

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKEJ TECHNOLOGIE



## **DIPLOMOVÁ PRÁCA**

# **OPTIMALIZÁCIA LYOFILIZAČNÉHO PROCESU PRE POLYMÉRNE NANOČASTICE**

## **Optimization of lyophilization process of polymer nanoparticles**

**DANIELA HATALOVÁ**

**Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Onřej Holas, PhD.**

**Konzultant: Mgr. Nancy Mrózková**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2024**

## Pod'akovanie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú poriadne citované. Ďakujem vedúcemu diplomovej práce PharmDr. Ondřejovi Holasovi, Ph.D. za ľudský prístup a cenné rady. Taktiež ďakujem svojej konzultantke Mgr. Nancy Mrózkovej, bez ktorej by moja práca nebola tak príjemná. Práca nebola použitá k získaniu žiadneho iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 15.8.2024

# 1. OBSAH

1.	Obsah.....	3
2.	ABSTRAKT .....	5
3.	ABSTRACT .....	6
4.	ÚVOD A CIEĽ PRÁCE.....	7
5.	ZOZNAM SKRATIEK .....	8
6.	TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
6.1	Lyofilizácia.....	10
6.1.1	Výhody a nevýhody lyofilizácie.....	10
6.1.2	Prospekty lyofilizácie .....	11
6.1.3	Lyofilizátor .....	11
6.1.4	Proces lyofilizácie.....	11
6.1.5	Rýchle a pomalé mrazenie.....	13
6.2	Nanočastice a ich charakterizácia.....	14
6.2.1	Príprava nanočastíc .....	14
6.2.2	Hodnotené parametre nanočastíc.....	15
6.2.3	Inštrumentácia DLS a ELS.....	17
6.3	Pomocné látky pri lyofilizácii nanočastíc .....	19
6.3.1	Lyo- a kryoprotektanty .....	19
6.3.2	Typy lyo- a kryoprotektantov .....	20
7.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	21
7.1	Materiál a technické vybavenie .....	21
7.1.1	Chemikálie .....	21
7.1.2	Prístroje .....	22
7.2	Metódy .....	23
7.2.1	Príprava nanočastíc .....	23
7.2.2	Čistenie nanočastíc .....	23
7.2.3	Príprava rozokov lyoprotektantov.....	23
7.2.4	Lyofilizácia.....	24

7.2.5	Rekonštitúcia lyofilizátu.....	24
7.2.6	Meranie kvalitatívnych parametrov nanočastíc .....	25
7.2.7	Skladovanie nanočastíc v stabilitej štúdií .....	25
8.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	26
8.1	Vplyv rôznych lyoprotektantov.....	26
8.2	Rôzne koncentrácie lyoprotektantov .....	31
8.3	Stabilitná štúdia .....	38
8.3.1	Stabilita nanočastíc s trehalózou.....	39
8.3.2	Stabilita nanočastíc so sorbitolom.....	44
9.	ZÁVER .....	49
10.	ZOZNAM GRAFOV.....	50
11.	ZOZNAM TABULIEK.....	51
12.	ZOZNAM OBRÁZKOV .....	52
13.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	53

## 2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická technológia

Školiteľ: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Konzultant: Mgr. Nancy Mrózková

Autor: Daniela Hatalová

Názov diplomovej práce: Optimalizácia lyofilizačného procesu pre polymérne nanočastice

Nanočastice (NP, z ang. *nanoparticles*) získavajú na popularite vo viacerých odvetviach, vrátane medicíny. Ponúkajú širokú škálu možností, ktoré súvisia s ich veľkosťou. V tomto projekte boli pripravované nanočastice z polymliečnej-ko-glykolovej kyseliny (PLGA NP), pretože sú netoxické, biokompatibilné a biologicky odbúrateľné. Konečná formulácia je obvykle vo forme vodnej suspenzie, ktorá je nestabilná z dôvodu hydrolyzácie a úniku prípadného enkapsulovaného liečiva do média. Lyofilizácia sa používa na prevedenie NP z vodnej suspenzie na bezvodú formu. Lyofilizácia nám umožňuje získať pevné a suché NP bez toho, aby sme ich vystavili vyšším teplotám. Cieľom tejto práce bolo nájsť vhodné koncentrácie lyoprotektantov na lyofilizáciu PLGA NP. Výsledné NP by mali dosahovať veľkosť 170–200 nm s úzkou distribúciou veľkosti ( $PDI \leq 0,2$ ) a stabilitou po zmrazení.

V tejto práci boli pripravené PLGA NP metódou nanoprecipitácie. Následne boli pridané rôzne lyoprotektanty: trehalóza, sorbitol, glycín, dextrans a xylitol v nasledujúcich koncentráciách: 1 %, 2 %, 5 % a 10 %. Tieto konkrétne lyoprotektanty boli vybrané na základe literárnej rešerše publikácií týkajúcich sa lyofilizácie PLGA NP a ich vhodných fyzikálno-chemických vlastností (Fonte et al., 2016). Po lyofilizácii koloidnej nanosuspenzie s lyoprotektantmi bol meraný čas rekonštitúcie a následne veľkosť, index polydisperzity (PDI) a  $\zeta$ -potenciál. Boli vyskúšané dva rôzne lyofilizačné protokoly - rýchle a pomalé zmrazenie ako ďalšia premenná, ktorá môže ovplyvniť výsledné vlastnosti NP po rekonštitúcii.

Zistili sme, že z pôvodných piatich lyoprotektantov sú pre naše účely najvhodnejšie trehalóza a sorbitol. Najsľubnejšie výsledky boli dosiahnuté s použitím 10 % roztoku trehalózy pri pomalom aj rýchlom mrazení. Na druhom mieste bola 5 % trehalóza a 5 % sorbitol pri metóde pomalého zmrazovania. Celkovo boli nájdené najlepšie adepty na lyoprotektanty a štandardizovaný postup, ktorý umožňuje získať stabilné NP spĺňajúce naše kritériá.

**Kľúčové slová:** lyofilizácia, PLGA, nanočastice, lyoprotektanty

### 3. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Mentor: PharmDr. Ondřej Holas, PhD.

Consultant: Mgr. Nancy Mrózková

Student: Daniela Hatalová

Title of diploma thesis: Optimization of lyophilization process of polymer nanoparticles

Nanoparticles (NP) are gaining popularity in several fields including medicine, due to possibilities they offer that are linked to their size. In this project, PLGA NP were prepared, as they are non-toxic, biocompatible and biodegradable. Final formulation is always in a form of a water suspension, which is unstable due to hydrolyzation and leakage of potentially encapsulated drug into medium. Lyophilization is used to convert nanoparticles from an aqueous suspension to a water-free form. Lyophilization allows us to obtain solid and dry NPs without exposing them to higher temperatures. The aim of this work was to find suitable concentrations of lyoprotectants for lyophilization of PLGA NPs. The resulting NPs should reach a size of 170-200 nm with a narrow size distribution ( $PDI \leq 0.2$ ) and stability after freezing.

In this work we prepared NP with the method of nanoprecipitation. Subsequently, we added different lyoprotectants: trehalose, sorbitol, glycine, dextran and xylitol in following concentrations: 1 %, 2 %, 5 % and 10 %. These particular lyoprotectants were selected based on a literature review of publications related to the lyophilization of PLGA NPs and their appropriate physico-chemical properties (Fonte et al., 2016). After lyophilization of the colloidal nanosuspension with lyoprotectants, the reconstitution time was measured followed by measurement of size, polydispersity index (PDI) and  $\zeta$ -potential. Two different lyophilization protocols, fast and slow freezing, were tested as another variable that may affect the final properties of the NPs after reconstitution.

The best of the initial five lyoprotectants for our purposes were trehalose and sorbitol. The most promising results were obtained with 10 % trehalose solution in both slow and fast freezing methods. The second best would be 5 % trehalose and 5 % sorbitol in the slow-freezing method. In summary, we found the best adepts for lyoprotectants and standardised procedure that would produce stable NP that meet our criteria.

**Key words:** lyophilization, PLGA, nanoparticles, lyoprotectants

## 4. ÚVOD A CIEĽ PRÁCE

NP sú v súčasnej dobe stále častejšie využívané v zdravotníctve pre rôzne účely. Medzi tie najzásadnejšie patrí ich využitie ako nosičov liečiv pre ciele distribúciu alebo ich zapojenie do moderných zobrazovacích metód. NP sú charakteristické veľmi vysokým pomerom voľného povrchu na jednotku hmotnosti. Z toho plynie celá rada stabilitných problémov, ktoré sú spojené najmä so skladovaním nanomateriálov vo forme vodných alebo iných roztokov. Reverzibilná a hlavne ireverzibilná agregácia NP vedie v konečnom dôsledku ku strate koloidného charakteru sústavy a NP systém je tým znehodnotený. Takýto spôsob uchovávania vedie u NP, ktoré sú použité ako nosiče liečiv k nežiadúcemu uvoľňovaniu liečiva do disperzného média.

Metódy stabilizácie NP prípravkov sú veľmi obmedzené a lyofilizácia patrí k najčastejšie používaným prístupom. Jedná sa o šetrné odstránenie vody z prípravku v prítomnosti vhodných pomocných látok, ktorých účelom je zaistenie stability NP v priebehu celého procesu lyofilizácie. V súčasnej dobe existuje len obmedzený počet štúdií, ktoré sa detailne zaoberajú lyofilizáciou nanomateriálov.

Cieľom tejto práce bolo nájsť vhodný postup lyofilizácie polymérnych NP pripravených z polyesteru poly(lakto-ko-glykolová-kyselina), ktoré by po lyofilizácii a následnej rekonštitúcii boli stabilné a spĺňali by požiadavky na veľkosť do 200 nm a index polydisperzity do 0,2. Ochranu NP počas lyofilizácie poskytujú lyoprotektanty. Cieľom práce teda bolo nájsť vhodný lyoprotektant vo vhodnej koncentrácii, v kombinácii s vhodným lyoflizačným cyklom. Po splnení tohto cieľa bola sekundárnym cieľom krátka stabilitná štúdia, aby sa bližšie špecifikovala stabilita pripravených NP pri skladovaní v rôznych teplotných podmienkach.

## 5. ZOZNAM SKRATIEK

skratka	význam skratky	slovenský význam
<b>AFM</b>	atomic force microscopy	mikroskopia atomárnych síl
<b>DLS</b>	dynamic light scattering	dynamický rozptyl svetla
<b>EDL</b>	electric double layer	elektrická dvojvrstva
<b>ELS</b>	electrophoresis light scattering	rozptyl svetla elektroforézou
<b>EMA</b>	European medicines agency	Európska lieková agentúra
<b>F-127</b>	Ploxamer 407	Ploxamer 407
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	Správa potravín a liečiv
<b>FMR</b>	ferromagnetic resonance	feromagnetická rezonancia
<b>FTIR</b>	Fourier transform infrared spectroscopy	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
<b>GLY</b>	glycin	glycín
<b>HRTEM</b>	high resolution transmission electron microscopy	transmisná elektrónová mikroskopia s vysokým rozlíšením
<b>LP</b>	lyoprotektanty	lyoprotektanty
<b>MAN</b>	manóza	manóza
<b>MPS</b>	mononuclear phagocytosing system	mononukleárny fagocytujúci systém
<b>NP</b>	nanoparticles	nanočastice
<b>PDI</b>	polydispersity index	index polydisperzity
<b>PEG</b>	polyethylene glycol	polyetylénglykol
<b>PLGA</b>	poly(lactic-co-glycol-acid)	poly(lakto-ko-glykolová-kyselina)
<b>PVA</b>	polyvinyl alcohol	polyvinyl alkohol
<b>PVP</b>	polyvinylpyrrolidone	polyvinylpyrrolidón
<b>RCF</b>	relative centrifugal field	relatívna odstredivá sila



<b>SEM</b>	scanning electron microscopy	skenovacia elektrónová mikroskopia
<b>SOR</b>	sorbitol	sorbitol
<b>SQUID</b>	superconducting quantum interference device magnetometry	magnetometria supravodivého kvantového interferenčného zariadenia
<b>Tc</b>	temperature of collapse	teplota kolapsu
<b>TEM</b>	transmission electron microscopy	transmisná elektrónová mikroskopia
<b>Teu</b>	eutectic temperature	eutektická teplota
<b>Tg</b>	glass transition temperature	teplota skelného prechodu
<b>TRE</b>	trehalóza	trehalóza
<b>VSM</b>	vibrating sample magnetometry	magnetometria vibračných vzoriek
<b>XAS</b>	x-ray absorption spectroscopy	röntgenová absorpčná spektroskopia
<b>XMCD</b>	x-ray magnetic circular dichroism	röntgenový magnetický cirkulárny dichroizmus
<b>XRD</b>	x-ray diffraction	röntgenová difrakcia
<b>XYL</b>	xylitol	xylitol
<b>DLS</b>	dynamic light scattering	dynamický rozptyl svetla

## 6. TEORETICKÁ ČASŤ

### 6.1 Lyofilizácia

Slovo lyofilizácia má grécky pôvod zo slov *leo* (λίω), čo znamená „rozpadnúť, rozpustiť“, *phileo* (φιλέω), čo znamená „milovať, mať náklonnosť“ a *philnamai* (πίλναμαι), čo znamená „kontakt, priblíženie“. Tento termín bol lyofilizácii pridelený kvôli poróznemu charakteru lyofilizátu a jeho schopnosti rýchlej rekonštitúcie (Varshney et al., 2015). Lyofilizácia v súčasnosti predstavuje metódu dehydratácie, ktorá využíva sublimáciu zamrznutej kvapaliny v subatmosférickom tlaku, bez prechodu kvapaliny do tekutého stavu. Lyofilizácia bola využívaná už od staroveku (1250 p.n.l.), kedy ju (nevedomky) používali napríklad peruánsky Inkovia. Tí nechávali zamrznúť zemiaky v mínusových teplotách v horách Machu Picchu, kde sa kvôli vysokej nadmorskej výške (až 2430 m.n.m.) a nižšiemu tlaku zamrznutá voda veľmi pomaly sublimovala (Redcliffe N. Salaman & William Glynn Burton, n.d.). Od vtedy prešla lyofilizácia dlhú cestu, počas ktorej sa vyvíjali a zdokonalovali jednotlivé komponenty a procesy. Napríklad vákuum, alebo skôr znížený tlak bol pri prvých pokusoch o lyofilizáciu vytváraný chemicky, s použitím ethyl éteru alebo kyseliny sírovej. Až neskôr, v roku 1910 L.D. Shackel vytvoril vákuum za pomoci vákuovej pumpy (Varshney et al., 2015).

#### 6.1.1 Výhody a nevýhody lyofilizácie

K výhodám lyofilizácie v rámci jej využitia v zdravotníckom a farmaceutickom priemysle patrí napríklad schopnosť zvýšiť stabilitu a životnosť koloidných polymérnych systémov, ktoré sa stále častejšie používajú ako nosiče liečiv (Kasper et al., 2013). Pri rekonštitúcii NP s enkapsulovanými látkami poskytujú lepšiu disolučnú profil NP sušené lyofilizáciou, v porovnaní s NP sušenými prúdom teplého vzduchu (Zhao et al., 2021). Ďalšou výhodou je možnosť pripraviť aplikačné systémy pre proteínové alebo peptidové liečivá, pretože oproti konvenčným sušiacim metódam nevyužíva lyofilizácia na dehydratáciu zvýšenú teplotu. Lyofilizácia takto predstavuje nepostrádateľnú metódu v nanotechnológiách, nakoľko je schopná, narozdiel od ostatných techník, odstrániť objem vody bez významného poškodenia NP a so zachovaním 100% výtťažku (Arora et al., 2023).

Na druhú stranu má lyofilizácia aj svoje nevýhody. Najväčšou nevýhodou sa javí dlhý čas lyofilizácie, ktorý väčšinou činí 12-72 hodín (Arora et al., 2023). To z lyofilizácie robí ako časovo tak aj energeticky náročnú metódu. Lyofilizácia taktiež nie je plne automatizovaný proces. Jednotlivé medzikroky ako je plnenie lyofilizátoru, musia byť vykonávané operátorom s jeho neustálou kontrolou celého procesu. To sa v priemyslovom merítku opäť odráža na celkovej finančnej náročnosti tejto metódy (Arora et al., 2023).

### 6.1.2 Prospekty lyofilizácie

Aj napriek spomínaným nevýhodám má lyofilizácia v súčasnosti nezastúpiteľnú rolu na trhu a dopyt po nej stále stúpa. Jedným z mnohých dôvodov je neustále narastajúci záujem o lyofilizované biomedicínske produkty, najmä biologické liečivá a injekčné formulácie.

Lyofilizácia sa v súčasnosti využíva na prípravu parenterálií, ako sú napríklad vakcíny, alebo farmaceutiká na bázi nukleových kyselín, zahŕňajúce génovú terapiu (Allison & Anchordoquy, 2001). Vo vývoji sú aj nové inhalačné systémy určené na priamu inhaláciu lyofilizovanej disperzie, so zámerom vyhnúť sa nevýhodám mletia suchých práškov (Claus et al., 2011). Približne u polovice z 300 biologických liečiv, ktoré boli doposiaľ schválené agentúrou EMA a FDA, bola pri príprave použitá metóda lyofilizácie (Arora et al., 2023). Podľa Správy o prieskume trhu z roku 2020 sa očakáva zvýšenie hodnoty trhu s lyofilizáciou do roku 2025 z 4,9 miliarda dolárov na 7,3 miliarda dolárov (Freeze Drying/Lyophilization Market - Global Forecast to 2025, 2020).

### 6.1.3 Lyofilizátor

Samotný proces lyofilizácie prebieha v lyofilizátore. Medzi kľúčové komponenty lyofilizátoru patrí lyofilizačná komora s policou, kondenzátor, vákuová pumpa a zberná nádoba na zachyt vody. Polica v lyofilizačnej komore má osobitnú kontrolu teploty, ktorej gradient je nastaviteľný a neustále zaznamenávaný v čase. Vzorky sú v priamom kontakte s policou (oddelené len stenou vialky), vďaka čomu prebieha prenos teploty kondukciou a samotné mrznutie vzoriek. Vákuová pumpa zabezpečuje vznik vákua v lyofilizačnej komore. Sublimovaná voda sa zachytáva na kolektore, kde kondenzuje, pretože kolektor má spravidla nižšiu teplotu ako lyofilizačná polica. Po ukončení celého procesu lyofilizácie sa namrznutá voda na kolektore roztápa a zachytáva v zbernej nádobe.

Lyofilizátory sa rozdeľujú podľa rôznych kritérií. Podľa veľkosti a použitia ich môžeme rozdeliť na:

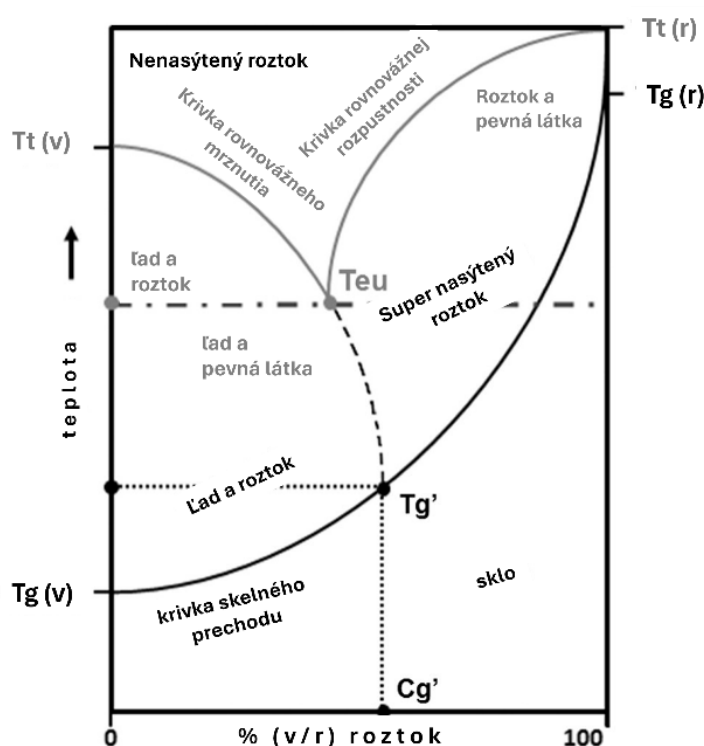
- laboratórne stolové lyofilizátory
- pilotné lyofilizátory
- produkčné lyofilizátory.

Pilotné lyofilizátory sa používajú na výskum aj vývoj metód, či pri potrebe transferu už vyvinutej metódy do väčšieho – priemyselného merítka (Barley, n.d.).

### 6.1.4 Proces lyofilizácie

Proces lyofilizácie môžeme rozdeliť na 3 hlavné kroky a to je mrazenie, primárne sušenie a sekundárne sušenie. Lyofilizácia je metóda dehydratácie, počas ktorej sa vzorka najskôr zamrazí a následne sa za prítomnosti vákua zamrznutý podiel vody sublimuje. S výhodou sa tento spôsob redukcie množstva vody využíva u termolabilných látok, napríklad proteínov.

V prvej fáze je koloidná nanosuspenzia mrazená kontaktom jej nádoby/vialky s lyofilizačnou policou. Mrazenie prebieha pod bodom  $Tg'$  (teplota skelného prechodu, ang. *glass transition temperature*) roztoku amorfnych látok alebo pod bodom  $Teu$  (eutektická teplota) kryštalických látok, aby sa zaistilo rovnomerné zamrznutie formulácie. Keď pozorujeme proces mrznutia veľmi podrobne, zistíme, že začína špecifickým spôsobom – nukleáciou. Nukleácia je tvorba prvých kryštálov ľadu v suspenzii, ktoré slúžia ako nukleačné jadrá pre ďalšie mrznutie. Nukleácia ako jav nastáva vplyvom tzv. prechladenia (ang. *supercooling*). Supercooling je jav kedy si tekutina, napr. čistená voda zachováva fyzikálny stav tekutiny aj pod rovnovážnym bodom mrazu ( $0^{\circ}\text{C}$  pri atmosférickom tlaku). Supercooling môžeme teda definovať ako rozdiel teoretickej teploty mrznutia ( $0^{\circ}\text{C}$ ) a aktuálnej teploty, pri ktorom sa začali tvoriť prvé kryštáliky ľadu. Tento rozdiel bežne činí  $10\text{--}15^{\circ}\text{C}$ , v závislosti na vlastnostiach mrazeného roztoku (Kasper & Friess, 2011).



**Obr. 1 Fázový diagram pre systém voda/roztok**

Obr. 1 zobrazuje  $Tt$ ,  $Teu$ ,  $Tg$ ,  $Tg'$  a  $Cg'$ , ktoré predstavujú teplotu topenia, eutektickú teplotu, teplotu sklovitého prechodu, teplotu sklovitého prechodu zmrazenej vzorky a koncentráciu kryokoncentrovaného roztoku. V – voda, r – rozpustená látka. Kryštalizácia rozpustenej látky nastáva pod  $Teu$  (sivá čiara). V prípade vitrifikácie nedochádza ku kryštalizácii rozpustenej látky pri  $Teu$  (čierna čiara) a kryokoncentrácia nasleduje do skleného stavu pri  $Tg$ .

Zdroj: (Fonte et al., 2016) - upravené

Druhým krokom lyofilizácie je primárne sušenie. To prebieha za zníženej teploty a vákuu s tým, že zamrznutá voda sa sublimuje v smere od povrchu ľadu ku dnu lyofilizačných skúmaviek, čiže *top-to-bottom* smer. Tento krok zaberá najviac času v pomere ku ostatným

krokom lyofilizácie. Počas primárneho sušenia nastáva sublimácia kryštalického ľadu, ktorý sa vytvoril počas prvého kroku – mrazenia. Na konci primárneho sušenia ostáva vo vzorku približne 15-20 % vody (Kasper & Friess, 2011).

Tretím krokom je sekundárne sušenie. To nasleduje po primárnom sušení zvýšením teploty police na 10-50 °C (Fonte et al., 2016). Sekundárne sušenie odstraňuje väčšinu zvyškovej vody stále v prítomnosti vákua procesom odparovania. Teplota sekundárneho sušenia je nastavovaná s ohľadom na vlastnosti sušenej látky, napríklad v prípade proteínov sa nepresahuje teplota 40 °C z dôvodu rizika denaturácie.

### 6.1.5 Rýchle a pomalé mrazenie

Na úvod je vhodné rozlíšiť pojmy chladenie a mrazenie. Chladenie v rámci procesu lyofilizácie sa viaže na pokles teploty v komore lyofilizátoru, police a samotnej formulácie. Naproti tomu mrazenie referuje ku zmene fyzikálneho stavu formulácie z tekutého stavu na pevný.

Existujú rôzne spôsoby prevedenia prvého kroku lyofilizácie – mrazenia, ktoré v nemalej miere ovplyvňujú finálne vlastnosti lyofilizátu. Rýchle a pomalé mrazenie referuje na rýchlosť schladenia vzorku v dôsledku rozdielnej teploty lyofilizačnej police v momente ukladania vzoriek na policu. Aj napriek zavádzajúcemu názvu neopisujú tieto dva spôsoby tempo zmeny teploty samotnej police, ktoré je fixne nastavené (napr. 1 °C/min). Pri rýchlom mrazení sa ukladá pripravená koloidná nanosuspenzia na policu už predchladenú na mínusovú teplotu. Čím rýchlejší je proces samotného mrznutia koloidnej nanosuspenzie, tým menšie kryštály ľadu vznikajú, čo vedie k veľkému počtu malých pórov výslednej formulácie. To nielen umožňuje rýchlejšiu sublimáciu a sekundárne sušenie, zároveň menšie kryštálky ľadu vytvárajú menší mechanický stres na NP a tým vytvárajú nižšie riziko ich agregácie (Hottot et al., 2007). Podľa pozorovaní Hottot a kol. boli najmenšie veľkosti kryštálov ľadu dosahované pri nakladaní vzoriek na policu s teplotou – 10 °C. Pri pomalom mrazení sa ukladajú vzorky na lyofilizačnú policu laboratórnej teploty (20-25 °C) a nechávajú sa pomaly chladnúť a následne mrznúť rýchlosťou nastaveného gradientu poklesu teploty police lyofilizátoru (Hottot et al., 2007). Ďalšou možnosťou je predmrazenie vzoriek v tekutom dusíku tzv. *flash freezing*.

## 6.2 Nanočastice a ich charakterizácia

NP sú pevné koloidné častice, ktorých veľkosť sa pohybuje v rozmedzí od 1 nm do 1000 nm. NP sa v súčasnej medicíne používajú kvôli ich schopnosti cielenej distribúcie, tým pádom zníženej systematickej toxicity, zlepšenia rozpustnosti zle rozpustných liečiv alebo modifikovaní uvoľňovania liečiva v organizme. Príkladom využitia NP v medicíne je cielečná distribúcia antineoplastík pri liečbe tumoru, polymérne NP ako nosiče pri liečbe ochorení primárne zadných segmentov oka, nebulizované NP pri cielenej liečbe rakoviny pľúc, prípadne využitie NP pri diagnostike rakovinových ochorení a iné (Begines et al., 2020).

Z pohľadu materiálov z ktorých sa skladajú, môžeme NP rozdeliť na organické, anorganické a uhlíkové NP. Organické NP sú tvorené sacharidmi, lipidmi, proteínmi alebo polymermi, vďaka čomu sú zväčša netoxické a biodegradovateľné. Príkladom sú dendriméry, lipozómy a micely. Ku anorganickým NP môžeme priradiť zlaté, strieborné, či kremíkové NP (Chidambaram & Krishnasamy, 2014). Uhlíkové NP často tvoria samostatnú skupinu, pretože majú špecifické vlastnosti a usporiadanie. (Joudeh & Linke, 2022)

Polymérne NP sami o sebe môžu byť rozdelené podľa viacerých kritérií. Môžeme ich rozdeliť na nanosféry a nanotobolky, podľa usporiadania polymérov v častici. Nanotobolky, ktoré predstavujú rezervoárový typ NP, sú tvorené polymérom obalom a vnútornou kavitou, v ktorej môže byť uzavretá liečivá látka. Nanosféry oproti tomu predstavujú maticový systém, v ktorom môže byť liečivo rovnomerne distribuované, alebo adsorbované na povrch NP (Zielinska et al., 2020).

Príkladom často využívaného polyméru pre prípravu NP je poly(lakto-ko-glykolová kyselina) (PLGA). PLGA je lineárny kopolymér, ktorý tvorí rôzne dlhé formy s rôznym pomerom mliečnej a glykolovej kyseliny. Vzájomný pomer týchto zložiek v polyméri ovplyvňuje jeho fyzicko-chemikálne vlastnosti, ako je napríklad rýchlosť degradácie vo vodnom prostredí. Čím väčší je pomer mliečnej kyseliny v polyméri, tým pomalšie sa degraduje (Gentile et al., 2014). Medzi vlastnosti PLGA patrí napríklad biokompatibilita, biodegradovateľnosť a netoxickosť voči živým systémom. NP z PLGA ponúkajú mnohé výhody vrátane kontrolovaného uvoľňovania liečiva, lepšej stability a zvýšenej terapeutической účinnosti (Arora et al., 2023).

### 6.2.1 Príprava nanočastíc

Pri príprave NP môžeme použiť niekoľko metód prípravy. Metódu prípravy NP volíme v závislosti na type látky, ktorý chceme do NP inkorporovať alebo type NP, ktoré chceme vytvoriť. Všeobecne existujú dva prístupy pripravovania NP. *Top-down* metódy zahŕňajú prípravu materiálu a jeho následnú redukciu na mešie veľkostné frakcie. Medzi *top-down* metódy patrí napríklad drvenie, mechanické mletie alebo laserová ablácia. Medzi hlavné nevýhody týchto metód patrí vznik rôznych veľkostných frakcií NP. Naopak *bottom-up* metódy vytvárajú NP spájaním z menších jednotiek (atómov, molekúl) na väčšie. Tieto

metódy príprav sa môžu odohrávať v prostredí roztoku, plynu, alebo s pomocou biologických systémov (Selmani et al., 2022).

V praxi sa častejšie používajú metódy *bottom-up*, ktoré pracujú s materiálmi vo forme vhodne zvolených roztoků. Príkladom týchto metód je ko-precipitácia, sol-gel syntéza, solvotermálna/ hydrotermálna syntéza, sonochemická syntéza, elektrochemická syntéza ai. Polymérne NP môžu byť pripravené metódou evaporácie rozpúšťadla, emulsifikácie difúziou rozpúšťadla, emulsifikácie reverzným vysolovaním, nanoprecipitáciou a ďalšími metódami (Kumar Sharma et al., 2022).

### **6.2.1.1 Nanoprecipitácia**

Často využívanou metódou prípravy NP je práve nanoprecipitácia, ktorá vie poskytnúť ako nanosféry, tak aj nanotobolky s rozmermi okolo 170 nm, v závislosti na type a koncentrácii polyméru, zvoleného surfaktantu a ďalších podmienok (Chidambaram & Krishnasamy, 2014). Počas prípravy NP nanoprecipitáciou sa ako pomocné látky používajú surfaktanty, ktoré svojou schopnosťou znižovať povrchové napätie, znižujú stupeň agregácie vzniknutých NP. Príkladom surfaktantov sú polyvinyl alkohol (PVA) či poloxaméry. Princíp nanoprecipitácie spočíva v zmiešaní dvoch miešateľných fáz – vodnej a organickej. Hnacou silou samotnej precipitácie je tzv. supersaturácia, ku ktorej dochádza pridaním polyméru rozpusteného v organickej fáze do vodného prostredia, v ktorom je polymér len veľmi málo rozpustný. Takýmto spôsobom sa vyzrážajú prvé čiastočky polyméru (nukleácia), ktoré sa postupne nabaľujú a agregujú za tvorby NP. Nanoprecipitácia je jednoduchá, reprodukovateľná metóda prípravy NP, ktorá sa používa na enkapsuláciu účinných látok do NP (Miladi et al., 2016).

### **6.2.2 Hodnotené parametre nanočastíc**

Medzi základné parametre, ktoré posudzujeme pri príprave NP je ich rozmer, polydisperzita,  $\zeta$ -potenciál, tvar a povrch častíc ai.

V súčasnosti existuje veľké množstvo metód, ktoré sa používajú na charakterizáciu NP. Na popis morfológie, povrchu NP a ich kryštalickej štruktúry sa používajú metódy založené na elektrónovej mikroskopii. Sem patria napríklad transmisná alebo skenovacia elektrónová mikroskopia (TEM, SEM), transmisná elektrónová mikroskopia s vysokým rozlíšením (HRTEM), kryo-TEM alebo mikroskopia atomárnych síl (AFM). TEM metóda využíva prechod lúču elektrónov cez tenkú vrstvu vzorky, čo umožňuje zobrazenie veľkosti, tvaru a homogenity sledovaných NP. SEM umožňuje podrobne sledovať povrch vzorky pomocou zaostreného lúča primárnych elektrónov, ktorý postupne skenuje vzorku. Obrázok je tvorený najmä rozptýlenými elektrónmi a sekundárnymi elektrónmi (ktoré vznikli excitáciou vzorky primárnymi elektrónmi) (Stokes, 2008). NP vytvorené z magnetických materiálov (napr. oxidy železa) môžu byť charakterizované pomocou magnetických techník ako magnetometria supravodivého kvantového interferenčného zariadenia (SQUID), magnetometria vibračných vzoriek (VSM), feromagnetická rezonancia (FMR) alebo

röntgenový magnetický cirkulárny dichroizmus (XMCD). Veľmi často sa na popis veľkosti kryštalických zŕn a kryštalickej štruktúry používajú röntgenové metódy ako röntgenová difrakcia (XRD) alebo röntgenová absorbčná spektroskopia (XAS) (Mourdikoudis et al., 2018). Popis funkčných skupín na povrchu NP, najmä metalických a uhlíkových sa s výhodou prevádza pomocou infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FTIR) (López-Lorente & Mizaikoff, 2016). Jednoduchou a široko používanou metódou je dynamický rozptyl svetla (DLS) a rozptyl svetla elektroforézou (ELS). Tieto dve metódy sa používajú na popis veľkosti, veľkostnej distribúcie NP a  $\zeta$ -potenciálu. Keďže boli tieto dve techniky použité v rámci tejto práce, budú podrobnejšie popísané v samostatnej kapitole.

### 6.2.2.1 Veľkosť, tvar a polydisperzita

Veľkosť NP je základným posudzovaným parametrom, nakoľko ich veľkosť ovplyvňuje vstup do cieľovej štruktúry v organizme, distribúciu, profil uvoľňovania liečiva a fyzikálne charakteristiky nanosuspenzie (Kumar Sharma et al., 2022). NP do veľkosti 20 nm sú schopné prechádzať cievnu fenestráciou a medzibunečnými priestormi tumoru. Vďaka tomu prechádzajú hlboko do rakovinového tkaniva, avšak neostávajú tam viac ako 24 hodín (Albanese et al., 2012). NP o veľkosti 30 nm–200 nm neprechádzajú medzibunečnými priestormi cievneho epitelu a teda ostávajú zachytené v cievnom systéme, kým nie sú zachytené v tumore, prípadne zachytené mononukleárnym fagocytujúcim systémom (MPS, z ang. *mononuclear phagocytosing system*). NP väčšie ako 200 nm sa akumulujú v pečeni a slezine, kde sú opäť spracované fagocytujúcimi bunkami (Albanese et al., 2012).

Tvar NP je ďalší faktor ovplyvňujúci ich správanie v organizme. Gratton a kol. porovnávali uptake častíc väčších ako 100 nm do rakovinových buniek a zistili, že stúpa v nasledujúcom poradí: kocky, cylindre, na druhom mieste sféry a najväčší príjem do buniek mali NP v tvare tyčiek (Gratton et al., 2008). Naproti tomu vo veľkosti menšej ako 100 nm vykazovali lepší uptake do buniek práve sférické NP.

Ďalším sledovaným parametrom je index polydisperzity - PDI. Index polydisperzity je definovaný ako štandardná odchýlka ( $\delta$ ) od distribúcie rozmeru (priemeru) častíc, vydelená priemerným rozmerom častíc.  $\alpha$  zodpovedá hydrodynamickému polomeru NP (Clayton et al., 2016).

$$PDI = \left(\frac{\delta}{2\alpha}\right)^2$$

PDI opisuje zastúpenie jednotlivých veľkostných frakcií z celkového množstva pripravených NP (Clayton et al., 2016). Čím je toto bezrozmerné číslo väčšie, tým je menšia uniformita veľkosti častíc. Vo všeobecnosti sa dá povedať, že je pre medicínske účely preferovaný úzky rozptyl veľkostí, čiže nízka polydisperzita NP, vzhľadom na to, že rôzna veľkosť NP poskytuje rozdiely v správaní NP, ich biodostupnosti, distribúcii a eliminácii.



### 6.2.2.2 $\zeta$ -potenciál

U NP taktiež popisujeme elektrostatické vlastnosti po ich disperzácii vo vodnom prostredí, kedy sa okolo častíc vytvárajú charakteristické vrstvy. Elektrická dvojvrstva (EDL, z ang. *electric double layer*) je vrstva, ktorá sa vytvorí na povrchu NP po ich disperzácii vo vodnom prostredí. Prvou a vnútornou je Sternova vrstva iontov v priamom kontakte s NP, ktoré majú opačný náboj ako samotná častica. Druhou, vonkajšou vrstvou EDL je difúzna vrstva, ktorá na rozdiel od Sternovej vrstvy nie je tvorená jedným typom iontov a jej náboj ovplyvňuje aj elektrolytové zloženie disperzného prostredia. Medzi difúznou vrstvou a okolím/disperzovanými iontami média sa nachádza pomyselná klzná plocha (ang. *slipping plane*). Počas elektroforézy sa takto nabitá častica bude pohybovať od jednej elektródy k druhej spolu s EDL vrstvou, pričom klzná plocha predstavuje pomyselné rozhranie medzi pohybujúcou sa zložkou a okolným disperzným prostredím.  $\zeta$ -potenciál predstavuje práve kinetický potenciál na klznej ploche, alebo rozdiel medzi elektrokinetickým potenciálom EDL a disperzným prostredím za klznou plochou (Bhattacharjee, 2016).

Pomocou  $\zeta$ -potenciálu vieme odhadnúť stabilitu nanosuspenzie, nakoľko častice s rovnakým nábojom sa budú navzájom odpudzovať a tak zabráňovať vzájomnej agregácii. Len odhadnúť preto, lebo  $\zeta$ -potenciál nepopisuje iné typy interakcií, napríklad Van der Waalsove väzby, ktoré ovplyvňujú stabilitu nanosuspenzie (Bhattacharjee, 2016).

### 6.2.3 Inštrumentácia DLS a ELS

Spomínané vlastnosti NP meriame pomocou metódy zvanej dynamický rozptyl svetla (DLS, z ang. *dynamic light scattering*), taktiež nazývanou aj fotónová korelačná spektroskopia. DLS je technika, ktorá meria Brownov pohyb makromolekúl alebo častíc v suspenzii, ktorý vzniká v dôsledku náhodných zrážok častíc do seba navzájom a do stien nádoby. DLS využíva monochromatické svetlo o určitej vlnovej dĺžke, ktoré preniká koloidnou suspenziou v kyvete, kde vplyvom náhodného pohybu častíc nastáva interakcia so svetelným lúčom a dochádza k rozptylu monochromatického svetla. Pohyb častíc spôsobuje fluktuácie v difrakčnom obraze a táto fluktuácia svetelného signálu je kontinuálne zaznamenávaná a kvantifikovaná detektorom počítajúcim fotóny, ktorý je umiestnený často pod uhlom 90° ku zdroju svetla a ktorý premieňa signál z fotónov na elektrické impulzy. Brownov pohyb je funkciou veľkosti častíc, teploty a viskozity média. Keďže teplota a viskozita média je známa a konštantná, dá sa povedať, že intervaly fluktuácií signálu na detektore sú závislé na veľkosti častíc (Falke & Betzel, 2019).

$\zeta$ -potenciál sa meria pomocou metódy *electrophoresis light scattering* (ELS) alebo rozptyl svetla vplyvom elektroforézy. Táto metóda funguje na rovnakom princípe a zachytáva rovnaký (svetelný) signál ako dynamický rozptyl svetla ("Electrophoretic Light Scattering," 2005). Nanosuspenzia je vystavená elektrickému poľu, v ktorom nastáva pohyb elektricky nabitých častíc od jednej elektródy smerom k druhej. Rýchlosť pohybu častíc v elektrickom poli je závislá na sile elektrického poľa a intenzite náboja NP, tým pádom fluktuácia signálu

na detektore zodpovedá intenzite elektrického náboja NP. Obe tieto metódy je možné previesť na prístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern, United Kingdom).

### **6.3 Pomocné látky pri lyofilizácii nanočastíc**

Pomocné látky zvyšujú stabilitu formulácie počas lyofilizácie a taktiež zvyšujú stabilitu samotného lyofilizátu pri jeho skladovaní (Sadikoglu et al., 2006). Kryoprotekcia je ochrana NP počas mrazenia, napríklad pred stresom z ľadových kryštálov. Lyoprotektanty chránia NP pred stresom spôsobeným sušením počas lyofilizácie. Lyoprotektanty často plnia aj funkciu kryoprotektantov a naopak (Fonte et al., 2016). Ďalšou dôležitou skupinou pomocných látok sú štruktúrotvorné látky. Sú to inertné látky, ktoré pomáhajú vytvoriť štruktúru koláča a zabraňujú tak kolapsu lyofilizátu. Ich príkladom sú glycín, manitol a iné disacharidy. Práve disacharidy ako napríklad trehalóza alebo manitol sa často priemyselne používajú v lyofilizovaných formuláciách, nakoľko zastávajú funkciu štruktúrotvornej látky aj stabilizátoru (Sadikoglu et al., 2006). Ďalšími pomocnými látkami môžu byť pufry, ktoré zmiernujú zmeny pH počas mrazenia formulácie, čím ju opäť stabilizujú. V nespolednom rade sa ako pomocné látky používajú surfaktanty (Tween 60, PVA, poloxamér), ktoré pomáhajú NP stabilizovať nielen počas ich prípravy, ale aj počas lyofilizácie (Fonte et al., 2016) (Luo et al., 2021).

#### **6.3.1 Lyo- a kryoprotektanty**

Prvý krok lyofilizácie – mrazenie, kedy sa v suspenzii tvoria kryštáliky ľadu je kritickým bodom celého procesu z hľadiska stability NP. Stres je na NP vyvolávaný hneď niekoľkými mechanizmami. Počas mrznutia sa oddeľujú 2 fázy – ľad a kryokonzentovaná suspenzia (pozostávajúca z NP, lyo- a kryoprotektantov, voľnej látky, surfaktantov). Kryokonzentovaná suspenzia sa kvôli zvýšenej koncentrácii môže začať agregovať. Druhý typ stresu je vytváraný samotnými kryštálmi ľadu, ktoré mechanicky poškodzujú a destabilizujú štruktúru NP. Aditívny stres na NP je vytváraný aj vo fáze sekundárneho sušenia. Počas neho sa vyparujú molekuly nezamrznutej vody, ktorá bola naviazaná vodíkovými väzbami na povrchu NP a tým dochádza k ich agregácii a kolapsu (Allison et al., 2000). Aby sa predišlo agregácii alebo kolapsu NP počas mrazenia, tak sa do nanosuspenzie pridávajú kryoprotektanty. Protektívny charakter kryoprotektantov je vysvetľovaný dvomi teóriami – teóriou vitifikácie a teóriou izolácie NP. V prvom prípade sa predpokladá, že kryoprotektanty vďaka ich vyššej a špecifickej  $T_g$  tvoria okolo NP počas mrazenia ochrannú sklovitú vrstvu, tzv. sklovitý matrix, čím ich znehybňujú, stabilizujú a chránia pred mechanickým stresom (Allison et al., 2000). Druhá teória vysvetľuje stabilizáciu NP tým, že kryoprotektanty obkolesujú a tým pádom izolujú jednotlivé NP ešte v nezamrznutom stave koloidnej suspenzie, čím ich sféricky izolujú a zabraňujú ich agregácii počas mrazenia (Allison et al., 2000). Stabilizačný efekt lyoprotektantov je vysvetľovaný hypotézou náhrady vody. Hypotéza náhrady vody vraví, že lyoprotektanty vytvárajú vodíkové väzby s hydrofilnými skupinami surfaktantov, ktoré sú naviazané na povrchu NP. Takto redukujú stres tvorený na NP počas sekundárneho sušenia a tým ich stabilizujú (Luo et al., 2021).

### 6.3.2 Typy lyo- a kryoprotektantov

Najčastejšie sa ako lyoprotektanty používajú cukry, či už monosacharidy alebo polysacharidy, aminokyseliny, napríklad glycín a niektoré polyméry ako PVA, PVP alebo PEG. Ako cukry sa používajú glukóza, sacharóza, trehalóza, manitol, sorbitol, maltóza či laktóza (Fonte et al., 2016). Trehalóza ponúka výhody oproti ostatným cukrom, pretože nevytvára intramolekulárne vodíkové väzby, vďaka čomu môže flexibilnejšie tvoriť vodíkové mostíky s NP. Taktiež je menej hygroskopická, v porovnaní s ostatnými disacharidmi má vyššiu  $T_g$ , nízku chemickú reaktivitu a zastáva funkciu štruktúrotvornej látky (Crowe et al., 1996). Okrem iných kvalitatívnych parametrov ovplyvňuje stabilizačný efekt lyoprotektantov aj ich kvantitatívny parameter – ich koncentrácia. Stabilizačný efekt rastie spolu s rastúcou koncentráciou lyoprotektantov do istého bodu (stabilizačný limit), kedy už vysoká koncentrácia lyoprotektantov destabilizuje NP a indukuje ich agregáciu (Fonte et al., 2016).

## **7. EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ**

### ***7.1 Materiál a technické vybavenie***

#### **7.1.1 Chemikálie**

PLGA 75/25, Purasorb® PDLG 5002A (Corbion, Amsterdam, Holandsko)

Poloxamer 407, Pluronic-F127 (Merck)

Acetón (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)

Čistená voda (FaF UK HK)

D-(+)-trehalóza (Merck)

Sorbitol, Neosorb P 60W (Roquette, Francúzsko)

Xylitol, Xylisorb 300 (Roquette, Francúzsko)

Dextrán, Mr  $\approx$  40 000 (Merck)

Glycín (Merck, Praha, ČR)

### 7.1.2 Prístroje

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

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

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

Pipety Finnpiquette F2, Thermo Fischer Scientific (Thermo Fischer Scientific, USA)

Trepačka Multi-Vortex V-32 (Biosan, Riga, Litva)

Multifunkčná chladená centrifuga MPW 260R, MPW Medical Instruments (Varšava, Poľsko)

Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Panalytical, Malvern, Spojené Kráľovstvo)<sup>1</sup>

Lyofilizátor FreeZone Triad 7940010 (LABCONCO, Kansas, USA)

Mraziak Vestfrost BSFS 290 (Dánsko)

---

<sup>1</sup> Maximálny merný limit veľkosti je 10 µm (*Zetasizer Nano S and ZS Specifications DLS Maximum Size Limit 10.0 (d.Mm)*, 2012)

## **7.2 Metódy**

### **7.2.1 Príprava nanočastíc**

Pre prípravu NP metódou nanoprecipitácie je zmiešaná organická fáza, ktorú predstavuje 3 % roztok PLGA 75/25 v acetóne s 0,1 % vodným roztokom Poloxameru 407 za vzniku koloidnej nanosuspenzie. Organická fáza je pridávaná do vodnej fázy za stáleho miešania v pomere 1:10. Ihneď po pridaní organickej fázy do vodnej dôjde k vytvoreniu opalescencie, čo je prievodným javom vytvorenia koloidných častíc. Príprava NP prebieha v digestore. Koloidná nanosuspenzia je ponechaná v digestore na 1,5 hodiny za účelom odparenia acetónu.

Pri tejto fáze prípravy NP je vždy používaná 50 ml kadička z dôvodu veľkosti plochy dna kadičky. Čím je plocha hladiny (a dna kadičky) väčšia, tým rýchlejšie sa môže acetón odparovať.

### **7.2.2 Čistenie nanočastíc**

Po odparení acetónu je koloidná nanosuspenzia doplnená destilovanou vodou na pôvodný objem vodnej fázy, kvantitatívne prenesená a alikvótno rozdelená po 1 ml do 2 ml centrifugačných skúmaviek typu Eppendorf. Takto rozdelená nanosuspenzia je očistená dvoma cyklami centrifugácie – 10 000 RCF na 15 minút, následne 8 000 RCF na 15 minút. Po prvom cykle centrifugácie je po odobratí supernatantu peleta resuspendovaná 1 ml destilovanej vody. Po druhom cykle centrifugácie je peleta resuspendovaná 1 ml roztoku lyoprotektantu príslušnej koncentrácie. Druhý cyklus centrifugácie je prevádzaný na nižších otáčkach, pretože sa po prvom cykle odstraňuje spolu so supernatantom aj surfaktant, ktorý znižuje riziko vzniku neroztrepatel'ného sedimentu.

Z každej dávky pripravovaných NP sú odoberané vzorky, ktoré sú merané na Zetasizeri pre neskoršie porovnanie sledovaných parametrov pred a po lyofilizácii - veľkosť častíc, PDI a  $\zeta$ -potenciál.

### **7.2.3 Príprava rozokov lyoprotektantov**

Roztoky lyoprotektantov sú pripravované v 1 %, 2 %, 5 % alebo 10 % koncentráciách. Pripravené navážky jednotlivých lyoprotektantov sú rozpustené v dopočítanom množstve destilovanej vody za dosiahnutia príslušnej koncentrácie.

## 7.2.4 Lyofilizácia

Lyofilizačný cyklus je nastavený na nasledovné parametre:

**Tab. 1 Lyofilizačný cyklus**

Krok	Rýchlosť zmeny teploty (°C/min)	Teplota police (°C)	Čas (hh:mm)	Vákuum ( Pa )
1	-	-70	2:00	-
2	0,5	-50	3:00	0
3	0,5	-30	3:00	0
4	0,5	-15	3:00	0
5	1	0	2:00	50
6	1	20	5:00	80

V tabulke 1 je vyznačené trvanie jednotlivých krokov lyofilizácie, teplota lyofilizačnej police a rýchlosť zmeny tejto teploty a tlak v lyofilizačnej komore. Počas kroku 1 nastáva schladzovanie lyofilizačnej police na  $-70\text{ °C}$  a súbežné mrznutie vzoriek na polici v atmosférickom tlaku. Teplotu  $-70\text{ °C}$  si polica drží 2 hodiny a následne stúpne jej teplota na  $-50\text{ °C}$  za vzniku vákua v lyofilizačnej komore. Krokom 2 začína primárne sušenie. Vplyvom vákua nastáva sublimácia zamrzutej vody vo vzorkách. Kroky 2-4 popisujú ako stúpa teplota police v trojhodinových intervaloch až na  $-15\text{ °C}$  za stálej prítomnosti vákua. Kroky 5-6 predstavujú sekundárne sušenie, kedy stúpa teplota police na  $20\text{ °C}$  za stálej prítomnosti zníženého tlaku. V takomto prostredí nastáva odparovanie zvyškovej vody.

Skúmavky so vzorkami sú po vložení do lyofilizátoru otvorené, aby bol umožnený únik sublimovaného ľadu počas lyofilizácie. Vzorky sú uložené v stojane bez bázy, v ktorom stoja tak, že sa dno skúmaviek dotýka povrchu lyofilizačnej police. Lyofilizácia je prevádzaná v dvoch rôznych spôsoboch, a to konkrétne pomalom a rýchlym mrazením. V prípade pomalého mrazenia sú do lyofilizátoru vzorky ukladané krátko po zapnutí cyklu, pri laboratórnej teplote ( $20\text{--}25\text{ °C}$ ) lyofilizačnej police. Počas pomalého mrazenia sa pripravené NP pomaly schladzujú a proces mrznutia je postupný. Pri metóde rýchleho mrazenia sú vzorky ukladané na lyofilizačnú policu o teplote  $-50\text{ °C}$  až  $-70\text{ °C}$ . Po vložení na policu vzorky začnú rýchlo mrznúť prostredníctvom kontaktu s podchladenou policou. Po skončení lyofilizačného cyklu sú skúmavky so vzorkami ihneď po otvorení dvierok lyofilizátoru opätovne pozatvárané, aby bol zamedzený prístup vzdušnej vlhkosti, ktorá by mohla negatívne ovplyvňovať kvalitatívne parametre a stabilitu NP.

## 7.2.5 Rekonštitúcia lyofilizátu

Po skončení lyofilizačného cyklu a uzavretí skúmaviek je skúmaná doba a kvalita rekonštitúcie lyofilizovaných koláčov. Do skúmaviek s lyofilizovanými NP je pridaný 1 ml čistenej vody. Je meraný čas, za ktorý sa z koláču stane po pridaní čistenej vody homogénna suspenzia, či ostávajú prítomné nerozpustené časti lyofilizátu a či je potrebné rekonštitúciu



dopomôcť mechanickým premiešaním na trepačke Vortex. Čas rekonštitúcie je rozdelený do štyroch pomyselných skupín: okamžitá rekonštitúcia, rekonštitúcia kratšia ako jedna minúta, rekonštitúcia dlhšia ako jedna minúta a rekonštitúcia za potreby trepačky. Za ideálne sú považované vzorky schopné dokonalej rekonštitúcie hneď, prípadne do jednej minúty bez potreby premiešania trepačkou Vortex.

### **7.2.6 Meranie kvalitatívnych parametrov nanočastíc**

Kvalitatívne parametre nanočastíc, ktoré predstavujú veľkosť častíc, PDI a  $\zeta$ -potenciál sú merané na prístroji Zetasizer Nano ZS 90. Z rekonštituovaných (a prípadne zhomogenizovaných) vzoriek je pomocou pipety prenesených 200  $\mu$ l do kyvety. Kyveta je doplnená do troch štvrtín čistenou vodou a je prevedené meranie. Pri meraní  $\zeta$ -potenciálu je pomocou striekačky presený roztok z kyvety do skladanej kapilárnej kyvety na meranie  $\zeta$ -potenciálu. Optimálna hodnota veľkosti častíc je do a vrátane 200 nm, PDI do 0,2. Hodnota  $\zeta$ -potenciálu je používaná len ako kontrolná hodnota, ktorá môže indikovať odchylku v zložení NP. Hodnota  $\zeta$ -potenciálu sa pohybuje v rozmedzí – 10 mV až – 50 mV.

### **7.2.7 Skladovanie nanočastíc v stabilitej štúdiu**

NP lyofilizované s 5 % a 10 % trehalózou a 5 % a 10 % sorbitolom sú sledované aj v tretej časti experimentu, ktorá predstavuje malú stabilitnú štúdiu vzorkov pri skladovaní v rôznych teplotách. Osobitne sú skladované a merané NP, ktoré sú lyofilizované s použitím pomalého alebo rýchleho mrazenia. Prvá časť vzoriek je skladovaná v chladničke s teplotou 2–8 °C, druhá v mraziaku s teplotou – 20 °C a tretia v laboratórnom mraziaku s – 70 °C. Vzorky sú sledované po dobu 12 týždňov pričom meranie prebieha približne každé dva týždne. Z toho vyplýva 6 bodov merania. V prípade vzoriek, ktoré sú pripravené rýchlym mrazením je len 5 bodov merania v priebehu 10 týždňov (z dôvodu pochybenia ľudského faktoru).

## 8. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celý projekt je rozdelený do troch úsekov:

- 1) práca s 5 lyoprotektantami ako iniciálnymi adeptami,
- 2) výber vhodných koncentrácií lyoprotektantov na základe výsledkov z prvej fázy,
- 3) stabilitná štúdia s lyoprotektantami druhého úseku projektu.

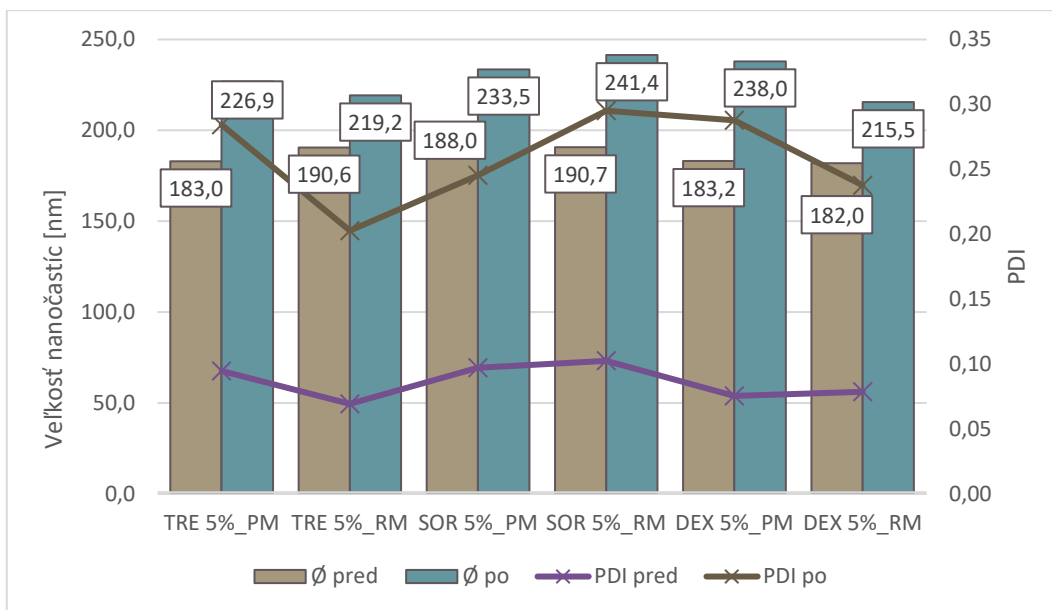
Ako lyoprotektanty počas lyofilizácie v prvom úseku sú použité trehalóza, sorbitol, glycín, xylitol a dextrans. Tieto lyoprotektanty boli vybrané kvôli ich využitiu pri lyofilizácii, výskyte v literárnej rešerši publikácií zaoberajúcimi sa lyofilizáciou PLGA NP a s ohľadom na dostupnosť v našom laboratóriu (Fonte et al., 2016).

### **8.1 Vplyv rôznych lyoprotektantov**

V prvej časti experimentu sú testované trehalóza, sorbitol, glycín, xylitol a dextrans v 5 % koncentráciách. Výsledok pre každý lyoprotektant pozostáva z dvoch nezávislých replikátov, každý nezávislý replikát obsahuje tri technické replikáty.

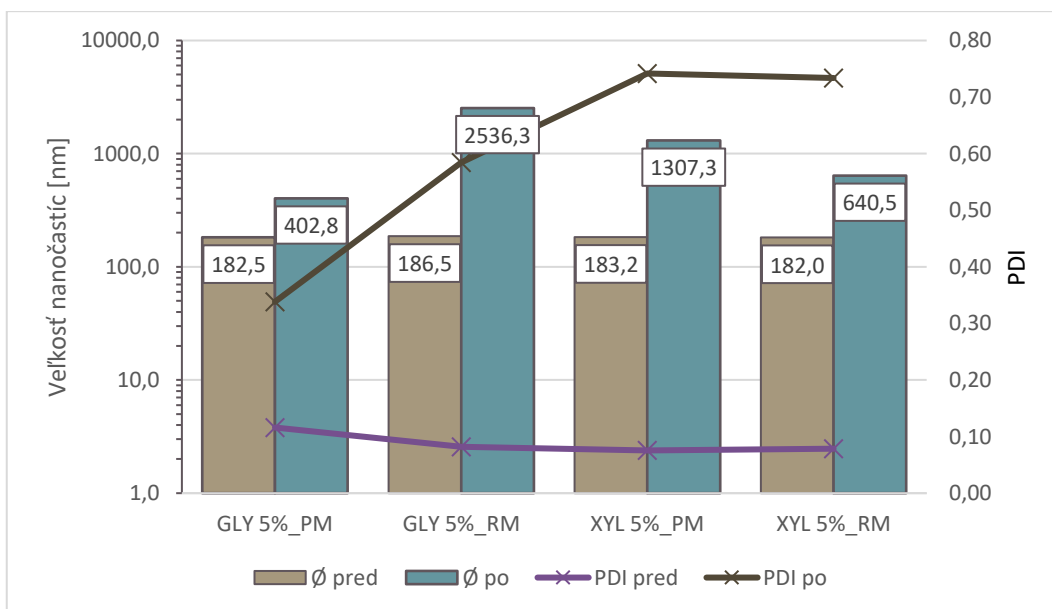
Na konci prvej časti projektu je taktiež prevedená stabilitná skúška, počas ktorej sa pripravené nanosuspensie s kryo- a lyoprotektantami skladovali ešte v tekutom stave pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V dvojtýždňových intervaloch je meraná veľkosť NP, PDI a  $\zeta$ -potenciál po dobu 16 týždňov.

Výsledky porovnania veľkosti NP pred lyofilizáciou a po nej sú uvedené v grafe 1 a 2. V grafoch 3 a 4 sú zobrazené výsledky porovnávajúce vplyv rýchlosti mrazenia na výsledné charakteristiky lyofilizovaných NP. Na obrázku 5 je zobrazený vzťah lyofilizovaných NP a ich prípadný skolabovaný alebo neskolabovaný charakter.



**Graf 1. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s trehalózou, sorbitolom a dextránom**

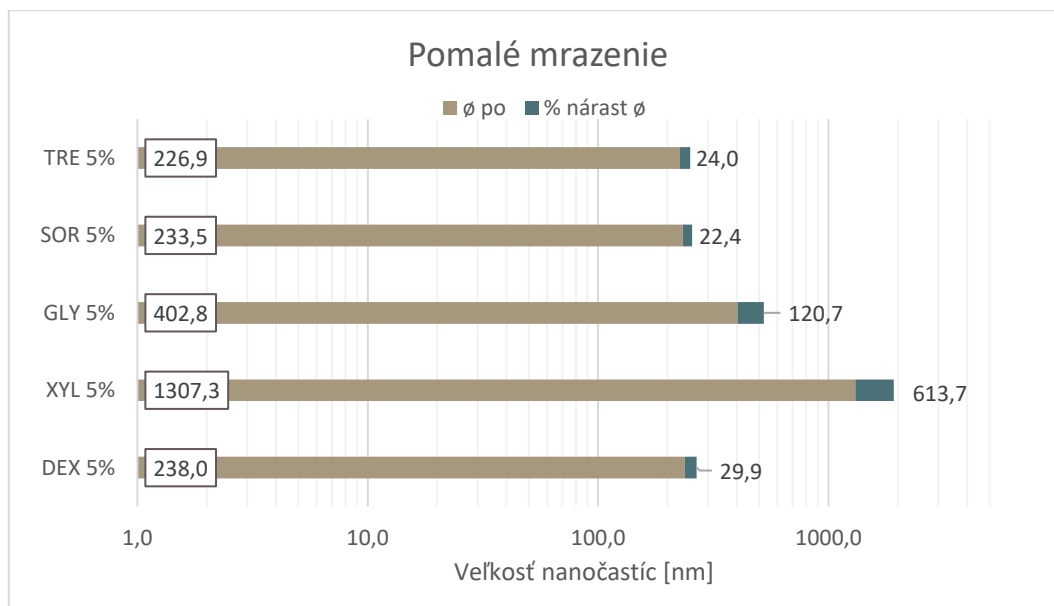
V grafe 1 stĺpce predstavujú veľkosť NP pred a po lyofilizácii, farebné línie označujú PDI pred a po lyofilizácii. PM znamená pomalé mrazenie, RM znamená rýchle mrazenie. Tieto pojmy sú vysvetlené v sekcii 6.1.5 Rýchle a pomalé mrazenie. Ø znamená priemer NP. Na grafe vidno, že NP pred lyofilizáciou majú vo všetkých prípadoch veľkosť do 200 nm a PDI do 0,2. Najmenší nárast NP má dextrán 5 % pri rýchlom mrazení s veľkosťou 215,5 nm (PDI = 0,24) po lyofilizácii a trehalóza 5 %. V prípade 5 % trehalózy aj dextránu nastáva menší nárast NP pri rýchlom mrazení.



**Graf 2. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s glycínom a xylitolom**

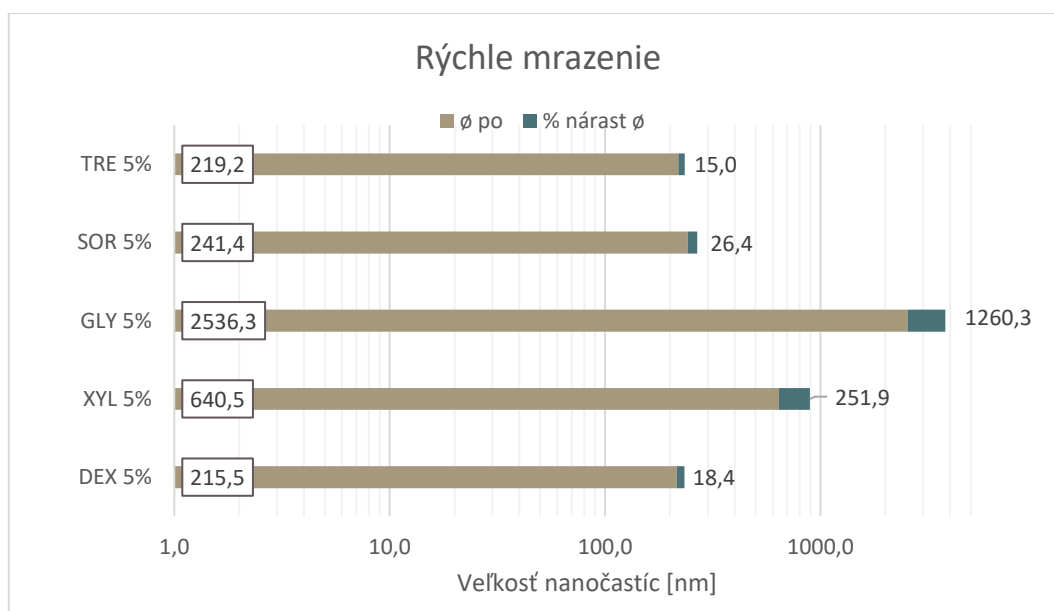
V grafe 2 je hlavná os y logaritmická kvôli veľkému nárastu veľkosti NP po lyofilizácii s glycínom aj xylitolom. NP s 5 % glycínom aj xylitolom sa po lyofilizácii agregujú za tvorby zhlukov až v mikrometrovej mierke. Prítomnosť zhlukov NP je viditeľná aj na vysokom PDI po lyofilizácii, ktoré v prípade xylitolu 5 % pri pomalom mrazení dosahuje až 0,74.

Pri porovnaní grafov 1 a 2 je na prvý pohľad badateľné, že glycín 5 % a xylitol 5 % neposkytujú dostatočnú kryo- a lyoprotekciu pri pomalom ani rýchlom mrazení. Veľkosť NP s týmito lyoprotektantami sa po lyofilizácii značne zvýšila. Trehalóza, sorbitol a dextrans (graf 1) poskytujú v 5 % koncentráciách podobnú úroveň kryo- a lyoprotekcie.



**Graf 3. Percentuálny nárast veľkosti nanočastíc po lyofilizácii pri pomalom mrazení**

V grafe 3 sa v báze riadkov na ľavej strane nachádza veľkosť NP po lyofilizácii, na pravom konci riadkov grafu je zobrazenie percentuálneho nárastu veľkosti NP v porovnaní s ich veľkosťou pred lyofilizáciou. Pri pomalom mrazení majú najmenší nárast NP lyofilizované s 5 % sorbitolom a 5 % trehalózou. Prijateľný nárast a veľkosť dosahujú aj NP s 5 % dextransom. Neprijateľné výsledky sú v prípade 5 % glycínu a xylitolu.



**Graf 4. Percentuálny nárast vo veľkosti nanočastíc po lyofilizácii pri rýchlom mrazení**

V grafe 4 vidíme, že pri rýchlom mrazení majú najmenší nárast NP lyofilizované s 5 % trehalózou, hneď za nimi 5 % dextransom a 5 % sorbitolom. NP s glycinom a xylitolom 5 % opäť výrazne narástli kvôli tvorbe agregátov NP.

Pri porovnaní výsledkov nárastu veľkosti NP pri pomalom a rýchlom mrazení (graf 3 a 4) vidíme, že v oboch prípadoch poskytujú neprijateľné výsledky NP s 5 % xylitolom a glycinom. NP s trehalózou, sorbitolom a dextransom v 5 % koncentráciách poskytovali pri pomalom a rýchlom mrazení prijateľné výsledky s percentuálnym nárastom 24,0 %, 22,4 %, 29,9 %, resp. 15,0 %, 26,4 % a 18,4 %.



**Obr. 2 Lyofilizované koláče nanočastíc s lyoprotektantami**

Na obrázku 2 sú lyofilizované vzorky nanočastíc s lyoprotektantami – trehalóza, sorbitol, glycín, xylitol a dextransom v poradí zľava doprava (v triplikátoch). Vzorky na obrázku sú pripravené lyofilizáciou pri rýchlom mrazení.

Po lyofilizácii sa koláče rekonštituuju čistou vodou, pričom je meraný čas od momentu pridania vody do úplnej rekonštitúcie. Trehalóza 5 % tvorí pomerne ucelený koláč, ktorý sa zrekonštituuje na homogénnu nanosuspenziu do jednej minúty. Sorbitol tvorí neesteticky vyzerajúci koláč, no aj napriek tomu poskytuje rýchlu rekonštitúciu do jednej minúty. Glycín

a dextrán tvoria vizuálne pekné a nekolabované lyofilizáty/ koláče a poskytujú okamžitú rekonštitúciu na homogénnu nanosuspenziu. Nanosuspenzia s 5 % roztokom xylitolu počas lyofilizácie kolabuje a tvorí lyofilizát, ktorý sa homogénne zrekonštituuje len s pomocou miešania na miešačke Vortex.

Prekvapujúca je absencia korelácie medzi štruktúrou/integritou lyofilizovaného koláču a veľkosťou NP po lyofilizácii. Napríklad NP s 5 % glycinom poskytujú štruktúrne ucelený a pekný koláč, ktorý sa prakticky okamžite rekonštituuje, no napriek tomu je veľkosť NP po lyofilizácii oveľa väčšia ako pred lyofilizáciou. To naznačuje možnú agregáciu NP v priebehu mrazenia alebo rekonštitúcie. Naopak NP s 5 % trehalózou a sorbitolom, ktoré na pohľad poskytujú nepekné, nejednotné a čiastočne skolabované lyofilizované koláče majú po lyofilizácii najmenší nárast vo veľkosti zo všetkých testovaných vzoriek (graf 3 a 4). NP s 5 % xylitolom sú viditeľne kolabované, s čím v tomto prípade korelujú aj výsledky merania veľkosti NP po lyofilizácii. Veľkosť NP s xylitolom nárastla až o 613,7 % voči pôvodnej veľkosti pred lyofilizáciou. Vzorky NP s dextránom poskytovali veľmi pekný, homogénny lyofilizovaný koláč. Veľkosť NP s 5 % dextránom sa po lyofilizácii zväčšila o 18,4 % pri rýchlom mrazení a 29,9 % pri pomalom mrazení.

**Tab. 2 Výsledky prvej fázy projektu**

V tabuľke 2 vidíme súhrnné údaje o zmene veľkosti NP a PDI pred a po lyofilizácii s 5 % roztokmi lyoprotektantov. Výsledky predstavujú priemer hodnôt z dvoch nezávislých a troch technických replikátov.

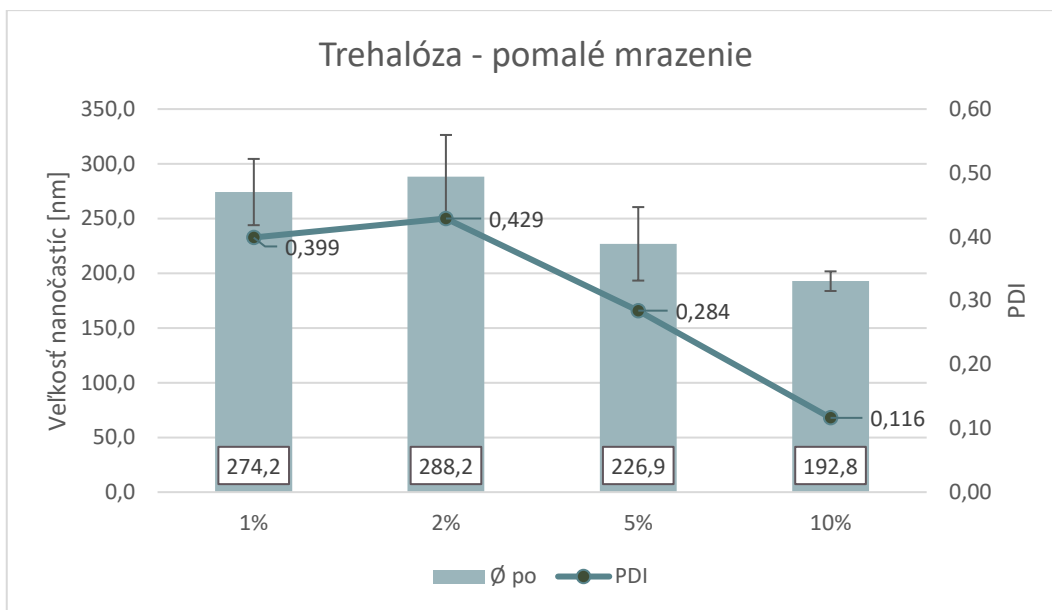
	Ø pred [nm]	Ø po [nm]	PDI pred	PDI po
TRE 5%_PM	183,0	226,9	0,09	0,28
TRE 5%_RM	190,6	219,2	0,07	0,20
SOR 5%_PM	190,8	233,5	0,10	0,25
SOR 5%_RM	191,0	241,4	0,09	0,30
DEX 5%_PM	183,2	238,0	0,08	0,29
DEX 5%_RM	182,0	215,5	0,08	0,24
GLY 5%_PM	182,5	402,8	0,12	0,34
GLY 5%_RM	186,5	2536,3	0,08	0,58
XYL 5%_PM	183,2	1307,3	0,08	0,74
XYL 5%_RM	182,0	640,5	0,08	0,73

Na základe výsledkov z prvej časti tohto projektu (tab. 2) boli do druhej časti projektu ako lyoprotektanty vybrané 5 % trehalóza a 5 % sorbitol.

## **8.2 Rôzne koncentrácie lyoprotektantov**

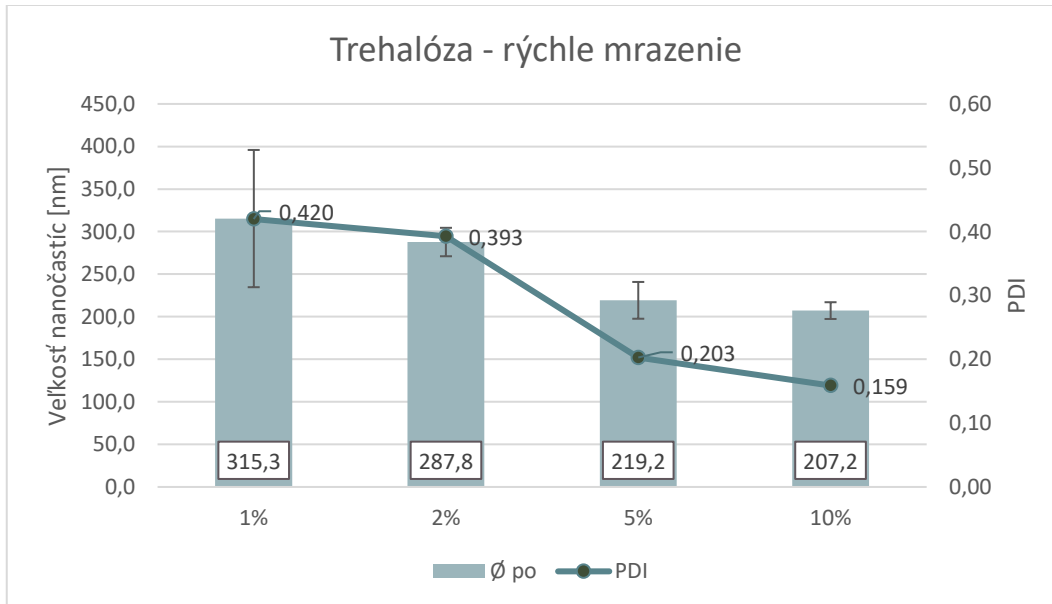
Na základe výsledkov z prvej časti experimentu boli za najvhodnejšie lyoprotektanty s ohľadom na sledované parametre (veľkosť NP, PDI a čas rekonštitúcie) vybraní dvaja adepti a to trehalóza a sorbitol. V druhej časti experimentu sú pripravené 1 %, 2 %, 5 % a 10 % koncentrácie trehalózy a sorbitolu. Výsledky pozostávajú z troch nezávislých replikátov, každý nezávislý replikát z troch technických replikátov.

Výsledné charakteristiky NP lyofilizovaných s rôznymi koncentraciami trehalózy pri pomalom aj rýchlom mrazení sú zobrazené na grafoch 5 a 6. Na grafoch 7 a 8 sú zobrazené výsledky po lyofilizácii NP s rôznymi koncentraciami sorbitolu pri pomalom aj rýchlom mrazení. Porovnanie vplyvu rýchlosti mrazenia počas lyofilizácie na granulometrické charakteristiky NP je zobrazené na grafoch 9 a 10. Na obrázkoch 3 a 4 je zachytený vzhľad lyofilizátov v rámci tohto úseku projektu, pri pomalom aj rýchlom mrazení.



**Graf 5. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s trehalózou pri pomalom mrazení**

Na grafe 5 vidíme veľkosť NP po lyofilizácii s 1 %, 2 %, 5 % a 10 % roztokmi trehalózy, prvý krok lyofilizácie je prevedený spôsobom pomalého mrazenia. Veľkosť NP spolu s narastajúcou koncentráciou trehalózy klesá. Najväčšiu veľkosť dosahujú NP lyofilizované s 2 % roztokom trehalózy. Naopak najmenšiu veľkosť – 192,8 nm (PDI = 0,116) dosahujú NP lyofilizované s 10 % trehalózou.

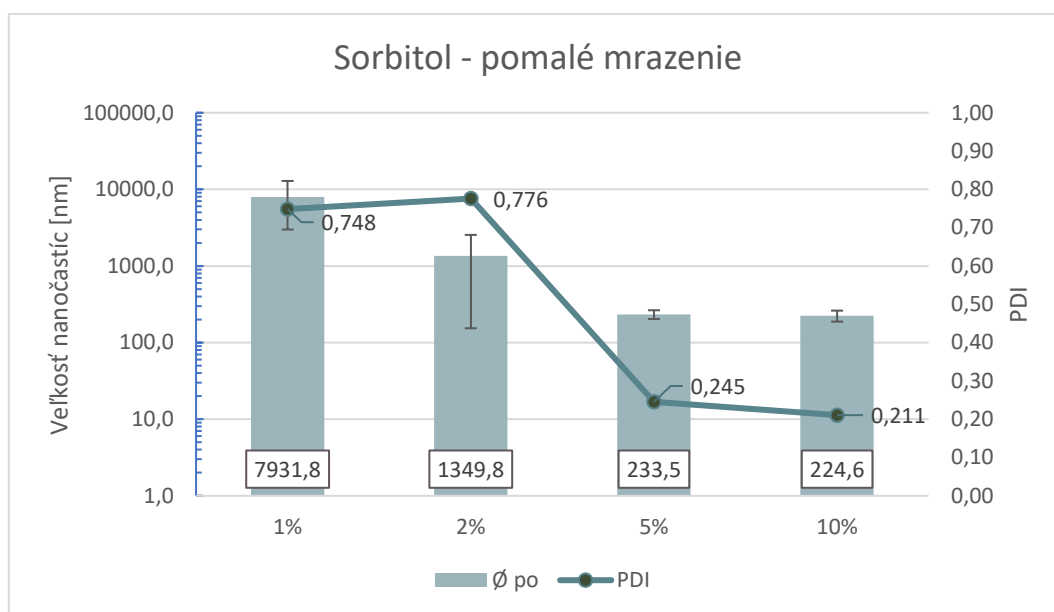


**Graf 6. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s trehalózou pri rýchlom mrazení**

Na grafe 6 je zobrazená veľkosť NP s rôznymi koncentraciami trehalózy lyofilizovaných pri rýchlom mrazení. Opäť sa opakuje vzťah nepriamej závislosti koncentrácie lyoprotektantu a konečnej veľkosti NP. Najmenšiu veľkosť dosahujú NP s 10 % trehalózou. Prijateľné výsledky poskytujú aj NP s 5 % trehalózou, ktoré dosahujú 219,2 nm (PDI = 0,203).

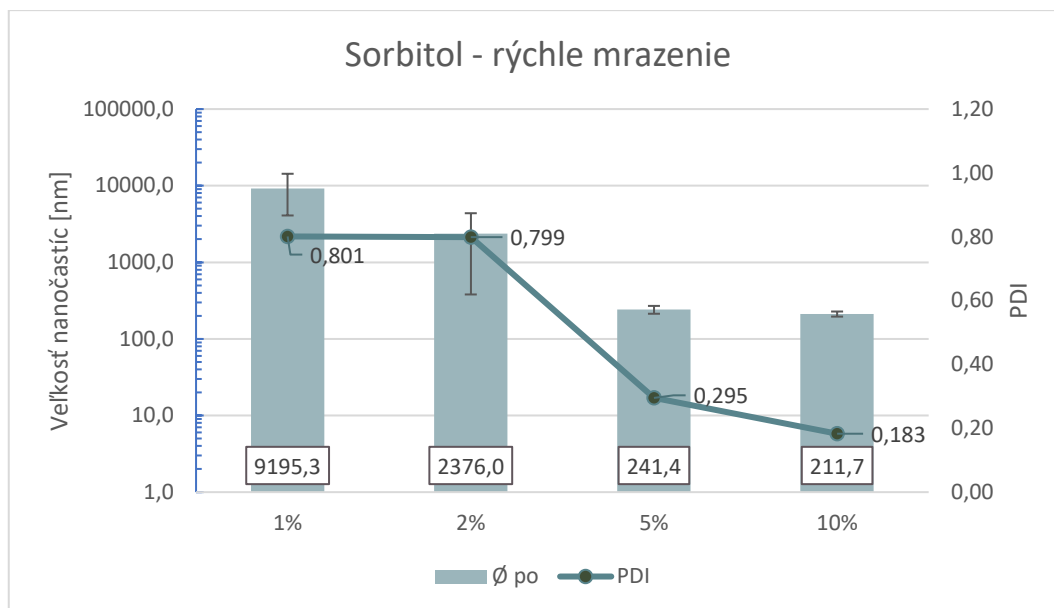


Z grafov 5 a 6 je viditeľné, že veľkosť NP po lyofilizácii klesá so stúpajúcou koncentráciou trehalózy. Najlepšie výsledky poskytuje v prípade pomalého aj rýchleho mrazenia 10 % trehalóza.



**Graf 7. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii so sorbitolom pri pomalom mrazení**

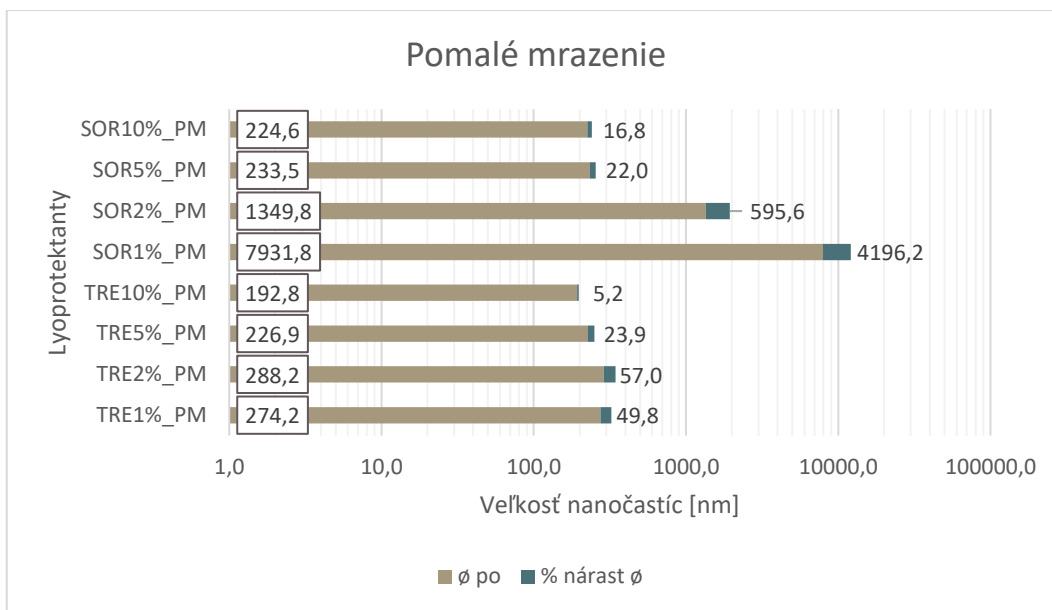
Na grafe 7 je hlavná os y logaritmická. Vidíme tendenciu klesajúcej veľkosti NP lyofilizovaných pri pomalom mrazení spolu s narastajúcou koncentráciou sorbitolu. Sorbitol 1 % neposkytuje dostatočnú kryo- a lyoprotekciu počas lyofilizácie a častice sa agregujú za vzniku zhluku veľkého až 7931,8 nm (PDI = 0,748). Najmenšie NP poskytuje sorbitol 10 % s veľkosťou 224,6 nm (PDI = 0,211) a na druhom mieste za ním je sorbitol 5 %.



**Graf 8. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii so sorbitolom pri rýchlom mrazení**

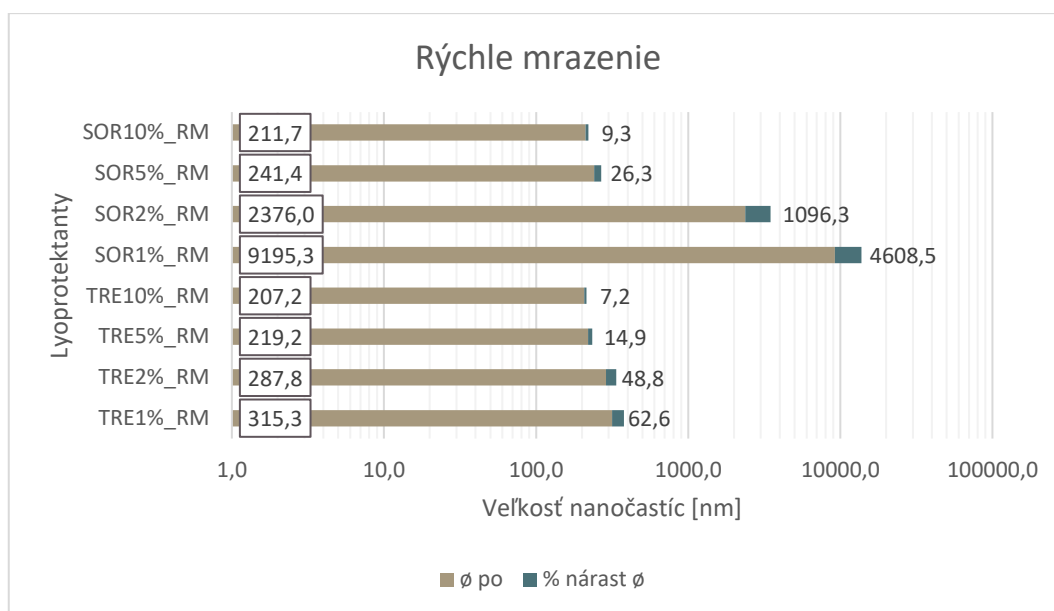
Na grafe 8 je hlavná os y označujúca veľkosť NP zobrazená logaritmicky, nakoľko lyofilizované NP so sorbitolom v nízkych koncentráciách dosahovali vysoké rozmery. Výsledky pre sorbitol sú podobné pri pomalom aj rýchlom mrazení, s najmenšou veľkosťou NP dosiahnutou pri použití 10 % roztoku sorbitolu ako kryo- a lyoprotektantu.

Pri lyofilizácii NP s trehalózou a sorbitolom sa opakuje tendencia klesajúcej veľkosti NP spolu so vzrastajúcou koncentráciou kryo- a lyoprotektantov pri pomalom aj rýchlom mrazení.



**Graf 9. Porovnanie nárastu veľkosti nanočastíc s použitím rôznych koncentrácií pri pomalom mrazení**

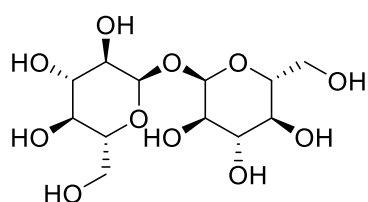
Na grafe 9 sa v báze riadkov na ľavej strane nachádza údaj o veľkosti NP po lyofilizácii a na konci riadkov je modrým pruhom vyznačený percentuálny nárast veľkosti NP v porovnaní s veľkosťou NP pred lyofilizáciou. Pri pomalom mrazení dosahuje 10 % trehalóza len 5,2 % nárast na 192,8 nm, nasleduje 10 % sorbitol s 16,8 % nárastom. NP s 5 % trehalózou a sorbitolom narástli podobne o 23,9 % a 22,0 % respektívne. NP s trehalózou 2 % a 1 % narastajú o približne polovicu, čo je už značný nárast. NP so sorbitolom 2 % a 1 % sa agregujú a dosahujú veľkosť v mikrometroch.



**Graf 10. Porovnanie nárastu veľkosti nanočastíc s použitím rôznych koncentrácií pri rýchlom mrazení**

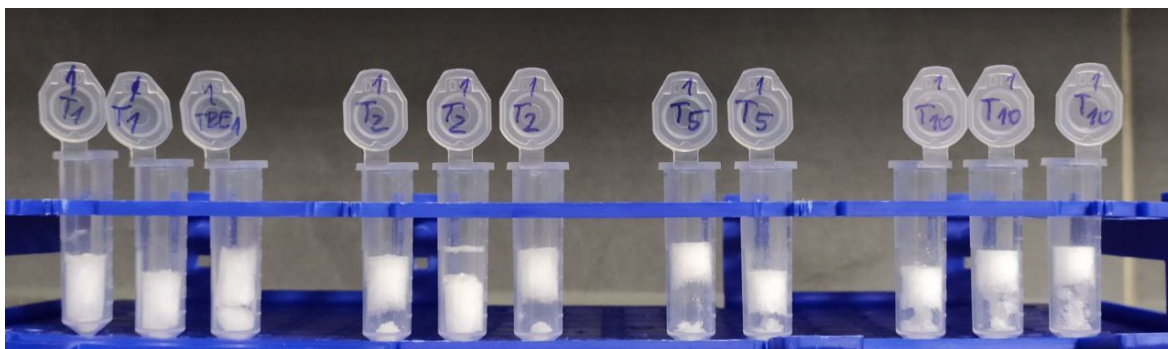
V grafe 10 zobrazujúcom nárast NP pri rýchlom mrazení sa principiálne opakujú výsledky z grafu 9 s pomalým mrazením. Najmenší nárast opäť dosahujú NP s 10 % trehalózou a 10 % sorbitolom s nárastom 7,2 % a 9,3 % respektívne. NP s 2 % a 1 % trehalózou narastajú približne o polovicu. NP s 2 % a 1 % sorbitolom sa agregujú a dosahujú veľkosť v tisícoch nanometrov.

Ako najefektívnejší lyoprotektant sa javí trehalóza 10 %. Pri pomalom a rýchlom mrazení narastá veľkosť NP s 10 % trehalózou o 5,2 % a 7,2 % respektívne, oproti veľkosti pred lyofilizáciou. Odôvodnení sa dá nájsť hneď niekoľko. Trehalóza má spomedzi používaných lyoprotektantov jednu z najvyšších Tg (Simperler et al., 2006). V molekule trehalózy (obr. 3) sa nachádza 8 donorov a 11 akceptorov vodíka, vďaka čomu je schopná tvoriť väzbu až s 10 molekulami vody (Branca et al., 1999).



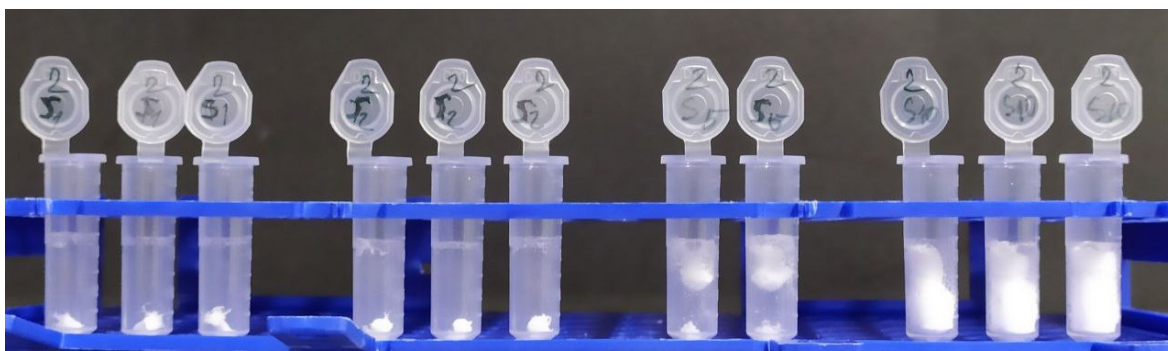
**Obr. 3 Molekula trehalózy**

Tie sa orientujú okolo molekuly trehalózy do hexagonálneho tvaru, čo ešte zvyšuje štruktúrotvorný efekt (Branca et al., 1999). Molekuly vody naviazané na trehalóze nepodliehajú kryštalizácii pod bodom mrazu, čo zvyšuje ochranu NP pred mechanickým stresom. Solocinski a kol. taktiež zistili, že trehalóza je schopná znižovať veľkosť kryštálov v závislosti od jej koncentrácie (Solocinski et al., 2017).



**Obr. 4 Koláče lyofilizovaných nanočastíc s trehalózou**

Na obr. 4 sú vzorky lyofilizovaných NP s trehalózou v koncentráciách 1 %, 2 %, 5 % a 10 % zoradené zľava doprava v tripletoch, s výnimkou 5 % trehalózy, ktorá je v duplikáte. Lyofilizáty s trehalózou vytvárajú relatívne pekné a štruktúrované koláče vo všetkých jej koncentráciách.



**Obr. 5 Koláče lyofilizovaných nanočastíc so sorbitolom**

Na obr. 5 sú vzorky lyofilizovaných NP so sorbitolom v koncentráciách 1 %, 2 %, 5 % a 10 % zoradené zľava doprava v tripletoch, s výnimkou 5 % sorbitolu, ktorý je v duplikáte. Lyofilizované koláče so sorbitolom vyzerajú nepekne, takmer skolabované v prípade 1 % a 2 % roztoku sorbitolu. Lyofilizát s 5 % sorbitolom už vytvára istú štruktúru. Koláče s 10 % sorbitolom majú peknú, ucelenú štruktúru.

Najlepšie výsledky v rámci testovania rôznych koncentrácií trehalózy a sorbitolu ako kryo- a lyoprotektantov pri lyofilizácii NP poskytuje trehalóza 10 % pri pomalom aj rýchlom mrazení. Vytvára pekné a ucelené koláče, ktoré sa ľahko a rýchlo rekonštituujú. Aj napriek tomu, že NP s 1 % a 2 % trehalózou vytvárajú po lyofilizácii štruktúrne celistvé a pekné koláče, narastá veľkosť týchto NP až o polovicu v porovnaní s veľkosťou pred lyofilizáciou. V prípade vzoriek so sorbitolom dosahujú najlepšie výsledky NP s 10 % roztokom sorbitolu. Tie vytvárajú aj štruktúrne ucelené koláče. NP s 5 % sorbitolom tvoria esteticky nie moc pekný koláč a ich veľkosť narastá pri pomalom a rýchlom mrazení o 22,0 % a 26,3 % respektívne. NP s 1 % a 2 % sorbitolom sú po lyofilizácii skolabované, čo odráža aj ich veľkosť, ktorá dosahuje v prípade rýchleho mrazenia až 4608,5 nm.

### **8.3 Stabilitná štúdia**

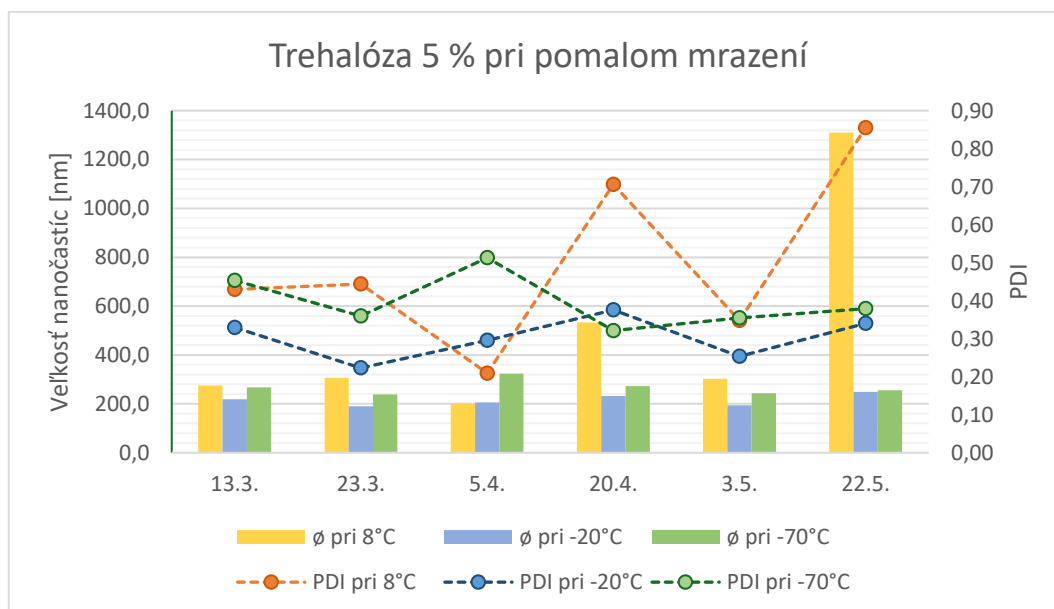
Okrem hlavných sledovaných parametrov – veľkosť NP a PDI sú v rámci stabilitej skúšky zaznamenané aj rýchlosť rekonštitúcie a prítomnosť neroztrepateľných hrčiek po priemiešaní na trepačke Vortex. Rýchlosť rekonštitúcie lyofilizátu je rozdelená do 4 skupín a to okamžitá rekonštitúcia, rekonštitúcia do jednej minúty, rekonštitúcia nad jednu minútu a rekonštitúcia s pomocou trepačky.

NP pripravované pri rýchlom a pri pomalom mrazení sú pripravované v osobitných lyofilizačných cykloch a pravidelné merania vzoriek prebiehajú v rozdielne dni. Pre vzorky pripravené lyofilizáciou pri pomalom mrazení je dostupných 6 bodov merania v priebehu dvanástich týždňov. Pre vzorky lyofilizované pri rýchlom mrazení je dostupných 5 bodov merania v rámci desiatich týždňov.

Grafy 11-14 zobrazujú výsledky stabilitej skúšky NP s trehalózou pri pomalom alebo rýchlom mrazení. Grafy 15-18 zobrazujú výsledky stability NP so sorbitolom lyofilizovaných pri pomalom alebo rýchlom mrazení.

### 8.3.1 Stabilita nanočastíc s trehalózou

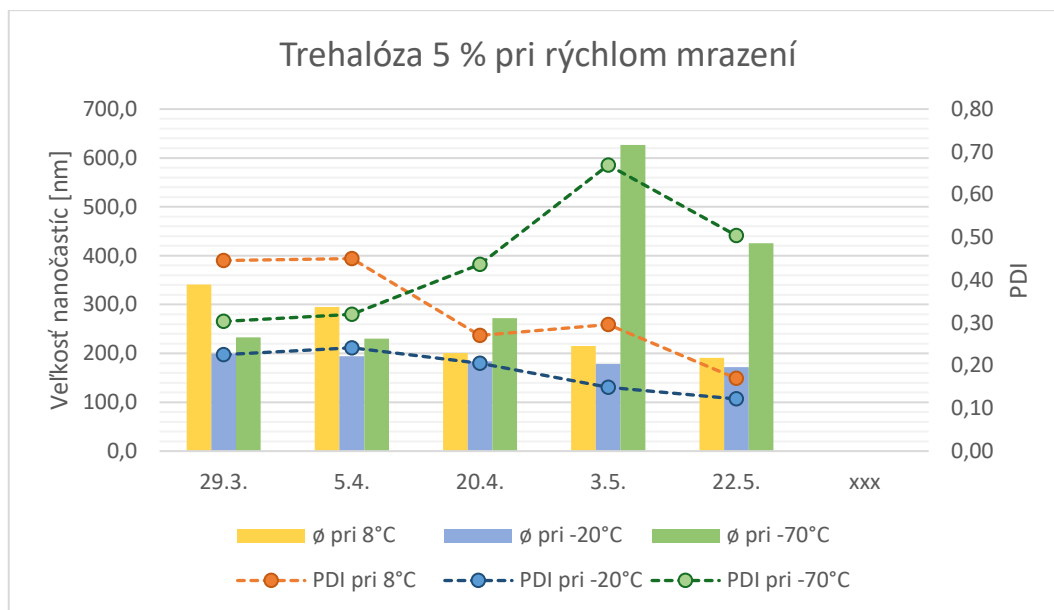
Výsledky granulometrických charakteristík NP lyofilizovaných s 5 % trehalózou spôsobom pomalého a rýchleho mrazenia a 10% trehalózou sú uvedené v grafoch 11 a 12 resp. 13 a 14. V rámci štúdie bol okrem vplyvu parametrov lyofilizácie sledovaný predovšetkým vplyv teploty skladovania.



**Graf 11. Stabilita nanočastíc s 5 % trehalózou pri pomalom mrazení**

Stĺpce na grafe 11 zobrazujú veľkosť NP v rôznych teplotných podmienkach v priebehu šiestich meraní. Čiarované farebné línie predstavujú zmenu PDI lyofilizovaných NP skladovaných v rôznych teplotných podmienkach.

V rámci kvalitatívneho hodnotenia rekonštitúcie prebieha rekonštitúcia vzorkov skladovaných v  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$  do jednej minúty a bez prítomnosti zhluku NP po premiešaní. Avšak v prípade NP skladovaných pri  $8^{\circ}\text{C}$  je potrebné ku rekonštitúcii použiť trepačku Vortex a v nanosuspenzii ostáva stále prítomná neroztrepateľná časť lyofilizátu. Tento neroztrepateľný zhluk NP alebo nedostatočné premiešanie po rekonštitúcii môže vysvetlovať veľkostný skok v rozmere NP po dvanástich týždňoch u NP skladovaných do  $8^{\circ}\text{C}$ . Veľkosť týchto NP sa po dvanástich týždňoch zvyšuje z pôvodných 275,27 nm (PDI = 0,430) až na 1310,43 nm (PDI = 0,855). Najnižšie hodnoty po 12 týždňoch majú NP skladované v  $-20^{\circ}\text{C}$  s maximálnou veľkosťou NP 249,13 nm (PDI = 0,341).

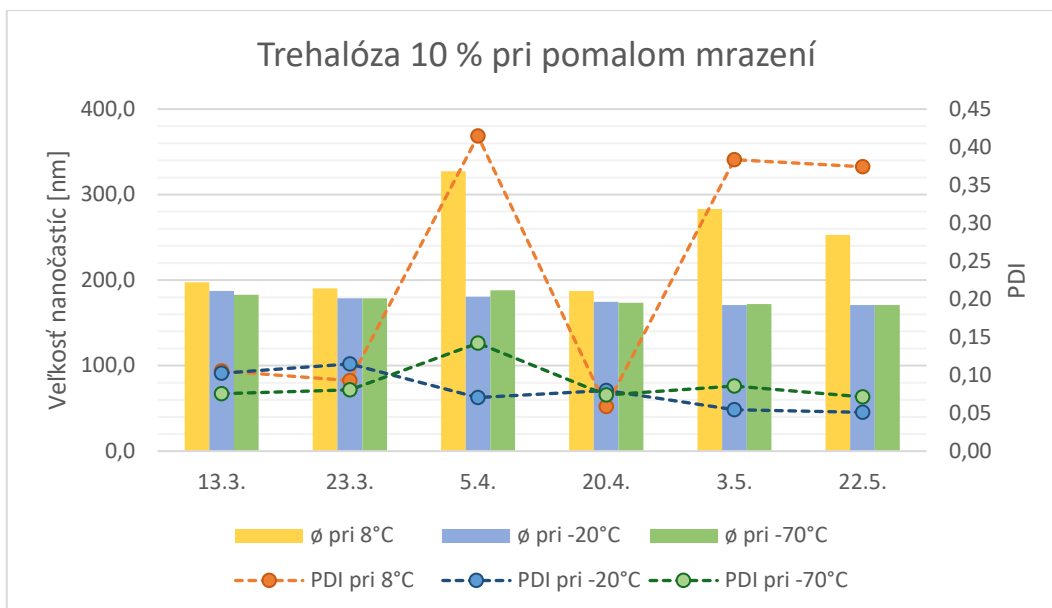


**Graf 12. Stabilita nanočastíc s 5 % trehalózou pri rýchlom mrazení**

Graf 12 zobrazuje podobné výsledky ako graf 11, ale NP sú lyofilizované s použitím rýchleho mrazenia počas prvého kroku lyofilizácie.

NP s trehalózou 5 % skladované v 8°C majú klesajúcu krivku veľkosti a PDI v čase. Možné vysvetlenie tohto javu je také, že prvé dva merania (v priebehu 4 týždňov) nie sú vzorky po vytiahnutí z chladničky ponechané dostatočne dlho v laboratórnej teplote, nestihnú sa vytemperovať a to ovplyvňuje kvalitu rekonštitúcie. Po týchto dvoch meraniach je nastolená fixná doba, 30-60 minút pre vzorky z chladničky, aby sa stihli vytemperovať. Vzorky vytiahnuté z -20 °C a -70 °C sú po vytiahnutí ponechané v laboratórnej teplote aspoň 1 hodinu. Takisto ako pri pomalom mrazení (graf 11), aj v prípade rýchleho mrazenia v prvom kroku lyofilizácie (graf 12) majú NP s 5 % trehalózou stabilnú a najnižšiu veľkosť keď sú skladované v -20 °C. Takisto rekonštitúcia prebieha do jednej minúty a bez prítomnosti agregátu NP. Rekonštitúcia vzoriek skladovaných v 8 °C a -20 °C prebieha do jednej minúty, bez prítomnosti agregátov. V prípade NP skladovaných pri -70 °C trvá rekonštitúcia síce menej ako minútu, ale je prítomný agregát NP aj po premiešaní, čo sa pravdepodobne odráža aj na grafe vo veľkosti aj PDI.

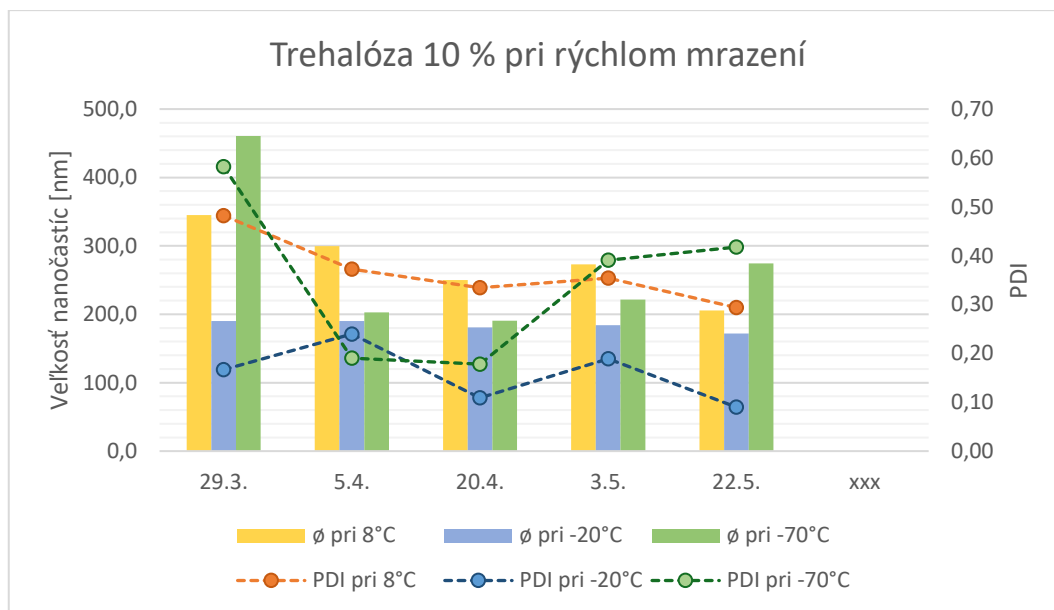




**Graf 13. Stabilita nanočastíc s 10 % trehalózou pri pomalom mrazení**

Graf 13 zobrazuje výsledky stabilitej skúšky NP lyofilizovaných pri pomalom mrazení. NP s 10 % trehalózou si udržiavajú stabilnú veľkosť do 200 nm v priebehu dvanástich týždňov, keď sú skladované v  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Vzorkám skladovaným v  $8^{\circ}\text{C}$  sa veľkosť aj PDI jemne zvyšuje, maximálne na 327,43 nm (PDI = 0,415).

Rekonštitúcia vzorkov skladovaných v  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$  prebieha do jednej minúty bez prítomnosti neroztrepatelných zhlukov NP. Pri skladovaní v  $8^{\circ}\text{C}$  veľkosť NP narastá až na 327,43 nm a ku rekonštitúcii je potrebné miešanie na trepačke, po ktorom stále ostáva v nanosuspenszii neroztrepatetelná časť lyofilizátu.



**Graf 14. Stabilita nanočastíc s 10 % trehalózou pri rýchlom mrazení**

Graf 14 zobrazuje výsledky skúšky stability NP s 10 % trehalózou pri rýchlom mrazení. Nemennú veľkosť pod 200 nm a PDI  $\leq 0,2$  si držia NP skladované v  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Na grafe 14 je viditeľná podobná tendencia klesajúcich hodnôt počas prvých dvoch meraní ako na grafe 12. Merania vzoriek lyofilizovaných pri rýchlom mrazení sú robené v ten istý deň a čas, preto považujem vyššie hodnoty veľkosti a PDI v prvých dvoch časových bodoch za možnú systematickú chybu. Pri použití rýchleho mrazenia NP s 10 % trehalózou majú stabilnú veľkosť NP skladované pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . NP skladované pri  $8^{\circ}\text{C}$  dosahujú veľkosť nad požadované parametre. Vyššie PDI taktiež poukazuje na polydisperzitu nanosuspenzie spôsobenú agregáciou NP. V prípade NP skladovaných v  $-70^{\circ}\text{C}$  sa okrem prvého merania veľkosť drží okolo 200 nm s tendenciou stúpať v čase, ale PDI taktiež naznačuje polydisperzné NP.

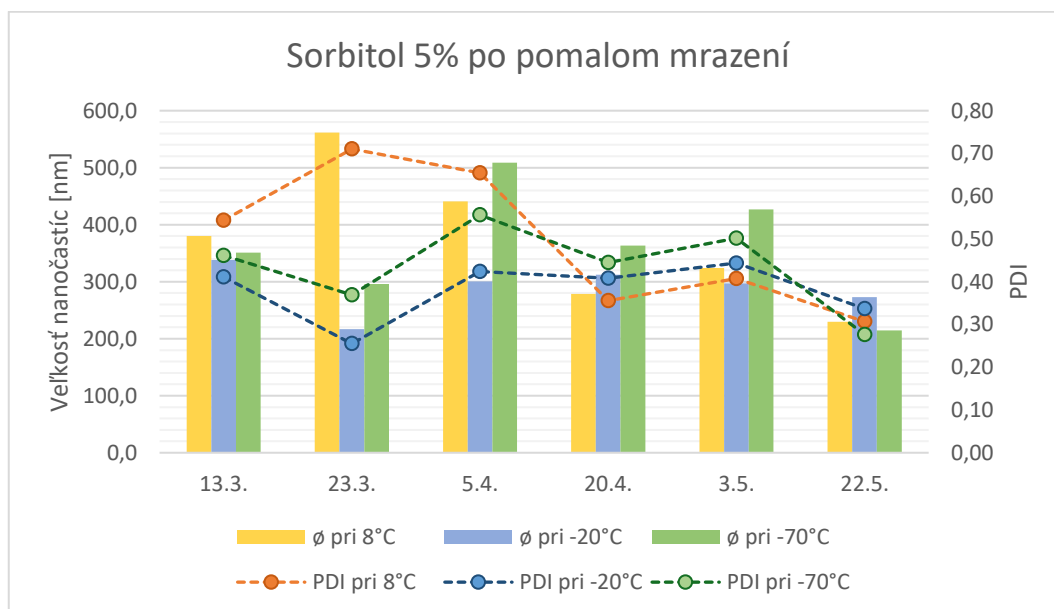
V niektorých prípadoch ostávajú po vybratí z chladničky/ mrazničky a rekonštitúcii vo vzorkách okom viditeľné zhluky. Pri lyofilizácii s pomalým mrazením ostávajú neroztrepateľné zhluky v len nanosuspenziách (s trehalózou 5 % a 10 %) skladovaných v  $8^{\circ}\text{C}$ . Pri vzorkách pripravených lyofilizáciou s rýchlym mrazením ostávajú neroztrepateľné zhluky v nanosuspenziách skladovaných v  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Zaujímavé je, že aj napriek prítomnosti neroztrepateľného zhluku napríklad v nanosuspenzii s 10 % trehalózou, ktorá bola lyofilizovaná rýchlym mrazením a skladovaná v  $-20^{\circ}\text{C}$  (graf 14), majú tieto NP aj po 10 týždňoch veľkosť len 171,9 nm (PDI = 0,090). Dá sa to odôvodniť tým, že sa pri prenose nanosuspenzie do kyvety nenasal daný zhluk NP do pipetovej špičky a tým pádom nemohol ovplyvniť meranie veľkosti a PDI.

Pri porovnaní skladovacích teplôt vidíme, že NP s trehalózou sú dlhodobo stabilné, keď sú skladované pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Rekonštitúcia týchto vzoriek nastáva vždy bez problému do jednej minúty, aj napriek tomu že v prípade 10 % trehalózy pri rýchlom mrazení ostáva v nanosuspenzii neroztrepateľný zhluk NP. Na druhom mieste je skladovanie v  $-70^{\circ}\text{C}$ , kde

v prípade skladovania NP s 10 % trehalózou ostáva veľkosť NP relatívne stabilná. V prípade rýchleho mrazenia je však tiež prítomný neroztrepatelný zhluk NP. Skladovanie NP v 8 °C poskytuje nekonzistentné výsledky. Dalo by sa to odôvodniť tým, že v nižšej teplote je nižšia vlhkosť vzduchu, ktorú by mohol absorbovať suchý, hygroskopický lyofilizát za tvorby hydratovaných, agregovaných NP.

### 8.3.2 Stabilita nanočastíc so sorbitolom

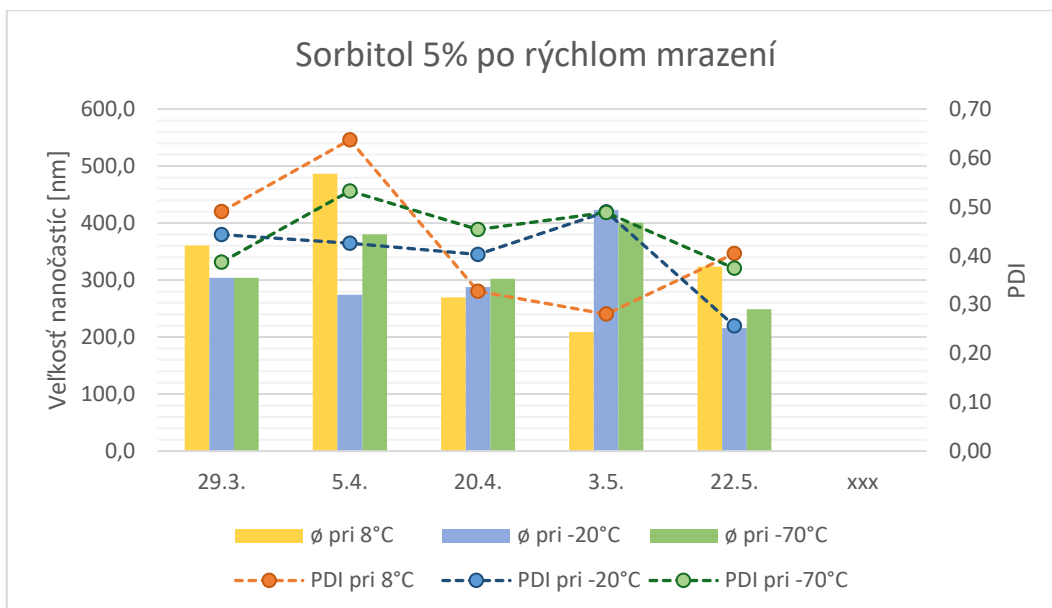
Výsledky granulometrických charakteristík NP lyofilizovaných s 5 % sorbitolom spôsobom pomalého a rýchleho mrazenia a 10% sorbitolom sú uvedené v grafoch 15 a 16 resp. 17 a 18. V rámci štúdie bol okrem vplyvu parametrov lyofilizácie sledovaný predovšetkým vplyv teploty skladovania.



**Graf 15. Stabilita nanočastíc s 5% sorbitolom pri pomalom mrazení**

Graf 15 zobrazuje stabilitu NP s 5 % sorbitolom, ktoré sú pripravené lyofilizáciou pri pomalom mrazení a skladované v troch rôznych teplotných podmienkach. Priemerná veľkosť skladovaných NP je väčšia ako sú stanovené limity (veľkosť 200 nm, PDI = 0,2). Aj napriek tomu nemajú namerané hodnoty tendenciu rásť v čase. V poslednom bode merania majú NP s 5 % sorbitolom skladované v 8 °C, -20 °C a -70 °C veľkosť 229,5 nm (PDI = 0,307); 272,9 nm (PDI = 0,337) a 214,37 nm (PDI = 0,277) respektívne.

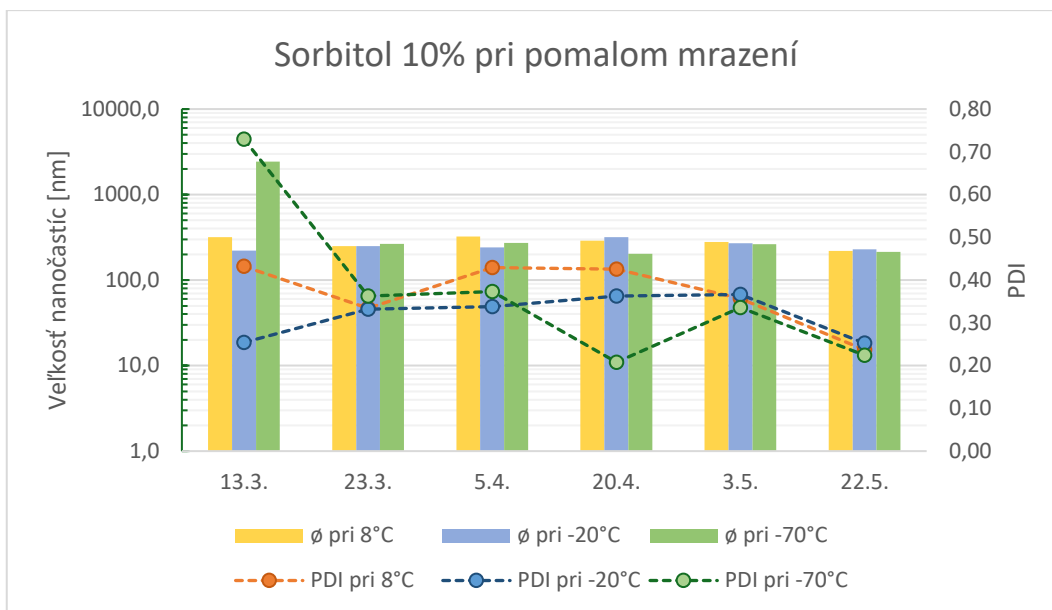
NP lyofilizované s 5 % sorbitolom s využitím pomalého mrazenia v prvom kroku lyofilizácie poskytujú rekonštitúciu do jednej minúty bez ohľadu na teplotu skladovania. Po rekonštitúcii taktiež nie sú prírodné agregáty NP. NP skladované pri -20 °C síce majú v priebehu stabilitej štúdie priemernú veľkosť nad 200 nm, avšak táto veľkosť nemá tendenciu rasti v čase. Podobný trend môžeme sledovať aj v prípade NP skladovaných pri 8 °C aj -70 °C, kedy však NP dosahujú väčšiu veľkosť.



**Graf 16. Stabilita nanočastíc s 5% sorbitolom pri rýchlom mrazení**

V grafe 16 sú zobrazené výsledky zo skladovania NP s 5 % sorbitolom pripravených lyofilizáciou spôsobom pomalého mrazenia. Opäť je veľkosť NP v priemere väčšia, ale nemá tendenciu narastať v čase.

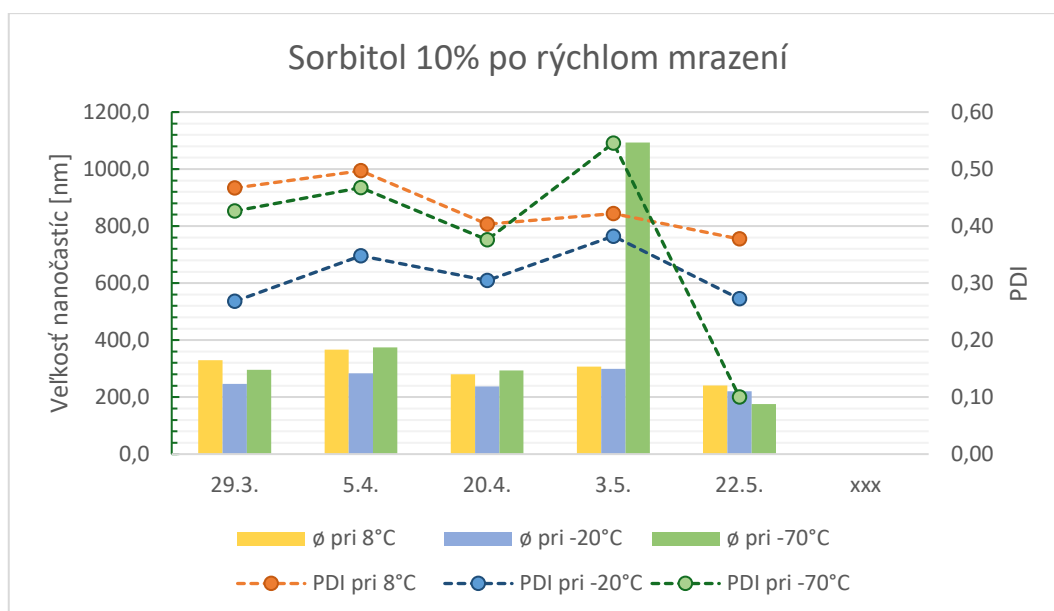
Rovnako ako pri pomalom (graf 15), aj pri rýchlom mrazení (graf 16) prebieha rekonštitúcia lyofilizátu bez problémov do jednej minúty, bez prítomnosti neroztrepatel'ného agregátu. Aj napriek úvodnej vyššej veľkosti NP skladovaných v  $-20^{\circ}\text{C}$  (304,03 nm; PDI = 0,443) je veľkosť NP v priebehu desiatich týždňov relatívne stabilná, v poslednom bode merania dosahuje 215,87 nm (PDI = 0,256).



**Graf 17. Stabilita nanočastíc s 10% sorbitolom pri pomalom mrazení**

V grafe 17 je hlavná os y logaritmicky zobrazená, pretože veľkosť NP skladovaných v  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  dosahuje v prvom bode merania až 2435,67 nm (PDI = 0,730). Vzhľadom na to, že všetky nasledujúce merania majú už nižšiu, stabilnú a v čase nestúpajúcu veľkosť, považujem prvú hodnotu za nerelevantnú. NP lyofilizované s 10 % sorbitolom skladované v  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu dvanástich týždňov mali v poslednom bode merania prijateľné veľkosti a to 219,10 nm (PDI = 0,237); 228,37 nm (PDI = 0,252) a 213,47 nm (PDI = 0,224) respektívne.

NP s 10 % sorbitolom lyofilizované s použitím pomalého mrazenia sa vo všetkých troch prípadoch rekonštituujú po vybratí z príslušných mraziakov, resp. chladničky do jednej minúty, bez prítomnosti agregátu NP.



**Graf 18. Stabilita nanočastíc s 10% sorbitolom pri rýchlom mrazení**

Čo sa týka stability skladovaných NP zobrazených v grafe 18, dá sa povedať, že veľkosť častíc je relatívne nemenná aj napriek celkovému priemeru nad požadovaných 200 nm. Výnimku tvorí bod nameraný 3.5., kedy NP skladované pri  $-70^{\circ}\text{C}$  dosahujú 1092,97 nm (PDI = 0,546). Avšak v poslednom bode merania po desiatich týždňoch majú NP skladované v rovnakých podmienkach už štandardných 175,43 nm (PDI = 0,100).

Pre NP s 10 % sorbitolom pri rýchlom mrazení vyzerá situácia s rekonštitúciou rovnako bezproblémovo ako pri pomalom mrazení.

Pri porovnávaní výsledkov skladovania NP so sorbitolom lyofilizovaných pri pomalom a pri rýchlom mrazení nie sú prítomné významné rozdiely. Rozdiely však nájdeme, ak porovnáme stabilné výsledky trehalózy a sorbitolu pri pomalom a rýchlom mrazení. Ako je uvedené v závere podkapitoly 8.3.1, v lyofilizátoch s trehalózou sú v niektorých prípadoch po rekonštitúcii prítomné neroztrepatelné zhluky. Je to tak pri pomalom mrazení v prípade NP s trehalózou skladovaných v  $8^{\circ}\text{C}$  a pri rýchlom mrazení u NP s trehalózou skladovaných v  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ . NP so sorbitolom nevytvárali podobné zhluky ani v prípade pomalého, ani rýchleho mrazenia, za žiadnych skladovacích podmienok.

Lyofilizácii PLGA NP sa venovali aj Fonte a kol., ktorí skúmali vplyv rôznych lyoprotektantov na PLGA NP plnené insulínom. Porovnávali PLGA NP s 10 % trehalózou, sacharózou, glukózou, fruktózou alebo sorbitolom oproti NP lyofilizovaným bez lyoprotektantov. V porovnaní s NP bez lyoprotektantu mali zredukovanú veľkosť NP s 10 % trehalózou a 10 % glukózou. NP s trehalózou mali aj nižší  $\zeta$ -potenciál, čo naznačuje zlepšenie stability NP. To Fonte a kol. odôvodnili naviazaním sa trehalózy na povrch NP (Fonte et al., 2012).

Podobnej téme sa venovali aj Holzer a kol., ktorý takto porovnávali vplyv trehalózy, manitolu a sacharózy ako kryo- a lyoprotektantov. Došli k záveru, že trehalóza a sacharóza

(2 % a 3 %) sú vhodnými kryo- a lyoprotektantami pri lyofilizácii PLGA NP, ktoré boli stabilné aj po dobu 3 mesiacov stabilitnej štúdie (Holzer et al., 2009).



## 9. ZÁVER

Výsledky tohto projektu ukazujú, že najlepším lyoprotektantom spomedzi trehalózy, sorbitolu, glycínu, xylitolu a dextransu pri lyofilizácii PLGA NP je práve trehalóza. V druhej fáze projektu boli otestované trehalóza a sorbitol v štyroch rôznych koncentráciách a dvoch spôsoboch prvého kroku lyofilizácie – pomalom a rýchlom mrazení. Najmenší nárast vo veľkosti dosahovali NP lyofilizované s 10 % roztokom trehalózy. Tie narástli v porovnaní s veľkosťou NP pred lyofilizáciou len o 5,2 % pri pomalom mrazení a o 7,2 % pri rýchlom mrazení. Na druhom mieste sa ako lyoprotektant ujal 10 % roztok sorbitolu, vďaka ktorému narástli NP o 16,8 % pri pomalom mrazení a o 9,2 % pri rýchlom mrazení. V neposlednom rade vytvárajú NP po lyofilizácii s trehalózou 10 % a sorbitolom 10 % aj štruktúrne ucelené a pekné koláče.

V stabilitných testoch dosiahli NP lyofilizované s trehalózou pri pomalom aj rýchlom mrazení najlepších výsledkov, keď sú skladované v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Boli schopné udržať si veľkosť do 200 nm aj po dobu 12 týždňov. V prípade sorbitolu bola síce veľkosť NP v priemere o niečo väčšia, ale podobne ako u trehalózy mali NP najmenší nárast v priebehu dvanástich, eventuálne desiatich týždňov pri skladovaní v mraziaku s  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V prípade 10 % sorbitolu bola stabilita dobrá aj pri skladovaní v mraziaku s  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , to však neplatilo pri lyofilizáte s 5 % sorbitolom. Zároveň je aj z hľadiska použiteľnosti prakticky jednoduchšie, dostupnejšie a ekonomicky výhodnejšie lyofilizát skladovať v mrazničke pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Prítomnosť neroztrepanej časti lyofilizátu po rekonštitúcii NP skladovaných napríklad v chladničke s teplotou  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  mohla byť spôsobená vlhkosťou, ktorú častice naväzujú za vzniku pevne viazaného agregátu. Čím nižšia je teplota v chladničke/mrazničke, tým je menšia vlhkosť vzduchu a prostredia obklopujúceho NP. NP v tomto projekte boli skladované v skúmavkách typu Eppendorf z polypropylénu, ktorý je priepustný pre vzduch a vlhkosť (*Eppendorf Safe-Lock Tubes - Microtube*, n.d.) (Bastarrachea et al., 2011). Mohlo by sa zdať, že by bol tento problém riešiteľný použitím sklenených vialiek. Z výsledkov tohto projektu je teda viditeľné, že z hľadiska stability NP je preto vhodnejšie skladovanie v mraziaku  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 10. ZOZNAM GRAFOV

Graf 1. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s trehalózou, sorbitolom a dextransom.....	27
Graf 2. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s glycínom a xylitolom .....	27
Graf 3. Percentuálny nárast veľkosti nanočastíc po lyofilizácii pri pomalom mrazení .....	28
Graf 4. Percentuálny nárast vo veľkosti nanočastíc po lyofilizácii pri rýchlom mrazení.....	29
Graf 5. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s trehalózou pri pomalom mrazení .....	32
Graf 6. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii s trehalózou pri rýchlom mrazení .....	32
Graf 7. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii so sorbitolom pri pomalom mrazení.....	33
Graf 8. Veľkosť nanočastíc po lyofilizácii so sorbitolom pri rýchlom mrazení .....	34
Graf 9. Porovnanie nárastu veľkosti nanočastíc s použitím rôznych koncentrácií pri pomalom mrazení.....	35
Graf 10. Porovnanie nárastu veľkosti nanočastíc s použitím rôznych koncentrácií pri rýchlom mrazení.....	36
Graf 11. Stabilita nanočastíc s 5 % trehalózou pri pomalom mrazení .....	39
Graf 12. Stabilita nanočastíc s 5 % trehalózou pri rýchlom mrazení.....	40
Graf 13. Stabilita nanočastíc s 10 % trehalózou pri pomalom mrazení .....	41
Graf 14. Stabilita nanočastíc s 10 % trehalózou pri rýchlom mrazení.....	42
Graf 15. Stabilita nanočastíc s 5% sorbitolom pri pomalom mrazení.....	44
Graf 16. Stabilita nanočastíc s 5% sorbitolom pri rýchlom mrazení .....	45
Graf 17. Stabilita nanočastíc s 10% sorbitolom pri pomalom mrazení.....	46
Graf 18. Stabilita nanočastíc s 10% sorbitolom pri rýchlom mrazení .....	47

## **11. ZOZNAM TABULIEK**

Tab. 1 Lyofilizačný cyklus.....	24
Tab. 2 Výsledky prvej fázy projektu .....	30

## 12. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 Fázový diagram pre systém voda/roztok .....	12
Obr. 2 Lyofilizované koláče nanočastíc s lyoprotektantami.....	29
Obr. 3 Molekula trehalózy .....	36
Obr. 4 Koláče lyofilizovaných nanočastíc s trehalózou .....	37
Obr. 5 Koláče lyofilizovaných nanočastíc so sorbitolom .....	37

## 13. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. In *Annual Review of Biomedical Engineering* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Allison, S. D., & Anchordoquy, T. J. (2001). Lyophilization of Nonviral Gene Delivery Systems. *Nonviral Vectors for Gene Therapy*, 225–252. <https://doi.org/10.1385/1-59259-139-6:225>
- Allison, S. D., Molina, M. d. C., & Anchordoquy, T. J. (2000). Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1468(1–2), 127–138. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00251-0)
- Arora, S., Dash, S. K., Dhawan, D., Sahoo, P. K., Jindal, A., & Gugulothu, D. (2023). Freeze-drying revolution: unleashing the potential of lyophilization in advancing drug delivery systems. In *Drug Delivery and Translational Research*. <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01477-7>
- Barley, J. (n.d.). *Basic Principles Of Freeze-Drying - Scientific Products*. Retrieved April 10, 2024, from <https://scientificproducts.com/basic-principles-of-freeze-drying/>
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. (2011). Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>
- Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., & Alcudia, A. (2020). Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. In *Nanomaterials* (Vol. 10, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/nano10071403>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>
- Branca, C., Magazù, S., Maisano, G., & Migliardo, P. (1999).  $\alpha,\alpha$ -trehalose-water solutions. 3. Vibrational dynamics studies by inelastic light scattering. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(8). <https://doi.org/10.1021/jp983470c>
- Chidambaram, M., & Krishnasamy, K. (2014). Modifications to the conventional nanoprecipitation technique: An approach to fabricate narrow sized polymeric Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(2). <https://doi.org/10.5681/apb.2014.030>
- Claus, S., Schoenbrodt, T., Weiler, C., & Friess, W. (2011). Novel dry powder inhalation system based on dispersion of lyophilisates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.03.005>

- Clayton, K. N., Salameh, J. W., Wereley, S. T., & Kinzer-Ursem, T. L. (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, 10(5). <https://doi.org/10.1063/1.4962992>
- Crowe, L. M., Reid, D. S., & Crowe, J. H. (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, 71(4). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
- Eppendorf Safe-Lock Tubes - Microtube. (n.d.). Retrieved August 15, 2024, from <https://www.eppendorf.com/us-en/Products/Laboratory-Consumables/Tubes/Eppendorf-Safe-Lock-Tubes-p-0030123611>
- Falke, S., & Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6)
- Fonte, P., Reis, S., & Sarmiento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 225, 75–86. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.01.034>
- Fonte, P., Soares, S., Costa, A., Andrade, J. C., Seabra, V., Reis, S., & Sarmiento, B. (2012). Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomatter*, 2(4). <https://doi.org/10.4161/biom.23246>
- Freeze drying/lyophilization market - Global forecast to 2025. (2020). <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/freeze-drying-lyophilization-equipment-market-24018886.html>
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., & DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>
- Holzer, M., Vogel, V., Mäntele, W., Schwartz, D., Haase, W., & Langer, K. (2009). Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 428–437. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2009.02.002>
- Hottot, A., Vessot, S., & Andrieu, J. (2007). Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(7). <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.09.003>

- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Kasper, J. C., & Friess, W. (2011). The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 78, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
- Kasper, J. C., Winter, G., & Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(2). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.019>
- Kumar Sharma, D., Thakur, N., & Deb, B. (2022). Review on Classification, Methods, and Characterization of Polymeric Nanoparticles with Their Applications. *International Journal of Life Science and Pharma Research*. <https://doi.org/10.22376/IJPBS/LPR.2022.12.6.P24-38>
- López-Lorente, Á. I., & Mizaikoff, B. (2016). Recent advances on the characterization of nanoparticles using infrared spectroscopy. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 84). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.012>
- Luo, W. C., O'Reilly Beringsh, A., Kim, R., Zhang, W., Patel, S. M., Bogner, R. H., & Lu, X. (2021). Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 169. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.10.014>
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, A. (2016). Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. In *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8_2)
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. In *Nanoscale* (Vol. 10, Issue 27). <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Redcliffe N. Salaman, & William Glynn Burton. (n.d.). *The History and Social Influence of the Potato* - Redcliffe N. Salaman, William Glynn Burton - Google Knihy. Retrieved April 6, 2024, from [https://books.google.sk/books/about/The\\_History\\_and\\_Social\\_Influence\\_of\\_the.html?id=EV4YE\\_ORsywC&redir\\_esc=y](https://books.google.sk/books/about/The_History_and_Social_Influence_of_the.html?id=EV4YE_ORsywC&redir_esc=y)
- Sadikoglu, H., Ozdemir, M., & Seker, M. (2006). Freeze-drying of pharmaceutical products: Research and development needs. *Drying Technology*, 24(7). <https://doi.org/10.1080/07373930600734018>
- Scarlett, B. (Ed.). (2005). *Electrophoretic Light Scattering*. In *Particle Characterization: Light Scattering Methods: Vol. Vol. 3*. Springer. [https://doi.org/10.1007/0-306-47124-8\\_6](https://doi.org/10.1007/0-306-47124-8_6)

- Selmani, A., Kovačević, D., & Bohinc, K. (2022). Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 303).  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>
- Simperler, A., Kornherr, A., Chopra, R., Bonnet, P. A., Jones, W., Motherwell, W. D. S., & Zifferer, G. (2006). Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose: An experimental and in silico study. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(39).  
<https://doi.org/10.1021/jp063134t>
- Solocinski, J., Osgood, Q., Wang, M., Connolly, A., Menze, M. A., & Chakraborty, N. (2017). Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, 75.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.01.001>
- Stokes, D. J. (2008). Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM). In *Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM)*.  
<https://doi.org/10.1002/9780470758731>
- Varshney, D., Singh, M., Varshney, D., & Singh, M. (2015). History of Lyophilization. *Lyophilized Biologics and Vaccines*, 3–10. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2383-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2383-0_1)
- Zetasizer Nano S and ZS Specifications DLS Maximum Size Limit 10.0 (d.µm). (2012, June 1).  
<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/tn120601zetasisernanos-zsmaximumsizelimit>
- Zhao, L., Duan, X., Cao, W., Ren, X., Ren, G., Liu, P., & Chen, J. (2021). Effects of different drying methods on the characterization, dissolution rate and antioxidant activity of ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles. *Foods*, 10(10).  
<https://doi.org/10.3390/foods10102470>
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3731, 25(16), 3731.  
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163731>