média odpipetovalo a prenieslo do dvoch 2 ml mikroskúmaviek, ktoré sa obalili alobalom, aby nedošlo k ovplyvneniu stability fluoresceínu, keďže je citlivý na svetlo, a odložili sa do chladničky. Tento postup sa opakoval po 0,5, 1, 2, 6, 10, 18, 24, 30, 42, 48 hodinách.

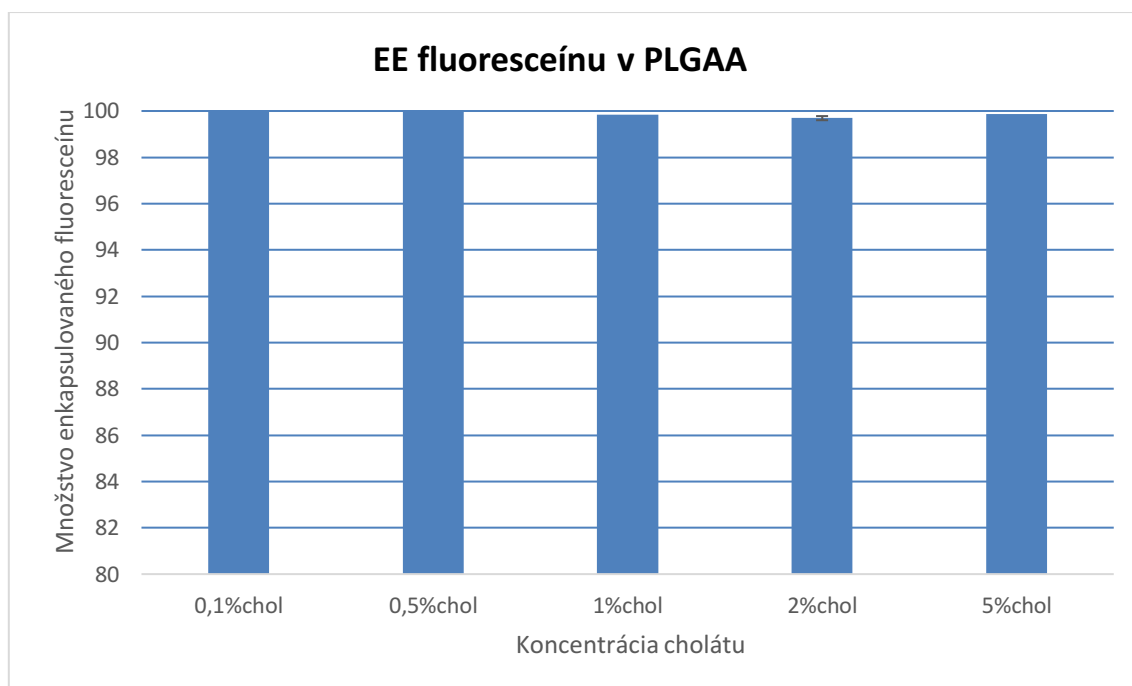
4. Vzorky boli merané na Plate readeri rovnakým spôsobom uvedeným v kapitole 5.3.3.

6. VÝSLEDKY A DISKUSIA

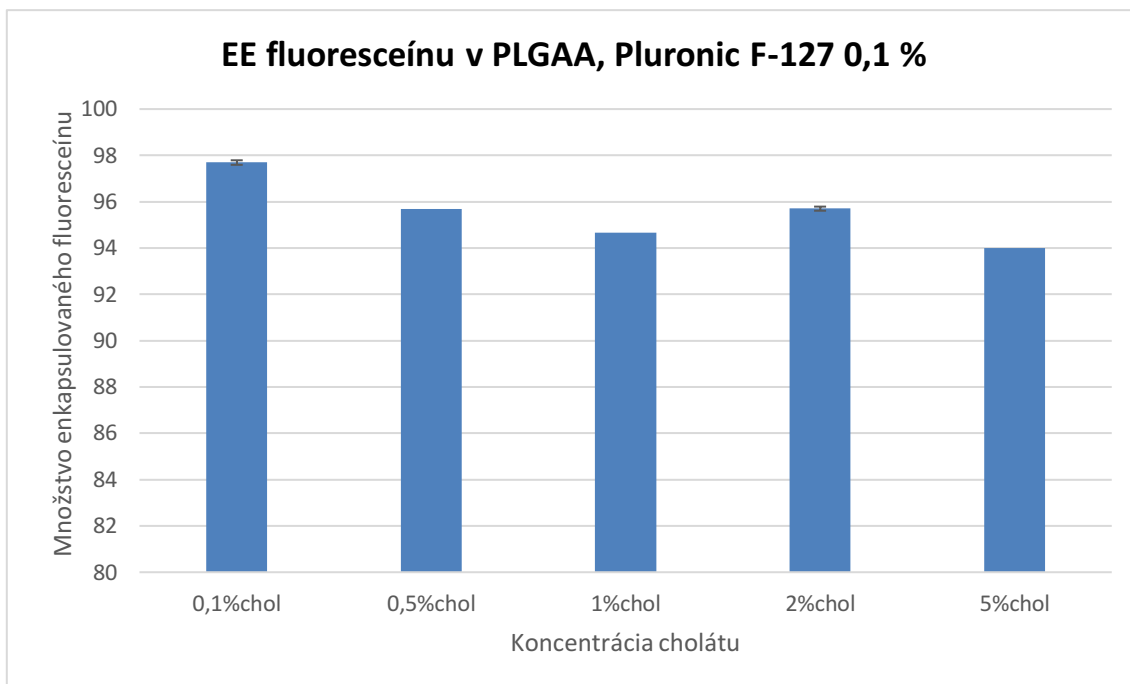
Kapitola prezentuje výsledky, ktoré boli získané prípravou nanočastíc s fluoresceínom. Cieľom bolo zistiť ako ovplyvňujú rôzne koncentračné pomery povrchovo aktívnej látky a stabilizátora enkapsulačnú efektivitu liečiva (fluoresceínu).

Skúmalo sa aj uvoľňovanie fluoresceínu in vitro, kedy sa stanovil disolučný profil. Ďalšími zisťovanými parametrami boli veľkosť častíc, zeta potenciál a PDI.

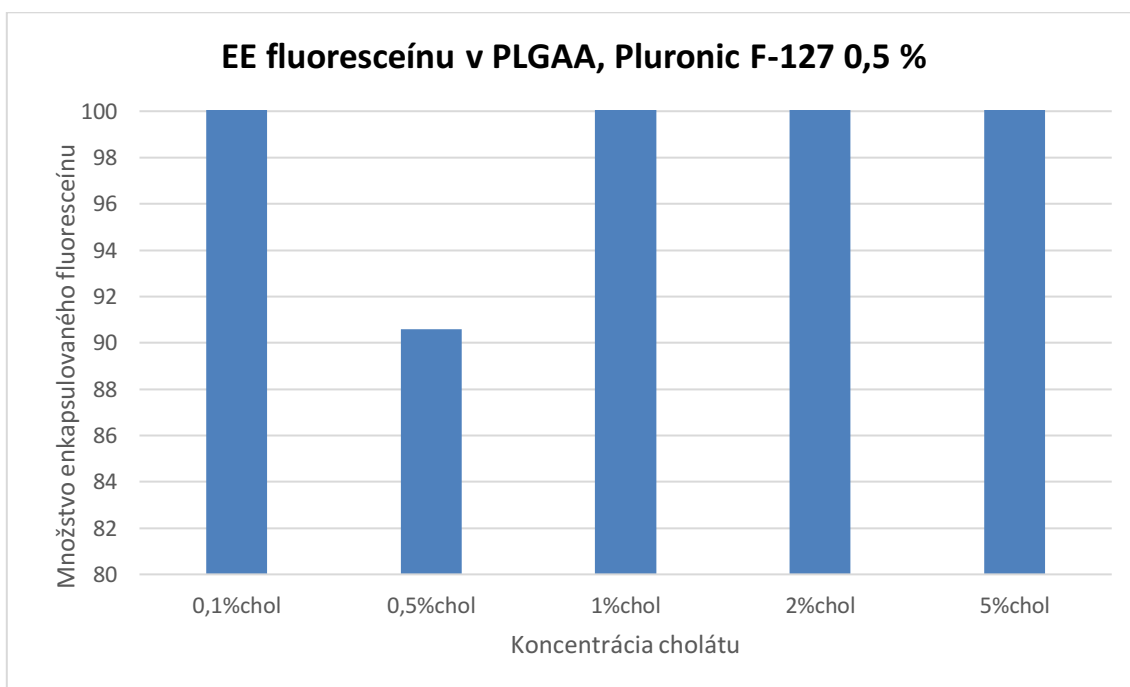
6.1 Enkapsulačná efektivita



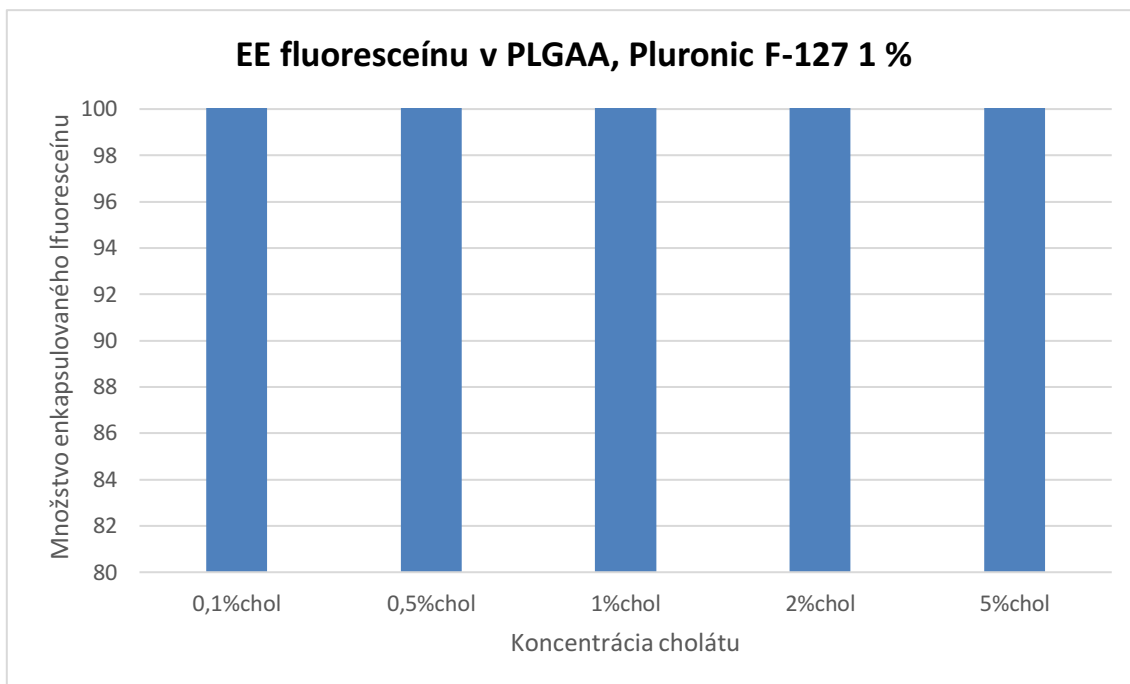
Obrázok č. 18 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky



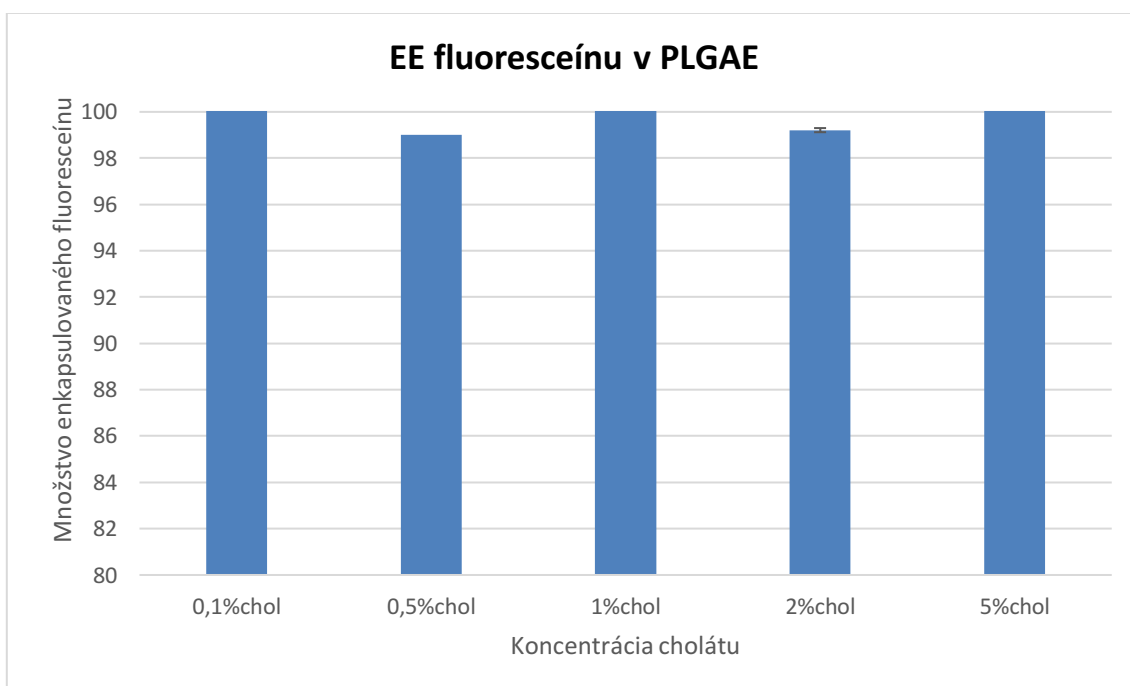
Obrázok č. 19 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 %



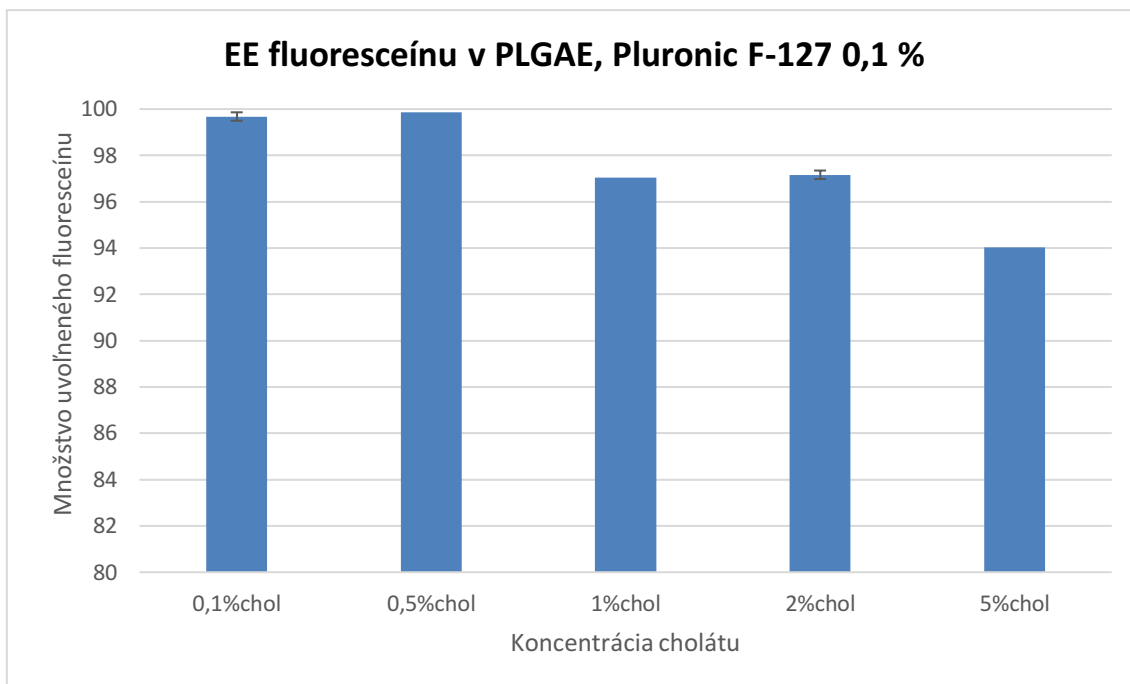
Obrázok č. 20 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 %



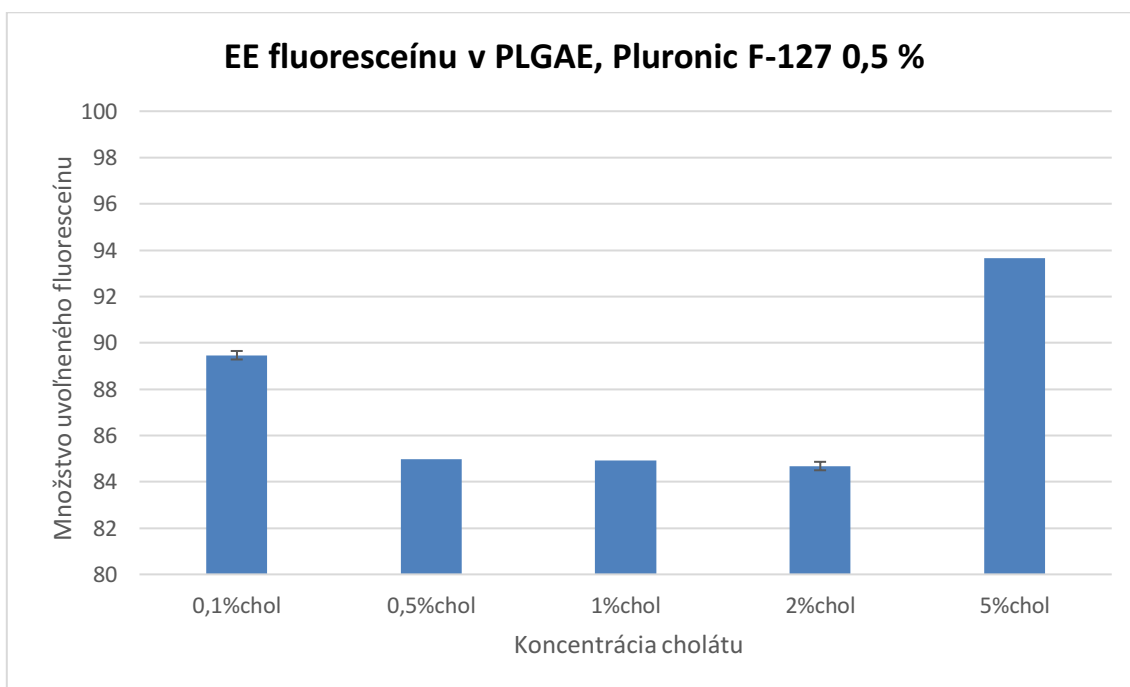
Obrázok č. 21 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 %



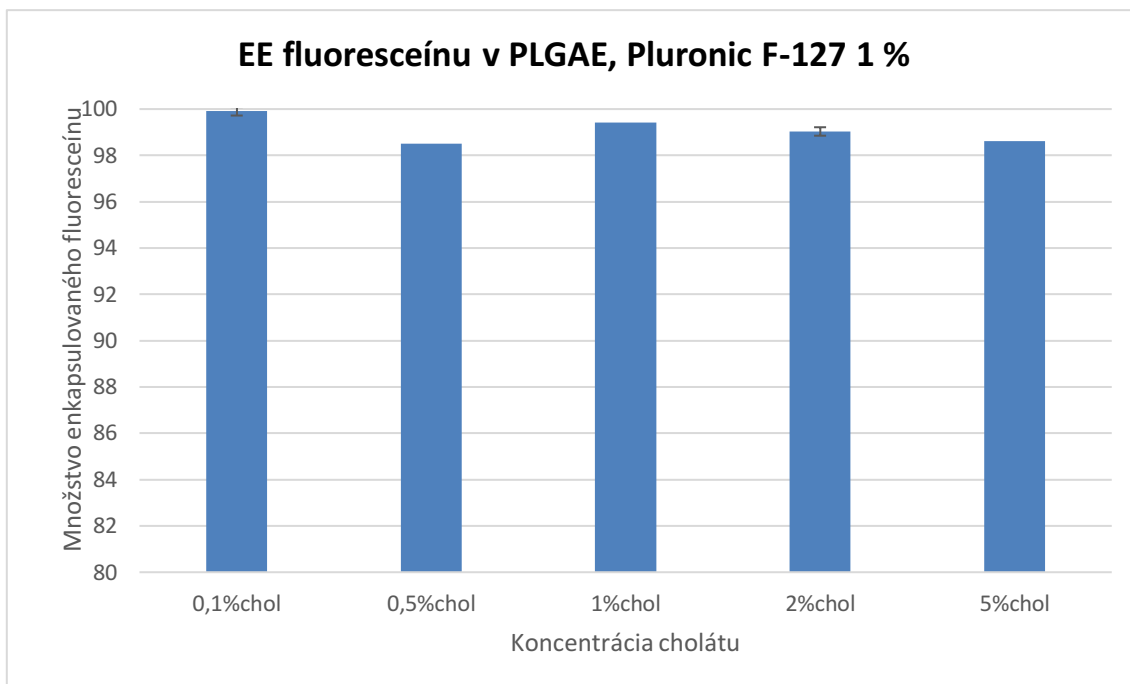
Obrázok č. 22 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky



Obrázok č. 23 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 %



Obrázok č. 24 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 %



Obrázok č. 25 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 %

Obrázok č. 18 ukazuje, že v prípade nanočastíc s polymérom PLGAA a samotným cholátom v koncentráciách 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % a 5 % došlo ku kompletnej inkorporácii fluoresceínu do nanočastíc. Z obrázkov č. 19, 20 a 21 je vidieť, že častice pripravené so zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu a Pluronicom F-127 v koncentráciách 0,1 %, 0,5 % a 1 % nevykazujú významné rozdiely v hodnote EE a došlo k takmer kompletnej enkapsulácii.

Obrázok č. 22 znázorňuje, že nanočastice tvorené polymérom PLGAE a samotným cholátom v koncentráciách 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % a 5 % kompletne enkapsulovali fluoresceín. Pridaním Pluronicu F-127 v koncentráciách 0,1 % a 1 % k roztoku cholátu so zvyšujúcou sa koncentráciou, sa fluoresceín takmer úplne enkapsuloval, čo popisuje obrázok č. 23 a 25. Z obrázku č. 24 je vidieť, že po pridaní Pluronicu F-127 v koncentrácii 0,5 % k roztokom cholátu s koncentraciami 0,1-5 % došlo k miernemu poklesu hodnoty EE, ktorá sa aj napriek tomu stále dá považovať za veľmi vyhovujúcu.

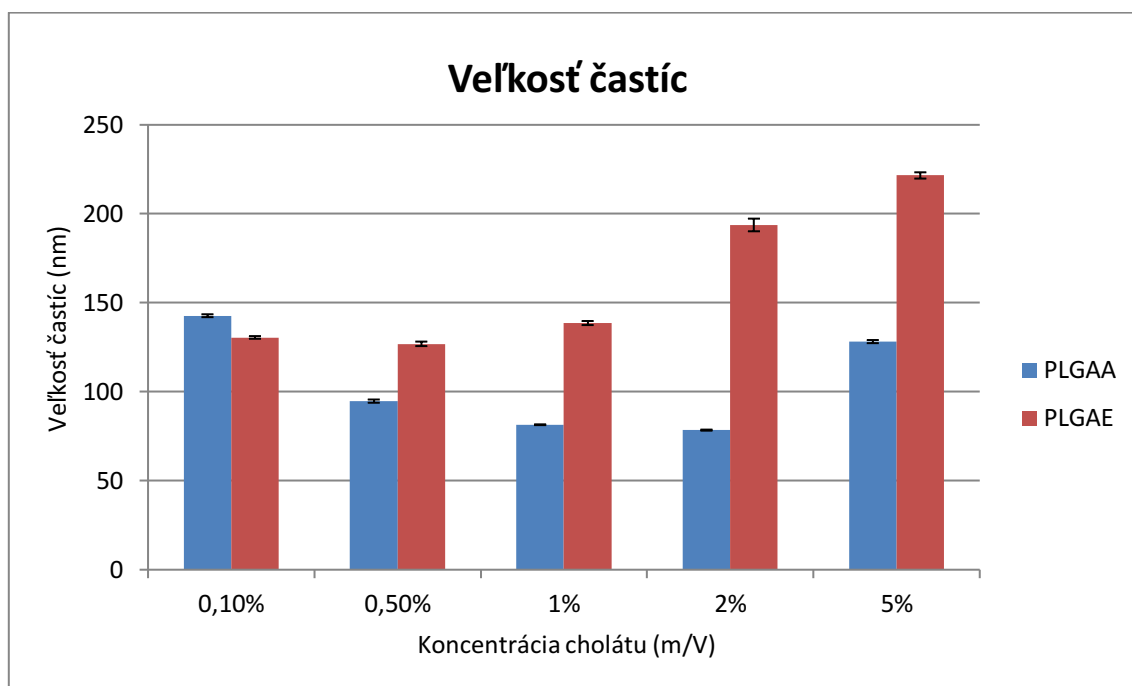
Enkapsulačnú efektivitu môže ovplyvniť koncová skupina polyméru PLGA. Jej charakter môže spôsobiť degradáciu liečiva a ovplyvniť stabilitu. (44)

Fluoresceín je lipofilná látka, ktorá sa vo vodnom prostredí nerozpúšťa, má tendenciu z vodného prostredia rýchlo prenikať do lipofilného prostredia, a preto je potrebné, aby bola inkorporovaná do vhodného nosiča. Vzhľadom na to, že polymér PLGAE je zakončený esterom je hydrofóbny a má vysokú molekulovú schopnosť, vytvára vhodné prostredie pre enkapsuláciu fluoresceínu. Aj napriek tomu, že polymér PLGAA je zakončený kyselinou, ktorá spôsobuje pokles hydrofobicity, je pre fluoresceín stále dostatočne hydrofóbny a schopný takmer kompletnej enkapsulácie. Terminálny

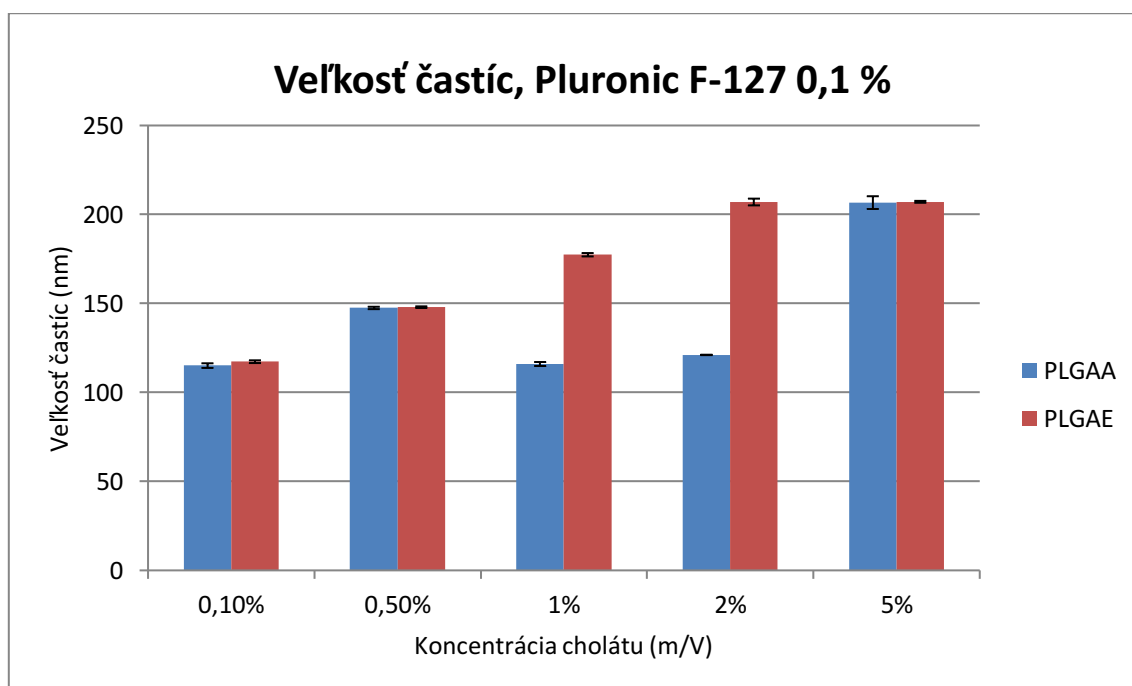
karboxyl môže mať pre inkorporáciu podobných látok benefičný efekt, pretože aj napriek tomu, že je fluoresceín značne lipofilná molekula, je schopný tvoriť vodíkové mostíky pomocou karboxylovej, hydroxylovej a keto skupiny vo svojej štruktúre. Tieto vodíkové väzby s polymérom bude vo väčšej miere vytvárať s terminálnymi karboxylmi PLGAA. Z výsledkov však plynie, že pre enkapsuláciu budú mať dominantnú rolu van der Waalove hydrofóbne interakcie.

U oboch typov polymérov dochádza so zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu k poklesu enkapsulačnej efektivity. Rovnaký trend je zaznamenaný aj v prípade, keď bol ku cholátu pridaný Pluronic F-127 vo zvyšujúcich sa koncentráciách. Dá sa predpokladať, že s pribúdajúcou koncentráciou cholátu dochádza k prekročeniu kritickej micelárnej koncentrácie, agregácii nanočastíc a tvorbe micel, čo spôsobí pokles EE.

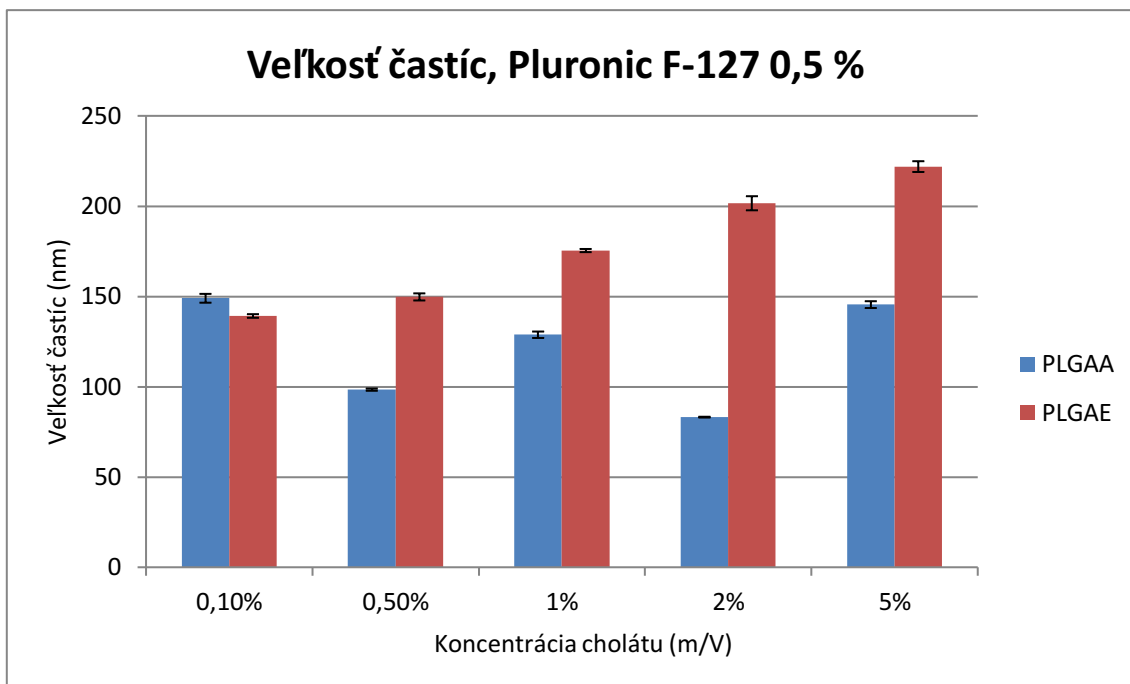
6.2 Veľkosť častíc



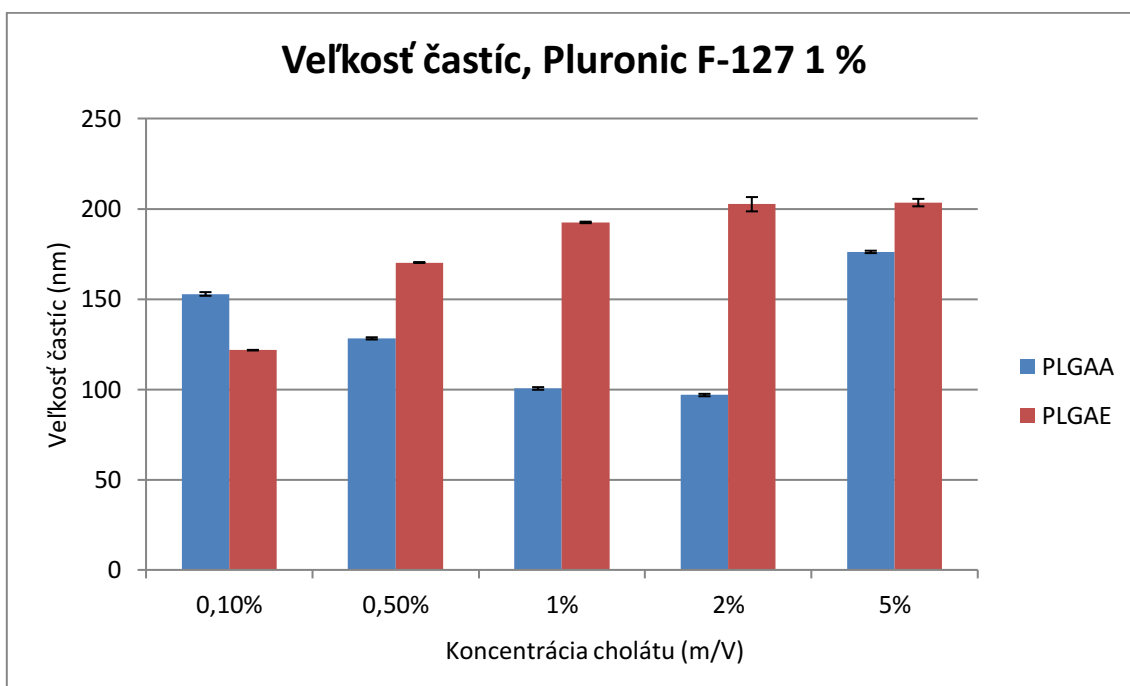
Obrázok č. 26 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky a type polyméru



Obrázok č. 27 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 % a type polyméru



Obrázok č. 28 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 % a type polyméra



Obrázok č. 29 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 % a type polyméra

Nanočastice PLGAA tvorené samotným cholátom mali najvyššiu veľkosť v koncentrácii 0,1 % - 118nm. Častice pripravené v prítomnosti zvyšujúcej sa koncentrácie cholátu vykazovali nižšiu veľkosť až do koncentrácie 5%, kedy vznikli častice s vyššou výslednou veľkosťou, čo bolo pravdepodobne kvôli prekročeniu CMC cholátu sodného.

Po pridaní Pluronic F-127 s koncentráciou 0,1 % bola nameraná veľkosť častíc v prítomnosti cholátu zrovnateľná s koncentráciou samotného cholátu. V skúmanom koncentračnom rozmedzí cholátu nemá Pluronic F-127 s koncentráciou 0,1 % významný vplyv na výslednú veľkosť nanočastíc.

Častice pripravené v prítomnosti Pluronic F-127 v koncentrácii 0,5 % a cholátu s koncentráciou 0,1 % mali výslednú veľkosť 149nm, ktorá bola zároveň aj najvyššia v porovnaní s časticami, na prípravu ktorých bol použitý cholát v koncentráciách 0,5 % – 5 %. Častice pripravené v prítomnosti cholátu s koncentráciou 0,5 % dosiahli veľkosť 98nm, v koncentrácii cholátu 1 % stúpala na 129nm, v koncentrácii 2 % znova klesla a následne sa v prítomnosti cholátu s koncentráciou 5 % prekročila CMC a došlo k vzniku micel.

Pridaním Pluronic F-127 v koncentrácii 1 % ku cholátu s koncentráciou 0,1 % vznikli nanočastice s veľkosťou častíc 153nm. Následne sa veľkosť častíc so zvyšujúcou sa koncentráciou Pluronic F-127 znižovala až do pridaneja cholátu s koncentráciou 5 %, keď sa veľkosť zvýšila na 176nm.

Nanočastice PLGAE dosahovali s koncentráciou cholátu 0,1 % veľkosť 130nm. So zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu (0,5 %, 1 %, 2 %) veľkosť stúpala až v koncentrácii 5 % dosiahla hodnotu 222nm. Častice pripravené s koncentráciou Pluronic F-127 0,1 % vykazovali v prítomnosti cholátu s koncentráciou 0,1 % veľkosť 117nm, ktorá so zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu tiež zvyšovala a v prítomnosti cholátu s koncentráciou 5 % vykazovala veľkosť 207nm. Po pridaní Pluronic F-127 s koncentráciou 0,5 % bola nameraná veľkosť v prítomnosti cholátu v koncentrácii 0,1 % 139nm. Postupným zvyšovaním koncentrácie cholátu do koncentrácie 5 % dosahovala veľkosť častíc výslednú hodnotu 222nm. Pridanie Pluronic F-127 s koncentráciou 1 % k cholátu s koncentráciou 0,1 % spôsobilo vznik častíc s veľkosťou 122nm, ktorá sa so zvyšujúcou koncentráciou cholátu zvýšila na 203nm.

V prípade nanočastíc s polymérom PLGAA vykazujú častice klesajúci trend. Cholát sodný je povrchovo aktívna látka, ktorá má schopnosť znižovať medzypovrchové napätie. K znižovaniu veľkosti častíc došlo kvôli zvyšovaniu koncentrácie cholátu, avšak iba do koncentrácie 5 %, kedy sa prekročila kritická micelárna koncentrácia o niekoľko rádov a došlo k agregácii nanočastíc a micel. S pribúdajúcou koncentráciou Pluronic F-127 veľkosť častíc vykazovala vyššie hodnoty. Veľkosť nanočastíc s polymérom PLGAE sa so zvyšujúcou koncentráciou cholátu sodného a prídavkom rôznych koncentrácií Pluronic F-127, naopak, zväčšovala.

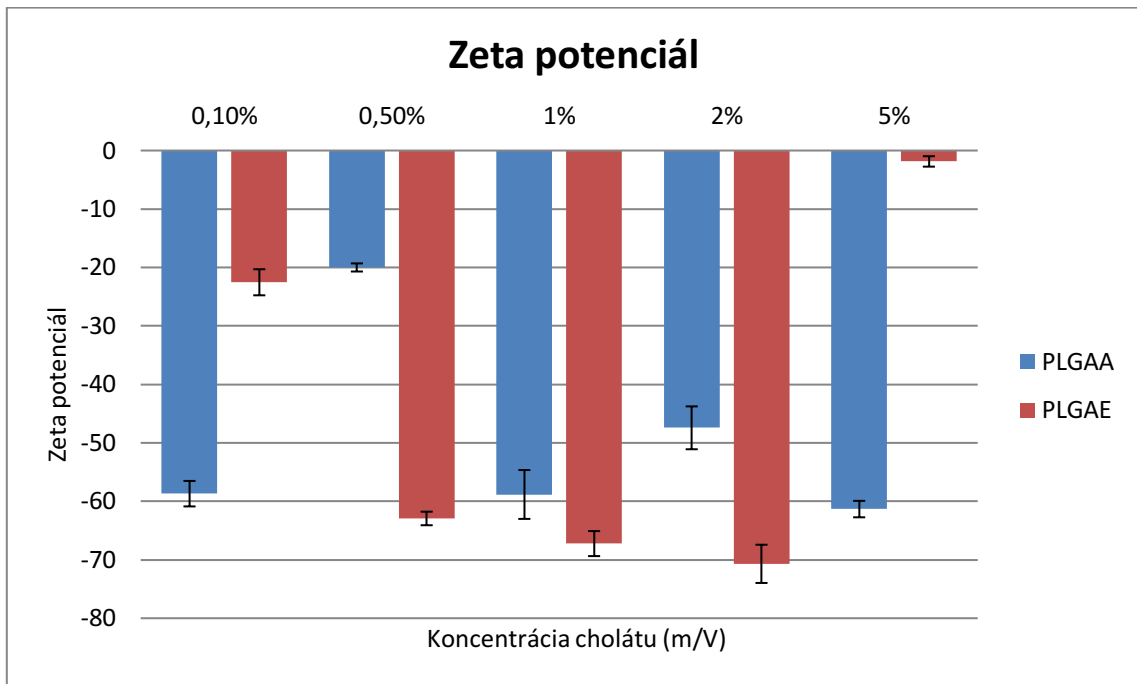
Zmenšovanie častíc tiež môže súvisieť aj s ionizáciou molekuly. Keďže je PLGAA zakončená kyselinou a PLGAE zakončená esterom (v porovnaní s PLGAA je teda hydróbnejšia), môžeme usudzovať, že cholát sodný ako amfifilná anionická zlúčenina interaguje s PLGAA v okamihu vzniku častíc intenzívnejšie a indukuje vznik menších častíc. Svoju rolu pravdepodobne hrajú repulzné interakcie medzi karboxylom PLGAA

a karboxylátom cholátu sodného. Vzhľadom k hydrofilite voľného karboxylu sa dá predpokladať, že molekula PLGAA sa bude v častici spontánne orientovať terminálnymi karboxylmi smerom k povrchu častíc. Fenomén, ktorý sme pozorovali u PLGAE je možné vysvetliť ako zvyšujúcu sa koncentráciu cholátu sodného na povrchu častíc.

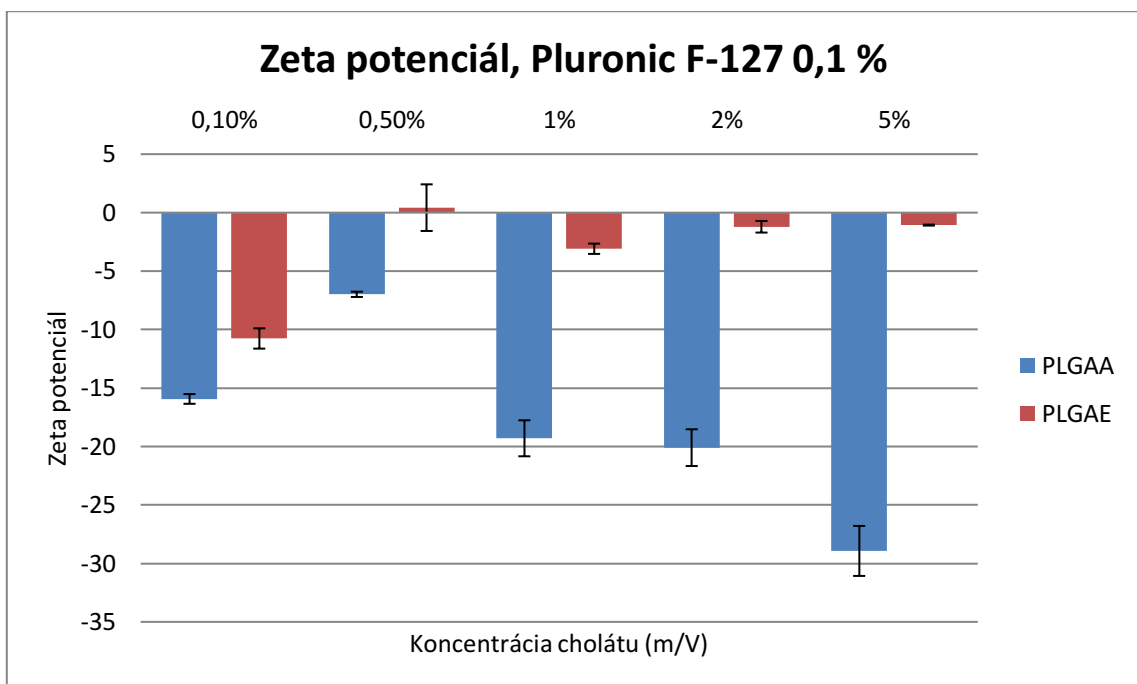
6.2.1 Polydisperzita častíc

Polydisperzita charakterizuje stupeň odlišnosti distribúcie veľkosti častíc. Za monodisperznú sústavu sa považuje sústava vykazujúca hodnotu PDI menšiu než 0,2. (34; 40) Hodnotu PDI do 0,2 mali takmer všetky merané vzorky s polymérom PLGAA a všetky vzorky s esterovo zakončeným PLGA. V prípade nevyhovujúcich vzoriek došlo pravdepodobne k agregácii častíc alebo k agregácii s micelami.

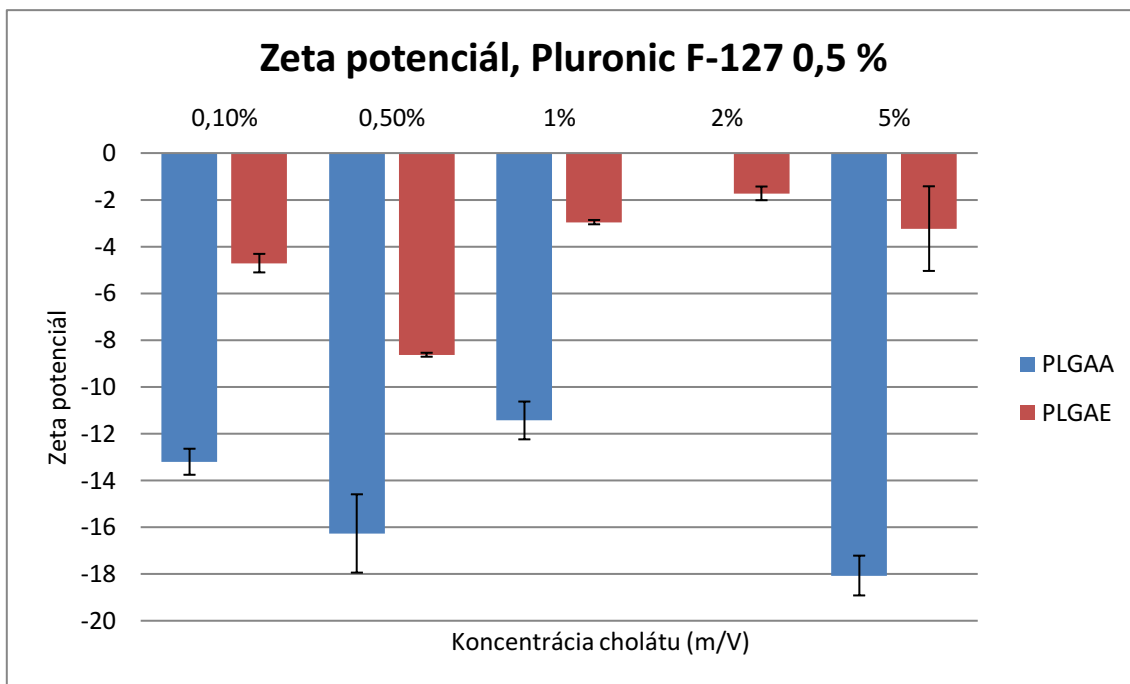
6.3 Zeta potenciál



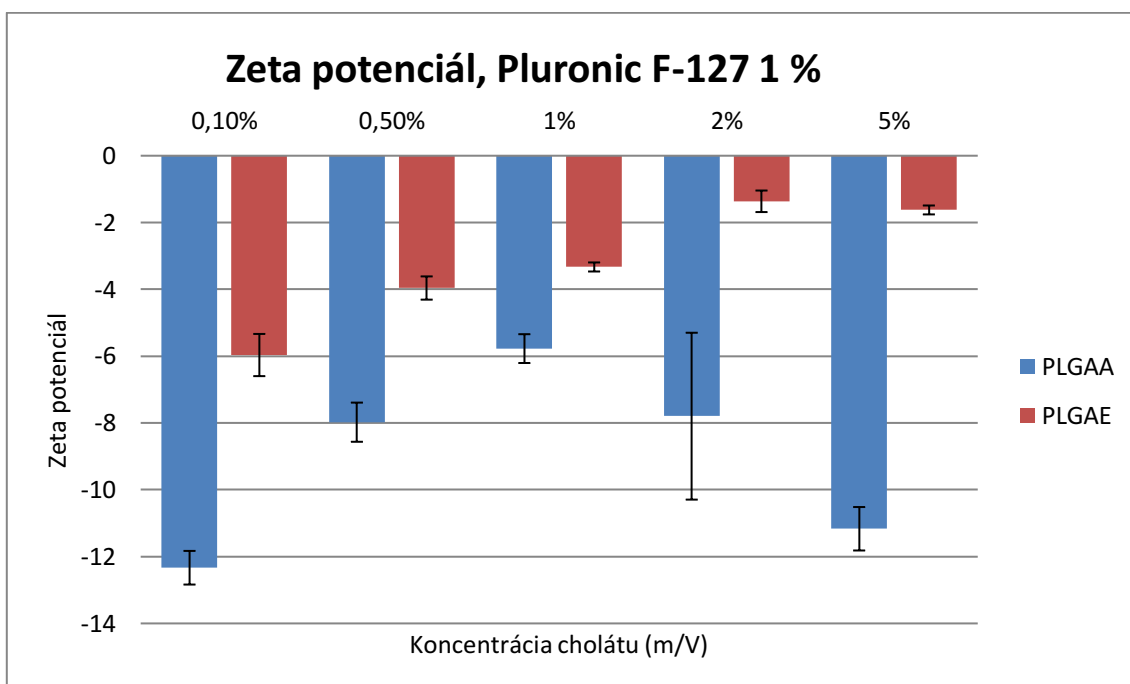
Obrázok č. 30 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky a type polyméra



Obrázok č. 31 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 % a type polyméra



Obrázok č. 32 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 % a type polyméra



Obrázok č. 33 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 % a type polyméra

Nanodisperzia sa považuje za elektrostaticky stabilnú, ak je hodnota zeta potenciálu vyššia než 30 mV. Zabraňuje sa tým agregácii či flokulácii. Stabilitu ovplyvňuje napríklad aj prítomnosť povrchovo aktívnej látky, ktorá zvyšuje stérickú stabilitu. (34)

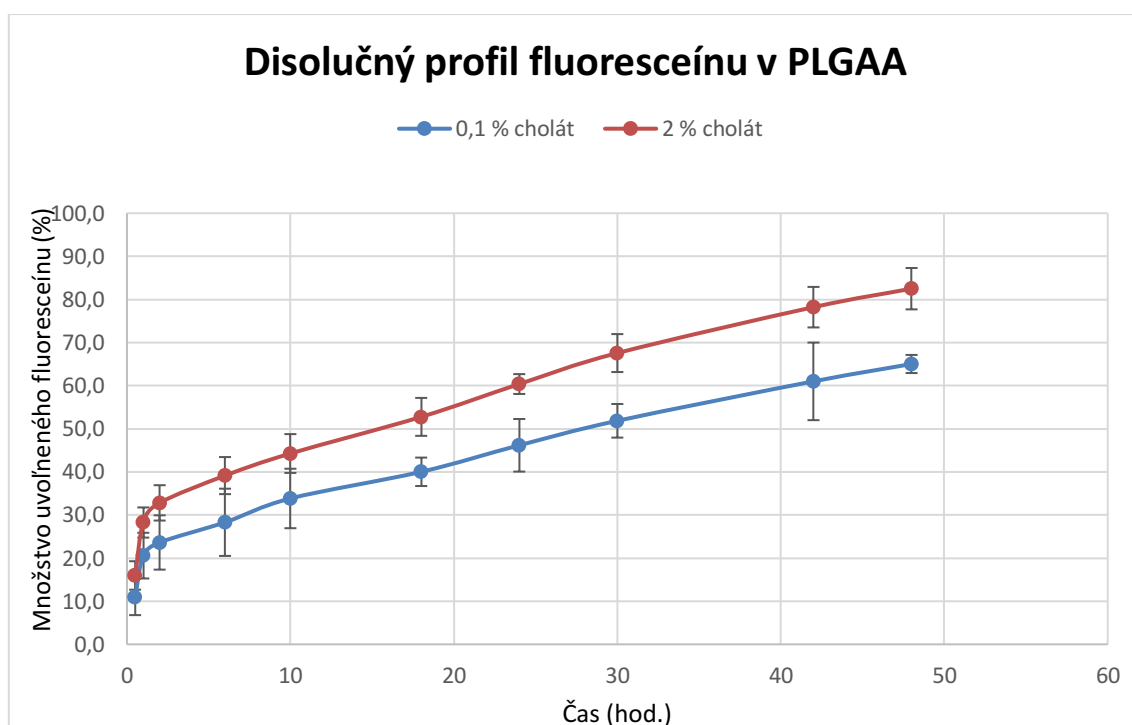
Zeta potenciál PLGAE nanočastíc sa so zvyšujúcou koncentráciou Pluronic F-127 znižoval a približoval k nulovým hodnotám, čo sa dá vysvetliť jeho schopnosťou maskovať povrchový náboj pomocou hydrofilných PEG reťazcov. V prípade PLGAA je trend mierne kolísavý. Zeta potenciál častíc pripravených z polyméru PLGAA, s koncentráciou cholátu 2 % a s koncentráciou Pluronic F-127 0,5 % sa nepodarilo zmerať z dôvodu znehodnotenej vzorky.

Z výsledkov je zrejmá nepriama korelácia medzi veľkosťou a zeta potenciálom. Toto platí najmä pre častice pripravené v prítomnosti poloxaméru. Väčšie častice charakteristické menším celkovým povrchom majú výraznejšie hodnoty zeta potenciálu a menšie častice s veľkým celkovým povrchom majú zeta potenciál menej výrazný. To ukazuje na to, že anionická molekula cholátu spôsobuje takú orientáciu elektronegatívnych funkčných skupín PLGA (t.j. hydroxylov a karboxylov), že v konečnom dôsledku menej ovplyvňujú celkový potenciál.

6.4 Disolúcia

Pre PLGA polyméry je v procese uvoľňovania liečiv typická difúzia a hromadná erózia polyméru. Po vložení nanočastice do disolučného média dochádza k rýchlemu a krátkemu uvoľneniu liečiva, čo sa označuje ako počiatkové uvoľnenie (burst effect). Po tejto fáze nasleduje fáza plató, ktorá je riadená kinetikou 0. rádu a spôsobuje stabilné uvoľňovanie liečiva. (19)

Najskôr dôjde absorpciou vody k vzniku pórov, ktorými prúdi voda do polymérnej matrice. Po určitom čase polymér nabobtná a vytvorí sa väčšie póry, ktorými bude difundovať liečivá látka z matrice do okolia. (19)



Obrázok č. 34 Porovnanie uvoľňovania fluoresceínu v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky a čase

V časticiach s koncentráciou cholátu 0,1 % došlo po 48. hodinách k uvoľneniu 65 % fluoresceínu. Medzi 30. a 42. hodinami bol rozdiel medzi uvoľneným množstvom fluoresceínu v jednotlivých vzorkách najvyšší. V prípade častíc s koncentráciou cholátu 2 % sa po 48. hodinách uvoľnilo väčšie množstvo fluoresceínu, a to 82,5 %. Rozdiely medzi jednotlivými vzorkami neboli výrazné.

Pri vyššej koncentrácii cholátu bol vyšší počiatkový burst effect a uvoľnilo sa viac fluoresceínu. Došlo k tomu na základe toho, že v prípade cholátu s koncentráciou 2 % vznikli menšie častice v porovnaní s časticami pripravenými v prítomnosti cholátu s koncentráciou 0,1 %, čo spôsobilo, že sa v dôsledku väčšieho množstva cholátu vytvorilo veľké fázové rozhranie a fluoresceín sa mohol uvoľniť rýchlejšie.

7. ZÁVER

V tejto práci boli porovnávané 2 polyméry PLGA, ktoré sa medzi sebou líšili v koncovej skupine, pričom jeden z polymérov bol zakončený esterom a druhý kyselinou, s cieľom optimalizovať prípravu nanočastíc, a získať tým čo najvyššiu hodnotu enkapsulačnej efektivity fluoresceínu. Nanočastice boli porovnávané aj z hľadiska veľkosti častíc, zeta potenciálu a PDI.

Z výsledkov môžeme vyvodiť nasledovné:

1. Nanočastice pripravené z polymérov PLGAA a PLGAE výrazne neovplyvnili enkapsulačnú efektivitu, ktorej priemerná hodnota sa približovala k hodnote 100 %. Dá sa konštatovať, že oba polyméry sú vhodné pre inkorporáciu liečiv typu fluoresceínu. Mierny pokles enkapsulačnej efektivity spôsobila zvyšujúca sa koncentrácia cholátu sodného, ktorá súvisí s prekročením CMC.
2. Veľkosť nanočastíc pripravených za použitia polyméru s terminálnym karboxylom PLGAA je najnižšia pri koncentrácii cholátu 1 % a 2 %. So zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu dochádza ku vzniku častíc s nízkou veľkosťou, avšak zvýšením koncentrácie cholátu nad 5 % dôjde ku prekročeniu CMC a tvorbe micel. Interakcia medzi cholátom sodným a polymérom PLGAA prebieha intenzívne a rýchlo, čím vznikajú menšie častice. Molekula PLGAA sa bude v častici spontánne orientovať terminálnymi karboxylmi smerom k povrchu častíc.
3. Nanočastice pripravené z polyméru PLGAE (esterom terminované) so zvyšujúcou sa koncentráciou cholátu vykazujú vyššiu hodnotu veľkosti častíc, keď pravdepodobne dochádza k adsopcii cholátu na povrch nanočastice.
4. Stabilizátor Pluronic F-127 pravdepodobne neovplyvnil enkapsulačnú efektivitu. Pridaním tohto poloxaméru v rôznych koncentráciách sa hodnota veľkosti nanočastíc pripravených z polyméru PLGAA mierne zvýšila.
5. Zvyšujúca sa koncentrácia cholátu znižovala hodnotu zeta potenciálu, napriek tomu zostali systémy dostatočne stabilné. Väčšie častice s menším povrchom vykazovali výraznejšie hodnoty zeta potenciálu a menšie častice s veľkým povrchom mali hodnoty zeta potenciálu menej výrazné.

8. POUŽITÉ SKRATKY

| | |
|-------|---|
| DLS | dynamický rozptyl svetla |
| EE | enkapsulačná efektivita |
| EPR | efekt zvýšenej permeability a retencie |
| GA | kyselina glykolová |
| HLB | hydrofilne-lipofilná rovnováha |
| HPMA | N-2(-hydroxypropyl)metakrylamidový kopolymér |
| LA | kyselina mliečna |
| MPS | mononukleárny fagocytický systém |
| Mn | číselný priemer molekulovej hmotnosti |
| Mr | relatívna molekulová hmotnosť |
| Mw | hmotnostný priemer |
| PBS | fyziológický roztok pufrovaný fosfátom |
| PDI | index polydisperzity |
| PEG | polyetylén glykol |
| PEO | polyetylén oxid |
| PGA | kyselina polyglykolová |
| PLA | kyselina polymliečna |
| PLGA | kyselina poly(mliečna-co-glykolová) |
| PLGAA | kyselina poly(mliečna-co-glykolová) zakončená kyselinou |
| PLGAE | kyselina poly(mliečna-co-glykolová) zakončená esterom |
| PPO | polypropylén oxid |
| SEM | skenovacia elektrónová mikroskopia |
| TEM | transmisná elektrónová mikroskopia |

9. ZOZNAM OBRÁZKOV

| | |
|---|----|
| Obrázok č. 1 Typy nanočastíc (11)..... | 10 |
| Obrázok č. 2 Nanokapsula a nanosféra (14) | 12 |
| Obrázok č. 3 Hydrolýza PLGA (2)..... | 13 |
| Obrázok č. 4 Metóda nanoprecipitácie (23) | 14 |
| Obrázok č. 5 Metóda vysolovania (23) | 16 |
| Obrázok č. 6 Emulzne difúzna vyparovacia metóda (23) | 17 |
| Obrázok č. 7 Polymerizácia (24) | 17 |
| Obrázok č. 8 Pasívny a aktívny targeting (20) | 18 |
| Obrázok č. 9 Vstup nanočastice do bunky (9)..... | 19 |
| Obrázok č. 10 Štruktúra PEG (28)..... | 20 |
| Obrázok č. 11 Všeobecná štruktúra poloxaméru..... | 20 |
| Obrázok č. 12 Mechanizmy uvoľňovania liečiva (19) | 22 |
| Obrázok č. 13 Znázornenie elektrickej dvojvrstvy (37) | 24 |
| Obrázok č. 14 Technika elektroforetického rozptylu svetla (38)..... | 25 |
| Obrázok č. 15 Chemická štruktúra fluoresceínu | 27 |
| Obrázok č. 16 Chemická štruktúra cholátu sodného | 27 |
| Obrázok č. 17 Kalibračná priamka fluoresceínu v PBS | 30 |
| Obrázok č. 18 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky | 32 |
| Obrázok č. 19 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 % | 33 |
| Obrázok č. 20 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 % | 33 |
| Obrázok č. 21 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 % | 34 |
| Obrázok č. 22 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky | 34 |
| Obrázok č. 23 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 % | 35 |
| Obrázok č. 24 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 % | 35 |
| Obrázok č. 25 Hodnoty EE nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 % | 36 |
| Obrázok č. 26 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky a type polyméru..... | 38 |
| Obrázok č. 27 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 % a type polyméru | 38 |
| Obrázok č. 28 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 % a type polyméru | 39 |

| | |
|---|----|
| Obrázok č. 29 Hodnoty veľkosti nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 % a type polyméra | 39 |
| Obrázok č. 30 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky a type polyméra | 42 |
| Obrázok č. 31 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,1 % a type polyméra | 42 |
| Obrázok č. 32 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 0,5 % a type polyméra | 43 |
| Obrázok č. 33 Hodnoty zeta potenciálu nanočastíc v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky s Pluronicom F-127 v koncentrácii 1 % a type polyméra | 43 |
| Obrázok č. 34 Porovnanie uvoľňovania fluoresceínu v závislosti na koncentrácii povrchovo aktívnej látky a čase | 45 |

10. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. **KUBÍNEK, Roman.** Vzdělávání v nanotechnologiích. 2011, Dostupné z: <http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/VzdelavaniNano.pdf>.
2. **KUMARI, Avnesh, YADAV, Sudesh Kumar a YADAV, Subhash C.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]*. 2010, 75(1), 1-18 [cit. 2020-10-24]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
3. **PRIDGEN, Eric M., Frank ALEXIS a Omid C. FAROKHZAD.** Polymeric Nanoparticle Technologies for Oral Drug Delivery. *Clinical Gastroenterology and Hepatology [online]*. 2014, 12(10), 1605-1610 [cit. 2020-12-04]. ISSN 15423565. Dostupné z: doi:10.1016/j.cgh.2014.06.018.
4. **MEHANNY, Mina, a iní.** Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; Curcumin and its derivatives. *Journal of Controlled Release [online]*. 2016, 225, 1-30 [cit. 2020-10-24]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.018.
5. **FAROKHZAD, Omid C a LANGER, Robert.** Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano [online]*. 2008, 3(1), 16-20 [cit. 2020-10-24]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/nn900002m.
6. **HANS, M.L a A.M LOWMAN.** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science [online]*. 2002, 6(4), 319-327 [cit. 2020-12-04]. ISSN 13590286. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
7. **BARTNECK, Matthias, Theresa, WARZECHA Klaudia a Frank, TACKE.** Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine. *Liver Immunology*. 2014, ISSN: 2304-3881.
8. **PARK, Jin-Kyu, a iní.** Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine [online]*. 2016, 12(5), 1365-1374 [cit. 2020-10-24]. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2016.01.013.
9. **DANHIER, Fabienne, a iní.** PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release [online]*. 2012, 161(2), 505-522 [cit. 2020-10-24]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
10. **LAI, Patrick, a iní.** Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]*. 2014, 118, 154-163 [cit. 2020-10-24]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2014.03.017.
11. **FILIPOVÁ, M., RUSINA, R, a HOLADA, K.** Nanočástice jako nosiče léků přes hematoencefalickou bariéru – naděje pro léčbu neurodegenerativních onemocnění v budoucnosti? *CSSN*. 2015, 79/ 112(2): 160– 167.

12. **ŠRÁMEK, Jaromír.** Nanotechnologie v medicíne [online]. 2009, Dostupné z: <https://www.med.muni.cz/biofyz/doc/NMGr/nanotech.pdf>. Učební texty, pomůcky. Masarykova univerzita v Brně.
13. **PÉREZ-HERRERO, Edgar a Alberto FERNÁNDEZ-MEDARDE.** Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics [online]*. 2015, 93, 52-79 [cit. 2020-10-24]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
14. **CALZONI, E., CESARETTI, A., POLCHI, A., DI MICHELE, A., TANCINI B., EMILIANI, C.** Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies. *Journal of Functional Biomaterials [online]*. 2019, 10(1) [cit. 2020-10-28]. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb10010004.
15. **SAFARI, Javad a Zohre ZARNEGAR.** Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society [online]*. 2014, 18(2), 85-99 [cit. 2020-12-06]. ISSN 13196103. Dostupné z: doi:10.1016/j.jscs.2012.12.009.
16. **RYTTING, Erik, Juliane NGUYEN, Xiaoying WANG a Thomas KISSEL.** Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery [online]*. 2008, 5(6), 629-639 [cit. 2020-12-06]. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.5.6.629.
17. **PILLAI, Omathanu a Ramesh PANCHAGNULA.** Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology [online]*. 2001, 5(4), 447-451 [cit. 2020-12-06]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/S1367-5931(00)00227-1.
18. **RAO, J. Prasad a GECKELER, Kurt E.** Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 2011, 36.7: 887-913. ISSN 0079-6700.
19. **KAMALY, Nazila, a iní.** Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews [online]*. 2016, 116(4), 2602-2663 [cit. 2020-11-07]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346.
20. **TABATABAEI MIRAKABAD, Fatemeh Sadat, NEJATI-KOSHKI, Kazem a AKBARZADEH, Abolfazl et al.** PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention [online]*. 2014, 15(2), 517-535 [cit. 2020-11-15]. ISSN 1513-7368. Dostupné z: doi:10.7314/APJCP.2014.15.2.517.
21. **ASTETE, Carlos E. a SABLIOV, Cristina M.** Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition [online]*. 2012, 17(3), 247-289 [cit. 2020-10-31]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/156856206775997322.
22. **BILATI, Ugo, ALLÉMANN, Eric a DOELKER, Eric.** Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences [online]*. 2005, 24(1), 67-75 [cit. 2020-10-31]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2004.09.011.

23. **WANG, Yichao, a iní.** Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials [online]*. 2016, 6(2) [cit. 2020-10-31]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano6020026.
24. **LI, Kai a LIU, Bin.** Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging. *Chem. Soc. Rev [online]*. 2014, 43(18), 6570-6597 [cit. 2020-11-07]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C4CS00014E.
25. **DINARVAND, Rassoul, nima SEPEHRI, MANOUCHEHRI, ROUHANI a Fatemeh ATYABI.** Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine [online]*. 2011, [cit. 2021-4-29]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S18905.
26. **ATTIA, Mohamed F., a iní.** An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology [online]*. 2019, 71(8), 1185-1198 [cit. 2020-11-14]. ISSN 0022-3573. Dostupné z: doi:10.1111/jphp.13098.
27. **FARAJI, Amir H. a WIPF, Peter.** Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry [online]*. 2009, 17(8), 2950-2962 [cit. 2020-11-14]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2009.02.043.
28. **JANG, Hyun-Jun, Chan Young SHIN a Kyu-Bong KIM.** Safety Evaluation of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds for Cosmetic Use. *Toxicological Research [online]*. 2015, 31(2), 105-136 [cit. 2020-11-30]. ISSN 1976-8257. Dostupné z: doi:10.5487/TR.2015.31.2.105.
29. **BOHORQUEZ, Maria, Cody KOCH, Troy TRYGSTAD a Nivedita PANDIT.** A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. *Journal of Colloid and Interface Science [online]*. 1999, 216(1), 34-40 [cit. 2020-11-30]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1006/jcis.1999.6273.
30. **LI, Yong-Yong, Lan LI, Hai-Qing DONG, Xiao-Jun CAI a Tian-Bin REN.** Pluronic F127 nanomicelles engineered with nuclear localized functionality for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering: C [online]*. 2013, 33(5), 2698-2707 [cit. 2020-11-30]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2013.02.036.
31. **SOPPIMATH, Kumares S, Tejrj M AMINABHAVI, Anandrao R KULKARNI a Walter E RUDZINSKI.** Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release [online]*. 2001, 70(1-2), 1-20 [cit. 2020-11-29]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4.
32. **ZHANG, Zhiping a Si-Shen FENG.** The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials [online]*. 2006, 27(21), 4025-4033 [cit. 2020-11-29]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.006.
33. **CARTAXO, Ana Luísa Pécurto.** Nanoparticles types and properties – understanding these promising devices in the biomedical area. 2015.

34. **FORNAGUERA, Cristina a SOLANS, Conxita.** Characterization of Polymeric Nanoparticle Dispersions for Biomedical Applications: Size, Surface Charge and Stability. *Pharmaceutical Nanotechnology [online]*. 2018, 6(3), 147-164 [cit. 2020-11-21]. ISSN 22117385. Dostupné z: doi:10.2174/2211738506666180706121515.
35. **LIN, Ping-Chang, Stephen LIN, Paul C. WANG a Rajagopalan SRIDHAR.** Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances [online]*. 2014, 32(4), 711-726 [cit. 2020-12-05]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
36. **THOMAS, John C.** The Determination of Log Normal Particle Size Distributions by Dynamic Light Scattering . *Journal of Colloid and Interface Science*. 1987, 187-192, ISSN 0021-9797, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(87\)90182-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(87)90182-2).
37. **KASZUBA, Michael, a iní.** High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences [online]*. 2010, 368(1927), 4439-4451 [cit. 2020-11-21]. ISSN 1364-503X. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2010.0175.
38. **KOKUFUTA, Etsuo.** Light Scattering and Electrophoretic Light Scattering of Biopolymers. *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set [online]*. 2016, s. 619-627 [cit. 2020-12-05]. ISBN 9781119075691. Dostupné z: doi:10.1002/9781119075691.ch51.
39. **BHATTACHARJEE, Sourav.** DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release [online]*. 2016, 235, 337-351 [cit. 2020-12-05]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
40. **DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATAEI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. MOZAFARI.** Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics [online]*. 2018, 10(2) [cit. 2020-11-22]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
41. **Fluorescein.** [Online] Chemical Book. [Dátum: 20. 3. 2021.] Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB7753558_EN.htm.
42. **ATTERJEE, Sudipta, Patrick Chi-leung HUI, Chi-wai KAN a Wenyi WANG.** Dual-responsive (pH/temperature) Pluronic F-127 hydrogel drug delivery system for textile-based transdermal therapy. *Scientific Reports [online]*. 2019, 9(1) [cit. 2021-03-21]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-48254-6.
43. **ZHANG, Xiaomin, Yibo WU, Min ZHANG, et al.** Sodium cholate-enhanced polymeric micelle system for tumor-targeting delivery of paclitaxel. *International Journal of Nanomedicine [online]*. 2017, 12, 8779-8799 [cit. 2021-04-08]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S150196.
44. **HADDADI, Azita a Sheikh Tasnim JAHAN.** Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. *International*

Journal of Nanomedicine [online]. 2015, [cit. 2021-4-29]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S90866.

45. KOWALCZYK, Bartłomiej, István LAGZI a Bartosz A. GRZYBOWSKI. Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science [online]*. 2011, 16(2), 135-148 [cit. 2020-11-28]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2011.01.004.

46. ROBERTSON, James D., Loris RIZZELLO, Milagros AVILA-OLIAS, Jens GAITZSCH, Claudia CONTINI, Monika S. MAGOŃ, Stephen A. RENSHAW a Giuseppe BATTAGLIA. Purification of Nanoparticles by Size and Shape. *Scientific Reports [online]*. 2016, 6(1) [cit. 2020-11-28]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep27494.

47. YIM, Sang-Gu, Yong KIM, Ye-Eun KANG, Byung MOON, Eun JUNG a Seung YANG. Size Fractionation of Fluorescent Graphene Quantum Dots Using a Cross-Flow Membrane Filtration System. *Nanomaterials [online]*. 2018, 8(11) [cit. 2020-11-28]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano8110959.