

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

**Formulácia a testovanie nanočastíc
z vetvených polyesterov s siRNA**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Hradec Králové 2018

Simona Medvid'ová

So všetkou česťou prehlasujem, že práca je mojím samostatne vypracovaným dielom. Pri vypracovávaní použitá literatúra a použité zdroje sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k dosiahnutiu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové

.....

Pod'akovanie

Touto cestou by som chcela poďakovať doc. RNDr. Milanovi Dittrichovi, CSc. a Mgr. Jurajovi Martiškovi za odborné vedenie, trpezlivosť a cenné rady pri spracovávaní mojej diplomovej práce, ako v oblasti teoretickej tak i experimentálnej. V neposlednom rade ďakujem mojim rodičom, ktorí mi boli veľkou oporou počas celého štúdia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Školiteľ: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Študent: Simona Medvid'ová

Názov diplomovej práce: Formulácia a testovanie nanočastíc z vetvených polyesterov s siRNA

S napredujúcim trendom vývoja rastú súčasne kladené požiadavky na nové, efektívnejšie formulácie v oblasti vývoja liekových systémov. Zameranie tejto diplomovej práce je tak upriamené na formuláciu nanočastíc z biodegradovateľných vetvených polyesterov na báze PLGA, vhodných k transportu oligoméru malej interferujúcej nukleovej kyseliny - siRNA. Teoretická časť je zameraná na charakteristiku využiteľných polymérov, ich možné modifikácie, metódy prípravy s rozsiahlejším upriamením na použitú nanoprecipitačnú metódu, opisuje dôležité parametre ako veľkosť, zeta potenciál a polydisperzitu. Hlavnou súčasťou je taktiež charakterizácia siRNA z hľadiska štruktúry, vlastností, modifikácií a funkcie. Rozsiahlejšou je časť experimentálna, ktorá sa zaoberá vhodným výberom typu a koncentrácie polyesteru i stabilizátora, metódami prípravy, charakterizácie nanočastíc a možnosťou analýzy siRNA v nich enkapsulovaného. V kapitolách výsledky a diskusia boli porovnávané použité polyestery vetvené na tripentaerythritole a na kyseline polyakrylovej v rôznych koncentráciách z hľadiska veľkosti, polydisperzity, zeta potenciálu, stálosti. Taktiež sa sledoval efekt pridaného stabilizátora a enkapsulačná efektivita. Závery práce naznačujú vzájomnú kompatibilitu jednotlivých zložiek používaných pri príprave nanočastíc, ako aj vhodnosť samotnej metódy. Bol zaznamenaný trend narastania veľkosti so stúpajúcou koncentráciou polyesteru. Dôležitou sa javí aj stabilita nanosuspenzie, dokonca s možnosťou absencie stabilizátora. Enkapsulácia stúpala s rastúcou koncentráciou polyesteru, pričom najvyššia hodnota bola dosiahnutá pri použití polyesteru vetveného na kyseline polyakrylovej.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Student: Simona Medvid'ová

Title of thesis: Formulation and testing of branched polyesters siRNA-loaded nanoparticles

The progression of development increases demand for new and more effective drug systems formulations. This diploma thesis is focused on the preparation of nanoparticles from biodegradable branched polyesters based on PLGA, which are suitable for the transport of an oligonucleotide of a small interfering nucleic acid, siRNA. The theoretical part focuses on the characteristics of usable polymers, their possible modifications, the methods of preparation with closer look at the selected nanoprecipitation method, the important parameters such as particles size, zeta potential, and polydispersity. The main part is also characterization of siRNA in terms of structure, properties, modifications, and its function. A more extensive experimental part deals with the appropriate choice of type and concentration of polyester and stabilizer, methods of preparation and characterization of nanoparticles, and the possibility of analyzing encapsulated siRNA. Chapters results and discussion compares polyesters branched on tripentaerythritol, and polyacrylic acid in different concentrations in terms of size, polydispersity, zeta potential, and stability. The effect of added stabilizer, and encapsulation efficiency were also observed. The conclusions indicate compatibility of each component used in the preparation of nanoparticles, as well as the suitability of the method itself. With an increasing concentration of polyester, increase of particles size was observed. Important is, that stability of the nanosuspension was significant even without use of the stabilizer. Encapsulation increased with increasing concentration of polyester, the highest value was obtained using a polyester branched on polyacrylic acid.

Obsah

1. Zadanie práce	8
2. Zoznam použitých skratiek	9
3. Zoznam použitých obrázkov	10
4. Zoznam použitých tabuliek	12
5. Úvod	13
6. Teoretická časť	15
6.1 Nanočastice	15
6.1.1 Úvod do problematiky nanočastíc	15
6.1.2 Druhy nanočastíc	16
6.1.3 Látky využité pri príprave	16
6.2 Sféra polymérových nanočastíc	17
6.2.1 Polymérové nanonosiče	17
6.2.2 Syntetické biodegradabilné polyméry	17
6.2.3 PLGA	18
6.3 Modifikácia PLGA	19
6.4 Fyzikálne vlastnosti polymérov	20
6.5 Metódy prípravy nanočastíc	21
6.5.1 Prehľad možných spôsobov prípravy	21
6.5.2 Nanoprecipitačná metóda	23
6.6. Vlastnosti nanočastíc ovplyvňujúce ich využitie	25
6.6.1 Veľkosť	25
6.6.1.1 Metóda DLS	26
6.6.2 Povrchové vlastnosti nanočastíc	28
6.7 Zabudovanie látky do NP	29
6.8 Uvoľňovanie inkorporovanej látky	29
6.9 Cílená distribúcia	30
6.10 Zeta potenciál	30
6.11 siRNA	32
6.11.1 Stanovenie pojmu siRNA	32
6.11.2 Pôvod siRNA	33
6.11.3 Syntéza siRNA	33
6.11.4 Funkcia siRNA	34
6.11.5 Distribúcia siRNA	34
6.12 RNAi	35

6.13 Systémy obsahujúce siRNA	36
7. Experimentálna časť	38
7.1 Použité prístroje	38
7.2 Zoznam použitých chemikálií a ich skratky.....	38
7.3 Charakteristika použitého oligoméru	39
7.4 Charakteristika použitých polymérov	40
7.5 Príprava nanočastíc	41
7.6 Meranie veľkosti a zeta potenciálu nanočastíc	42
7.7 Centrifugácia	44
7.8 Kalibračná krivka	44
7.9 Stanovenie množstva enkapsulovanej siRNA.....	45
8. Výsledky	46
8.1 Závislosť veľkosti NP na použitom polyméri a jeho koncentrácii.....	46
8.2 Zeta potenciál v závislosti na type a koncentrácii polyméru.....	48
8.3 Veľkosť v závislosti na prítomnosti CET.....	50
8.4 Veľkosť NP v závislosti na prítomnosti DMAB	52
8.5 Zeta potenciál v závislosti na koncentrácii CET	53
8.6 Stabilita veľkosti NP v závislosti na type a koncentrácii polyméru po 24, 48 a 72 hod	55
8.7 Stabilita zeta potenciálu po 24 hod v závislosti na type a koncentrácii polyméru a koncentrácii pridaného CET.....	56
8.8 Veľkosť NP v závislosti na použití metódy „drop-wise“ a „one-pot“	58
8.9 Stanovenie množstva enkapsulovanej siRNA	59
9. Diskusia	60
9.1 Obecné poznámky	60
9.2 K voľbe polymérov a metóde prípravy nanočastíc	60
9.3 Vplyv polyméru a jeho koncentrácie na veľkosť a zeta potenciál NP	61
9.4 Vplyv kationických tenzidov na parametre nanočastíc.....	62
9.5 Stabilita veľkostných parametrov nanočastíc.....	62
9.6 Vplyv postupov prípravy na veľkosť nanočastíc	63
9.7 Enkapsulácia siRNA	63
10. Závery	64
11. Použitá literatúra	65

1. Zadanie práce

Cieľom tejto práce bolo využiť originálne syntetizované vetvené polyestery na báze PLGA ako nosiče vhodné k enkapsulácií oligoméru o veľkosti 25 nukleotidov za využitia modifikovanej nanoprecipitačnej metódy. Požadovaná bola stabilná nanosuspénzia s čo najnižšou hodnotou polydisperzity, pokiaľ možno záporným zeta potenciálom a veľkosťou umožňujúcou vstup do buniek. Ďalším cieľom bolo porovnať použité polyestery a zhodnotiť efekt modifikovaných parametrov ako ich koncentrácie, výber stabilizátora, zloženie jednotlivých fáz a drobných modifikácií postupu na sledované aspekty nanosuspénzie.

2. Zoznam použitých skratiek

NP – z angl. nanoparticles - nanočastice

PLGA – polylactacid-co-glycolic acid – kopolymér kyseliny mliečnej a glykolovej

ZP – zeta potenciál

Pk Area Int – plocha píku

Pk Mean Int – výška píku

PdI – index polydisperzity

DLS - Dynamic light scattering - Dynamický rozptyl svetla

Z-Ave – stredná hodnota veľkosti častíc, meraná ako priemer častíc

EMA – European Medicines Agency - Európska lieková agentúra

FDA – Food and Drug Administration - Úrad pre kontrolu potravín a liečiv

T3 – vysoko vetvený terpolymér kyseliny mliečnej a glykolovej, vetvený na tripentaerythritole

A2 – vysoko vetvený terpolymér kyseliny mliečnej a glykolovej, vetvený na kyseline polyakrylovej

DMSO – dimethylsulfoxid

CET – N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid

RISC – ribonukleoproteinový komplex indikujúci umlčovanie génov

RNAi – RNA interferencia

siRNA – malá interferujúca RNA

miRNA – micro RNA

dsRNA – dvojreťazcová DNA

3. Zoznam použitých obrázkov

Obrázok 1 Formulácia nanosfér a nanokapsúl [8]	16
Obrázok 2 Biodegradabilita PLGA [13]	19
Obrázok 3 Metóda nanoprecipitačnej prípravy spôsobom „dropwise“ [23]	24
Obrázok 4 Rozptýlené svetlo po osvetlení častíc [26].....	27
Obrázok 5 Schéma rýchlosti pohybu malých a veľkých častíc [26].....	27
Obrázok 6 Popis zeta potenciálu [26]	32
Obrázok 7 Štruktúra siRNA [33]	33
Obrázok 8 Duálne značené hybridizačné sondy [54]	39
Obrázok 9 Možnosť naviazania 6-FAM k oligonukleotidu na 3´ a 5´ konci [55]...	40
Obrázok 10 Kalibračná krivka	45
Obrázok 11 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na koncentrácii A2.....	46
Obrázok 12 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na koncentrácii T3	47
Obrázok 13 Veľkosť NP v závislosti na type a koncentrácii polyméru	47
Obrázok 14 Frekvenčná krivka distribúcie zeta potenciálu v závislosti na koncentrácii A2	48
Obrázok 15 Frekvenčná krivka distribúcie zeta potenciálu v závislosti na koncentrácii T3	49
Obrázok 16 Zeta potenciál v závislosti na type a koncentrácii polyméru	49
Obrázok 17 Veľkosť NP v závislosti na koncentrácii pridaného CET do vonkajšej fázy.....	50
Obrázok 18 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na použitom polyméri a koncentrácii pridaného CET do vonkajšej fázy.....	51
Obrázok 19 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v polyméri T3 v závislosti na koncentrácii CET pridaného do vonkajšej fázy	51
Obrázok 20 Veľkosť NP pri použití polyméru T3 v závislosti na koncentrácii DMAB	52
Obrázok 21 Vplyv koncentrácie CET na veľkosť ZP.....	53
Obrázok 22 Vplyv koncentrácie CET na veľkosť NP	54
Obrázok 23 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti v závislosti na type polyméru po 24 hod	55

Obrázok 24 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti v závislosti na type polyméru po 24, 48 a 72 hod.....	56
Obrázok 25 Frekvenčná krivka zeta potenciálu v závislosti na type polyméru pri koncentrácii 3% po 72 hod.	57
Obrázok 26 Frekvenčná krivka zeta potenciálu polyméru T3 po 24, 48, 72 hod. .	57
Obrázok 27 Frekvenčná krivka zeta potenciálu použitím polyméru A2 – 3% v závislosti na koncentrácii CET	57
Obrázok 28 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na použitej metóde drop-wise a one-pot.....	58
Obrázok 29 Závislosť enkapsulačnej efektivity (EE) na type polyméru pri rôznych koncentráciách	59

4. Zoznam použitých tabuliek

Tabuľka 1 Číselné a hmotnostné pomery polymérov A2, T3	41
Tabuľka 2 Index polydispersity	43
Tabuľka 3 Príprava NP s použitím polymérov rôznych koncentrácií	46
Tabuľka 4 Vplyv typu a koncentrácie polyméru na zeta potenciál	48
Tabuľka 5 Veľkosť NP v závislosti na pridanom množstve cetrimidu do vonkajšej fázy.....	50
Tabuľka 6 Vplyv koncentrácie DMAB na veľkosť NP	52
Tabuľka 7 Vplyv koncentrácie CET na zeta potenciál	53
Tabuľka 8 Vplyv typu a koncentrácie polyméru na stabilitu veľkosti po 24, 48 a 72 hod	55
Tabuľka 9 Vplyv typu a koncentrácie polyméru a koncentrácie pridaného CET na veľkosť NP po 24 hod.....	56
Tabuľka 10 Vplyv použitej metódy „drop-wise“ a „one-pot“ na veľkosť NP	58
Tabuľka 11 Vplyv zvoleného polyméru a jeho koncentrácie na enkapsulačnú efektivitu (EE).....	59

5. Úvod

Nanotechnológie, jeden z dynamických prvkov novej technologickej revolúcie, sú v neustálom vývoji. Je tak obťažné dospieť k jednotnej, ustálenej definícii. Obecne sú nanotechnológie označené ako interdisciplinárne a prierezové technológie, zaoberajúce sa praktickým využitím vlastností nanomateriálov. Podrobnejšie sa skúmaním vlastností materiálov zaoberá nanoveda, ktorá je prepojená s ďalšími oblasťami, fyzikou pevných látok, chémiou či molekulárnou biológiou.

Ako medzník v napredovaní tohto rozvoja je označovaná pamätná prednáška Richarda Feynmana, známeho ako otca nanotechnológií, z roku 1959. Je považovaná za jednu z prvých diskusií o využitíach procesov na atomárnej úrovni pre nové technológie. Stala sa synonymom súčasnej éry tohto vývoja. Aktuálne je nanotechnológia využívaná v obširnom spektre oblastí siahajúcich od stavebníctva, informačných technológií až k medicíne. Značný rozmach je badateľný aj v oblasti farmaceutickej technológie, kde je pozornosť upriamená na materiál nanorozmerov, jeho využitie pri formulácii liečivých prípravkov a ich zavedenie do bežnej praxe. Množstvo liečivých prípravkov vyvinutých týmto spôsobom neustále stúpa. Nanomateriál a nanočastice vykazujú vlastnosti, ktoré ich makroskopické analógy nemajú alebo doposiaľ neboli pozorované. Tieto vlastnosti majú niekedy pôvod v kvantových efektoch. Štúdium javov, využitia a manipulácie s hmotou s rozmermi 1-1000 nm, tak nabralo rýchly rozmach. [1]

Spojenie nanotechnológií, terapeutiky a diagnostiky predstavuje novú stratégiu liečby a potenciál nielen odhaliť a diagnostikovať choroby, ale aj liečiť a monitorovať terapeutickú odpoveď. V klinickom prostredí ale i v oblasti výskumu, tak umožňuje urýchlene posúdiť výkonnosť nových terapeutických látok. Zvýšenie terapeutického indexu a účinnosti. Jednou z najväčších výziev sa tak stáva vyvinutie vhodných nosičov v oblasti cielej distribúcie liečiv. Práve táto oblasť vývoja, prináša inovatívne platformy systémov, ktoré sú schopné prekonať nevýhody voľných liečiv či terapeutických molekúl. K tomuto účelu sú využívané nanočastice pripravované z rôznych materiálov. Výber materiálu podlieha kritériám

a faktorom, napr. finálna veľkosť nanočastíc, vlastnosti liečiva ako rozpustnosť a stabilita, biokompatibilita a toxicita, profil uvoľňovania či náboj molekúl liečiva. Výhody, ktoré poskytuje takýto nosný systém zahŕňa zvýšenú stabilitu liečiv, riadené uvoľňovanie, špecifické cielenie, zlepšenie farmakokinetiky a biodistribúcie. [2] [3]

V posledných rokoch bolo vyvinutých kvantum systémov na dodávanie nanočastíc z rôznych materiálov v rozmedzí od niekoľkých desiatok nanometrov až po niekoľko mikrometrov; tieto systémy dodávania zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na lipozómy, micely, dendriméry a polymérne častice. Použitie nanonosičov na dodávanie terapeutických látok viedlo k významnému zefektívneniu terapie, čo poukazuje na vysoký potenciál nanočastíc. [4]

Zároveň od publikácie fungovania RNA interferencie a jej schopnosti posttranskripčného špecifického tlmenia génov pri ochoreniach sa venuje výskum taktiež vývoju vhodných nosičov na dodávanie siRNA do organizmu. [5]

Na spojenie týchto vývojových trendov je zameraná aj moja práca, v ktorej realizujem formuláciu a testovanie nanočastíc z vetvených polymérov s siRNA.

6. Teoretická časť

6.1 Nanočastice

6.1.1 Úvod do problematiky nanočastíc

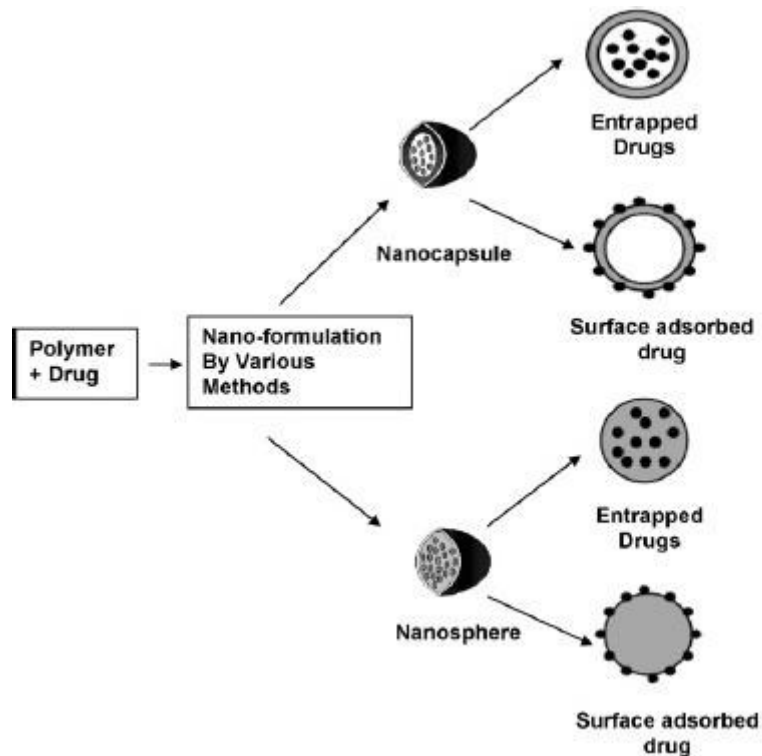
Aktuálne nie je k dispozícii jednotne uznaná definícia nanočastíc, avšak stretávame sa s vymedzením pojmu Medzinárodnou organizáciou pre normalizáciu ktorá definuje „nanomateriál“ ako „materiál s ľubovoľnými vonkajšími rozmermi veľkostí v ráde nanometrov alebo vnútornou štruktúrou alebo povrchovou štruktúrou v ráde nanometrov, presnejšie 1-100 nm.“ [6]

Časticové disperzie alebo pevné častice v rozmedzí 10 až 1000 nanometrov je vymedzenie termínu nanočastíc v oblasti lekárskeho a biologického vied. [7] Najzvyčajnejšie ide o pevné lipidové nanočastice, liposomy, micely, dendriméry, kryštálové či polymérne nanočastice.

Rozsah veľkostí teda nie je uniformne stanovený, avšak v oblasti terapie a diagnostiky sú bežne používané rozmery 100-500 nm. Popis rozmerov je dôležitý z hľadiska následného ovplyvnenia, keďže častice s menšími rozmermi ako 100 nm majú väčší pomer veľkosti povrchu k objemu častíc. Tento parameter má významný vplyv na zvýšenie biologickej dostupnosti, a to rýchlejšou disolúciou liečiva vo vodnom prostredí. Umožnením cielenej distribúcie a riadenej liberácie sú nanočastice zaradené medzi základné liekové mikroformy. Ako nová lieková forma sú nanočastice študované od 80. rokov dvadsiateho storočia.

Vymedzené sú dva typy polymérnych častíc, dané druhom prípravy a morfológiou a to mikro- a nanokapsuly skladajúce sa z pevnej časti, obalu v ktorom je jadro z tekutej, polotekutej alebo pevnej látky. Iným typom sú mikro- a nanosféry zložené z polyméru tvoriaceho tuhú disperziu poprípade tuhý roztok, kde je liečivo rovnomerne rozptýlené. V oboch prípadoch smie byť účinná látka rozpustená v polyméri, uzavretá vo vnútri, adsorbovaná na povrchu alebo uzavretá v dutinách.

Obrázok 1 Formulácia nanosfér a nanokapsúl [8]



6.1.2 Druhy nanočastíc

K dispozícii je rôznorodé spektrum nanočastíc, líšiac sa v parametroch veľkosti, tvaru alebo zloženia. Niektoré sú v oblasti klinického využitia odsúhlasené, niektoré sú zatiaľ zaradené v testovacom alebo schvaľovacom procese. K používaným typom je možné zaradiť polyméry na báze uhlíka, polymérne nanočastice, dendriméry, nanočastice na báze lipidov, kovové nanočastice a iné.

6.1.3 Látky využité pri príprave

S rastúcim trendom vývoja pomocných látok je možné k príprave využívať široké spektrum látok. Alifatické polyestery patria medzi najviac využívané. Využitie polymérov pri príprave nanočastíc je podmienené splnením určitých požiadaviek. Základnými požiadavkami je schopnosť biodegradability vo fyziologickom prostredí, vyhovujúca biodegradačná kinetika, biokompatibilita

s liečivom ale aj štruktúrami organizmu a adekvátne mechanické vlastnosti. S obľubou sú teda využívané kyselina polyglykolová, kyselina polymliečna a ich kopolyméry. [9]

6.2 Sféra polymérových nanočastíc

6.2.1 Polymérové nanonosiče

Nanočastice formulované z biodegradabilných polymérov sú využívané pri cieľenej distribúcii ako nosiče liečivej látky. Polyméry po aplikácii do organizmu sú rozkladané enzymaticky alebo neenzymaticky za súčasnej produkcie netoxických metabolitov, ktoré sú následne vylúčené fyziologickými cestami.

Zatriedené sú v tejto skupine syntetické, ale aj prírodné polyméry. Správanie prírodných polymérov v organizme je menej predpovedateľné z dôvodu odlišností v chemickej stavbe i fyzikálnych vlastnostiach. Častejšie sú preto uprednostňované pripravované, syntetické polyméry s pevne danou chemickou štruktúrou, ktorá definuje ich fyzikálne vlastnosti ako priepustnosť, rozpustnosť, cielenie na miesto účinku a u ktorých sa predpokladá, že nie sú imunogénne.

Pri enkapsulácii biologicky aktívnej látky do polymérnych nanočastíc je dosahovaná ochrana aktívnej zložky, targeting a kontrola rozsahu uvoľnenej látky. Tieto funkcie sú využívané ako nástroj zefektívnenia terapie.

Biologicky neodbúrateľné polyméry našli taktiež využitie, napr. v kontrolovanej distribúcii, ale i diagnostickej sfére. Za účelom využitia ako nosiče sú využívané polymethylakryláty. [10]

6.2.2 Syntetické biodegradabilné polyméry

Syntetické biodegradabilné polyméry boli po prvýkrát využité ako nosiče liečiv v roku 1970. Podmienky, ktoré musí spĺňať polymér sú vzájomne ovplyvňované a patria medzi ne biodegradabilita, biokompatibilita, permeabilita.

K syntetických polymérom radíme alifatické polyestery ako polyaminokyseliny, polyanhydridy, polyglykoidy, polylaktidy. Široké spektrum syntetických biodegradabilných polymérov s uplatnením v biomedicínskej oblasti zaberajú alifatické polyestery tvorené α -hydroxykyselinami. K tomuto uplatneniu boli kyselina polymliečna, kopolymér kyseliny polymliečnej a glykolovej a poly- ϵ -kaprolakton vďaka priaznivému bezpečnostnému profilu a vyhovujúcej tkanivovej znášateľnosti schválené Food and Drug Administration (Úrad pre kontrolu potravín a liečiv Spojených štátov amerických, FDA) a European Medicine Agency (Európska lieková komisia, EMA). Prednosťou nosičov pripravených z týchto polymérov je taktiež predĺžené uvoľňovanie liečivej látky a zvýšenie stability liečiva.

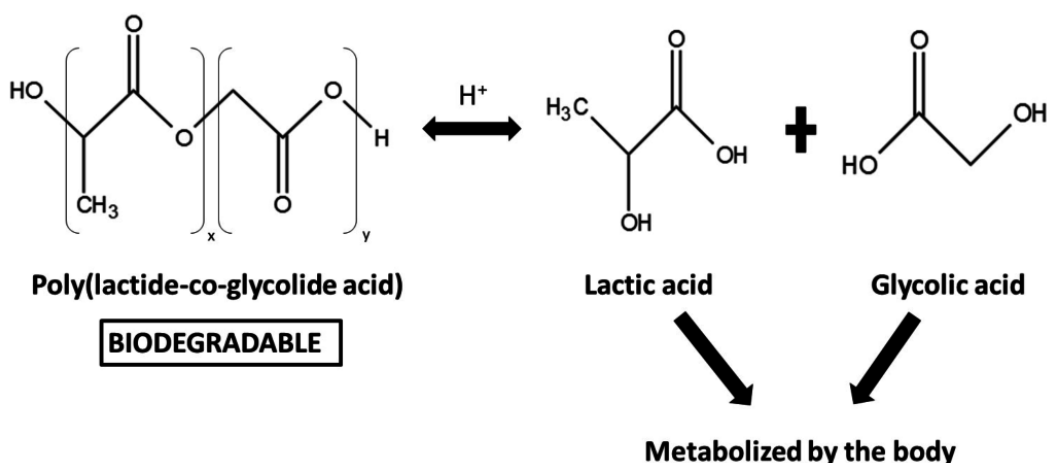
Pri používaní prevládajú polyméry vychádzajúce zo štruktúry α -hydroxykyselín, ktorých reakciou vznikajú látky s lineárnym reťazcom a vysokou viskozitou, ktorá ale sťažuje ich ďalšie spracovanie. Preto je výhodnejšie použitie vetvených, nízko molekulárnych polyesterov či oligoesterov, ktoré majú nižšiu viskozitu a tým ľahšiu spracovateľnosť a vyváženejší proces degradácie, čím je dosiahnuté hodnovernejšie uvoľňovanie liečiv. Tie vznikajú polykondenzačnými reakciami α -hydroxykyselín s viacsytnými alkoholmi, v praxi sú bežne používané produkty štruktúrne vychádzajúce z kyseliny glykolovej a kyseliny DL-mliečnej, či jej cyklického laktonu. [11]

6.2.3 PLGA

Štruktúrne definovaný kopolymér PLGA je syntetizovaný z racemických zmesí dvoch α -hydroxykyselín, mliečnej a glykolovej. Výsledkom polymerizácie je lineárny, amorfný polyester. Je nositeľom vlastností ako degradovateľnosť, biokompatibilita, vhodnosť orálnej i perorálnej aplikácie. K pozitívnym vlastnostiam patrí i možnosť enkapsulovať odlišné formy liečiv. Z tohto hľadiska, a vďaka komerčnej dostupnosti, patrí PLGA na popredné miesta využitia v oblasti farmácie a medicíny.

Biodegradovateľnosť je založená na hydrolýze tohto polyméru na monoméry kyseliny mliečnej a glykolovej. Tie sú metabolizované prostredníctvom Krebsovho cyklu, usmernením pomeru kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej v kopolymérnom reťazci. Spočiatku dochádza k náhodnému štiepeniu a následne i k znižovaniu molárnej hmotnosti polyméru. Neskôr vznikom rozpustných oligomérov a následne polymérov dochádza k razantnej strate hmotnosti. Rýchlosť degradácie je ovplyvnená molárnym pomerom kyseliny mliečnej a glykolovej v reťazci, molekulovou hmotnosťou polyméru a tým je zároveň možné do určitej miery modifikovať tento dej. Uvoľňovanie prebieha pomocou difúzie a zároveň degradácie matrice. [12]

Obrázok 2 Biodegradabilita PLGA [13]



6.3 Modifikácia PLGA

Modifikáciou PLGA, so zreteľom k využitiu ako materiálu na prípravu nosičov liečiv, je dosahované potlačenie limitov pri aplikácii. Za obmedzeniami v použití stojí absencia adekvátnych funkčných skupín. Na základe prebehnutých testov, s cieľom dosahovania vystupňovaného rozsahu a efektivity PLGA, je kladený dôraz na ovplyvnenie hydrofilite. Vo funkcii nosičov musí odpovedať adekvátnym požiadavkám, je teda formulovaná v odlišných formách a veľkostiach. [14]

Táto vlastnosť nesie možnosť ovplyvnenia vo viacerých smeroch. Vystupňovanie hydrofility vedie k dosiahnutiu lepšej konjugácie s cieľovým ligandom. Taktiež ovplyvňuje zadržanie lipofilného liečiva vo vnútri NP, kde s klesajúcou hodnotou táto schopnosť klesá. Vychytávanie mononukleárnym fagocytujúcim systémom v pečeni je touto vlastnosťou taktiež ovplyvnené. Organizmus rozpoznáva lipofilné nosiče ako telesá telu neprirodzené, následne tak dochádza k obopnutiu nosiča a jeho absorpcii fagocytujúcim systémom.

Vhodným nástrojom k vystupňovaniu hydrofility je konjugácia PLGA s biokompatibilným, dobre degradovateľným, vo vodnom prostredí rozpustným polymérom polyethylénglykolom (PEG). [15] [16]

6.4 Fyzikálne vlastnosti polymérov

Molekulová hmotnosť zasahuje do ďalších parametrov polyméru, a to do rozsahu degradácie a mechanickej pevnosti, rozpustnosti, kryštalinity, teploty skelného prechodu či viskozity v roztokoch. Všeobecne nižšia molekulová hmotnosť udáva nižšiu viskozitu a pevnosť v ťahu a rýchlejší rozpad. Pri špecifikácii cesty podania je preto potrebné zväžiť výber vhodného polyméru.

Stupeň kryštalinity ovplyvňuje modifikáciu mechanických vlastností polymérov. Amorfné formy sú náchylnejšie na rýchlejší rozpad než uniformne usporiadané polyméry s nesieťovanou štruktúrou. Zmesi oboch foriem, kryštalickej a amorfnej, sú pri nanočasticiach uprednostňované k doručovaniu liečiv, keďže separátne sa stretávame s negatívami. Zvlášť u kryštalických polymérov s krehkosťou, u amorfných polymérov s nízkou mechanicou pevnosťou.

Hydrofóbnosť, tento jav je ovplyvnený vlastnosťami ako molekulová hmotnosť, rozpustnosť monomérov vo vode a stupeň vetvenia. Prípravou nanočastíc z hydrofóbných polymérov dochádza k pomalšiemu uvoľňovaniu dopravovaného liečiva, ale i degradácie, a to z dôvodu zníženej penetrácie vody a vlhkosti. Naopak pri zavedení hydrofilných polymérov do nanočastíc

z hydrofóbných polymérov, dochádza k tvorbe pórov, čím je urýchlená degradácia, erózia a taktiež uvoľňovanie prenášanej látky. Relevantný je tak vplyv hydrofóbnosti polyméru ale aj liečiva.

Všeobecne je rozpustný v organickom rozpúšťadle polymér aj prenášaná látka. Faktorom rozpustnosti je ovplyvnené in vivo správanie nanočastíc a tiež metóda prípravy, kde je možné využiť fázovú separáciu alebo o/v emulznú metódu.

Interakcie liečiva a polyméru môžu vyústiť k zmenám vlastností polymérov ako rozsah uvoľňovania. Môžu byť zapríčinené fyzikálnymi a chemickými interakciami, spravidla ide o interakcie nábojov, hydrofobicitu a rozpustnosť. [17]

6.5 Metódy prípravy nanočastíc

6.5.1 Prehľad možných spôsobov prípravy

Portfólio prípravy nanočastíc je obsiahle množstvom spôsobov prípravy s odlišnosťami v rôznych parametroch. Pri polyesterových nanočasticiach sú hlavné spôsoby zatriedené do dvoch kategórií a to „bottom-up“, kde vstupnou surovinou sú monoméry a „top down“, pri ktorej sú nanočastice syntetizované z roztokov polymérov. Výber použitia možných techník je obsiahlejší a zahŕňa napríklad emulgáciu s odparovaním rozpúšťadla po predchádzajúcom rozpustení polyméru v organickom rozpúšťadle, mikroemulziu, nanoemulziu, emulziu bez emulgátora, vysolovanie či nanoprecipitačnú metódu. Výber vhodnej metódy je závislý na viacerých faktoroch ako požadovaná veľkosť, oblasť využitia, typ polymérnych systémov. Je dôležitý k dosiahnutiu požadovaných parametrov u vlastností nanočastíc. Jednotlivé metódy sú spojené s určitými kladmi, ale i záporni.

Emulzne-difúzna metóda pracuje na báze formulácie nanočastíc difúziou rozpúšťadla do vodnej fázy. Finálna veľkosť vzniknutých častíc je podmienená použitým emulgátorom, no zároveň aj jeho koncentráciou. S nižšou koncentráciou emulgátora rastie polydisperzita častíc a tým aj riziko agregácie častíc. V opačnom

prípade, teda pri vyššej koncentrácii emulgátora, narastá tendencia nižšej inkorporácie liečiva do nanočastíc. Dôvodom tohto javu sú silné interakcie medzi emulgátorom a liečivom. Kladnou stránkou je nevyužívanie toxických rozpúšťadiel, menšia spotreba energie. Medzi negatíva je možné zaradiť potrebný dlhší časový interval a citlivosť na zmeny koncentrácie polyméru.

Metóda vysoľovania sa líši od emulzne-difúznej metódy v neprítomnosti difúzie rozpúšťadla pri tejto metóde. Dôvodom je výskyt soli. Výsledkom je tvorba nanočastíc, kde nasledovnou centrifugáciou je vysoľovacie činidlo odstránené a vzorky sú tak čistené. Túto finálnu potrebu čistenia je možné označiť za negatívum. Nesúcou výhodou tejto metódy je tvorba nanočastíc pri vyššej koncentrácii polyméru. [18]

Metóda odparovania rozpúšťadla, tento spôsob prípravy sa vyznačuje prípravou roztokov polymérov v prchavých rozpúšťadlách za vzniku emulzií. Ucelené nanočastice sú následne separované ultracentrifugáciou a prečistené destilovanou vodou kvôli odstráneniu tenzidov. Finálny produkt je dostačujúco kvalitný, negatívom môže byť dlhší časový interval, najmä pri odparovaní rozpúšťadla. [18]

Spontánna emulgácia je v podstate úprava predchádzajúcej metódy, využíva rozpúšťadla s vodou miešateľné, ale zároveň vo vode nerozpustné rozpúšťadla, ktoré fungujú ako olejová báza. Na rozhraní dvoch fáz, vďaka spontánnej difúzii, vznikajú turbulentné medzipovrchové prúdy, tzv. interfaciálna turbulencia, ktorá vedie k vzniku malých častíc. Ako pozitívum tejto prípravy je jej jednoduchosť. [19]

Medzi časovo najvýhodnejšie metódy prípravy patrí práve emulzná polymerizácia. Možné sú dva typy prípravy. S obmedzenou početnosťou využitia je spôsob využívajúci organickú fázu ako vonkajšiu, a s tým späť väčšie množstvo možných toxických chemikálií. Čo túto metódu znevýhodňuje. [20]

Výhodnejšou cestou prípravy je použitie vodnej fázy ako vonkajšej fázy. Tento spôsob prebieha s emulgátorom ale aj bez neho. Pri prvom type, nazývanom ako konvenčná metóda, teda metóda s emulgátorom dochádza k dispergácii menej rozpustného polyméru vo vodnom prostredí za účasti emulgátora a radikálového iniciátora. Následne dochádza k solubilizácii monoméru do micel, kde prebieha polymerizácia. Dokončenie prebieha centrifugáciou, teda oddelením častíc a vyčistením.

Druhým typom je metóda emulzná nevyužívajúca emulgátor. Princípom je rozpustenie polyméru vo vonkajšej fázy a priebeh polymerizácie je podnietený optimálnym iniciačným činidlom, radikálom alebo iónom. Počas polymerizácie, alebo aj po, dochádza k formovaniu častíc a separácii. Negatívnou stránkou tejto metódy je vysoká polydisperzita častíc. [18]

6.5.2 Nanoprecipitačná metóda

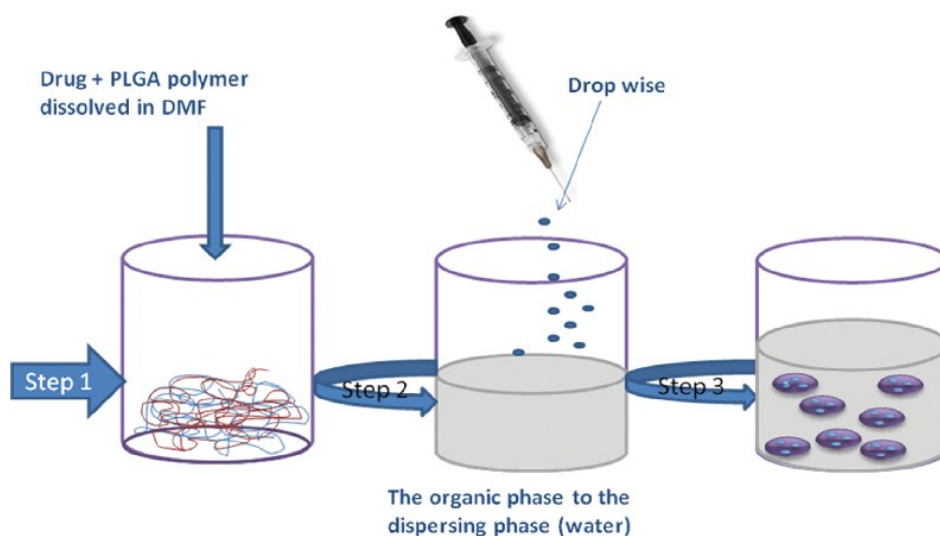
Medzifázové usádzanie alebo metóda premiestnenia rozpúšťadla, ako je tiež nazývaná nanoprecipitačná metóda, je známa už skoro 30 rokov. Otcem metódy, ktorý si ju v roku 1988 nechal patentovať je vedec Fessi H. Metóda využíva dve fázy. Organické médium ako rozpúšťadlo a vodnú fázu. Je možné použiť tiež dve organické fázy, alebo dve vodné fázy pokiaľ sú splnené podmienky rozpustnosti, nerozpustnosti a miešateľnosti.

Princípom je precipitácia polyméru. Polymér je rozpustný v organickom rozpúšťadle a precipituje po pridaní do vodného média, v ktorom už rozpustný nie je. Po rozpustení polyméru v stredne polárnom rozpúšťadle, miesiteľného s vodou, je táto fáza aplikovaná do fázy vodnej po kvapkách metódou „drop-wise“ za mierneho miešania alebo nárazovo, metódou „one-pot pouring“. Hneď nato nastáva spontánna tvorba nanosuspenzie, spôsobenej okamžitou difúziou rozpúšťadla. Na medzifázy vody a organického rozpúšťadla je polymér a dochádza k tvorbe nanočastíc. Limitujúcim obmedzením, ktoré môže nastať, je koalescencia, kedy dochádza k formovaniu väčších kvapôčok organického rozpúšťadla vo vode

a nedochádza tak k tvorbe častíc s veľkosťou nanometrov. Tento efekt nastáva, ak u rozpúšťadla nemiesiteľného s vodou nie je dostatočná rýchlosť difúzie a tým nedochádza k samovoľnej precipitácii. Hlavnými faktormi tejto metódy sú vzájomný pomer oboch fáz, rýchlosť prídania organickej fázy a rýchlosť miešania vodnej fázy. Zvýšenie enkapsulácie lipofilných liečiv je možné docieľiť pridaním vhodného oleja do organického rozpúšťadla, ktoré je následne uzavreté v dutine vzniknutých nanočastíc.

Mechanizmus tejto metódy popisujú dve líšiace sa teórie. Prvá je založená na princípe presýtenia, kde tvorba jednotných častíc je podmienená oddelením častíc medzi krokmi nukleácie a rastom častíc. Rýchlosť týchto krokov ovplyvňuje konečnú veľkosť častíc, rýchla nukleácia závislá na presýtení a pomalá rýchlosť rastu častíc sú považované za výhodné podmienky. Oddelenie častíc medzi dvoma stupňami, teda nukleáciou a rastom častíc, je potrebné k dosiahnutiu získania uniformných častíc. Odlišná teória je založená na princípe rozdielneho povrchového napätia medzi vodnou fázou a fázou organického rozpúšťadla, čím vzniká gradient medzifázového napätia. Ten spôsobuje tepelnú nerovnosť a turbulencie, čím dochádza k nútenému mieseniu dvoch kvapalín. Na povrchu organickej fázy má polymér sklon k agregácii. Tvorba nanočastíc je teda spôsobená agregáciou polyméru v stabilizovaných kvapkách emulzie. V tejto teórii nie sú zahrnuté zvyšné dva stupne, nukleácia a rast nanočastíc. [21] [22]

Obrázok 3 Metóda nanoprecipitačnej prípravy spôsobom „dropwise“ [23]



Medzi klady nanoprecipitačnej metódy patrí jednoduchosť prípravy, pri ktorej nie je nutné využitie vysokohomogenizačných techník či surfaktantov a možnosť použitia rozpúšťadiel s minimálnou toxicitou. Ďalej schopnosť enkapsulovať menej hydrofóbne liečivá, postačujúca nižšia rýchlosť centrifugácie na zhromaždenie častíc s vysokým výťažkom a taktiež vznik častíc s nízkou polydisperzitou, získaných bez vonkajších zdrojov energie. Kľúčovou nevýhodou je obťažnejšie nastavenie dávkovacieho procesu s dokonale reprodukovateľným miešaním. Dokonca aj parameter ako vzdialenosť medzi magnetickým miešadlom a bodom vstrekovania organickej fázy môže mať značný vplyv na priemernú veľkosť častíc a polydisperzitu. Možná aglomerácia častíc je riešená pomalým pridávaním organickej fázy do fázy vodnej a výberom vhodného systému rozpúšťadiel, prípadne tenzidu. [22]

6.6. Vlastnosti nanočastíc ovplyvňujúce ich využitie

Systémy skladajúce sa z nosiča a liečivej látky, vyznačujúce sa riadeným uvoľňovaním a cieľovou distribúciou, oplývajú vlastnosťami podieľajúcimi sa na ovplyvnení týchto javov. Účinok a taktiež interakcia s bunecnou membránou je podmienená povrchovým nábojom nanočastíc. Pre schopnosť uvoľnenia liečiva a odbúrania častíc v organizme sú ovplyvňujúcimi faktormi tvar a veľkosť, fyzikálny stav inkorporovaného liečiva, štruktúra a molekulová hmotnosť polyméru.

6.6.1 Veľkosť

Vlastnosťou častíc, smerodajnou pri ovplyvnení kľúčových vlastností, je veľkosť častíc. Ovpľvňuje liečivo z hľadiska jeho in vivo distribúcie, jeho nasledovný osud v organizme a taktiež schopnosť cieľného transportu liečiva. Podiel ovplyvnenia nesie na inkorporácii a uvoľnení liečiva, stabilite nanočastíc a toxicite. Potenciálne negatívnym faktorom môže byť riziko agregácie behom skladovania, dopravy či dispergácie.

Obecne je výskyt častíc spojený s rizikom rozpoznania imunitnými bunkami, a následnou fagocytózou. Častice s rozmermi nad rozmedzím 10-200 um sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď a zápal.

Vlastnosť, veľkosť častíc, je v priestore charakterizovaná jednotkou dĺžky. Z rovnako veľkých častíc by sa materiál skladal za dokonalých podmienok, avšak reálne je tvorený z častíc, ktorých veľkosť sa pohybuje v určitom rozmedzí. K popisu sa preto uplatňuje distribúcia veľkostí častíc, ktorá vyjadruje percentuálne zastúpenie častíc vzhľadom k ich veľkosti. [24]

6.6.1.1 Metóda DLS

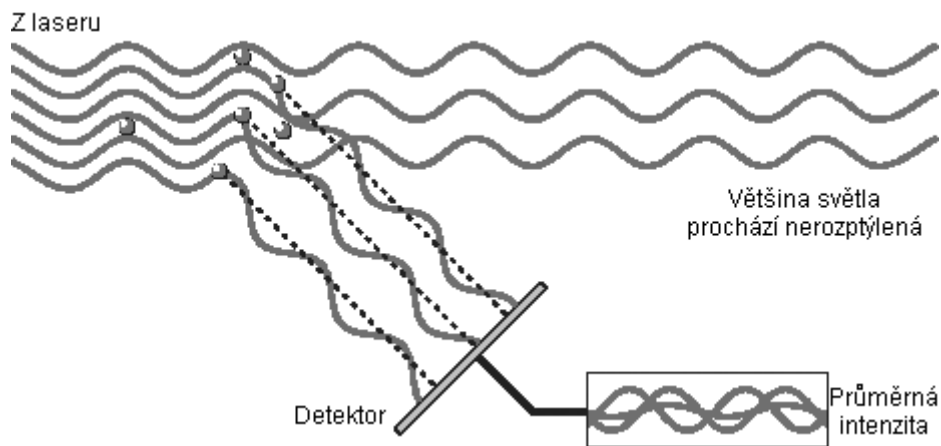
Najpoužívanejšou metódou pri meraní veľkosti nanočastíc je metóda optická, dynamický rozptyl svetla (Dynamic Light Scattering – DLS). Určenie veľkosti pri tejto metóde prebieha meraním rýchlosti Brownovho pohybu častíc. Princípom merania za použitia DLS je osvetlenie častíc laserom a vyhodnocovanie fluktuácie intenzity v rozptýlenom svetle. Výsledná hodnota veľkosti je vzťahnutá na priemer gule, ktorá difunduje určitou rýchlosťou.

V princípe merania veľkosti dochádza k vygenerovaniu laserového lúča emitorom, ten pri prechode kvietou obsahujúcou vzorku je rozptýlený povrchom častíc vo vzorke. Osvetlením malej častice laserom daná častica rozptýli svetlo v rozličných smeroch. Šírenie vln zobrazuje bližšie Obr.4.

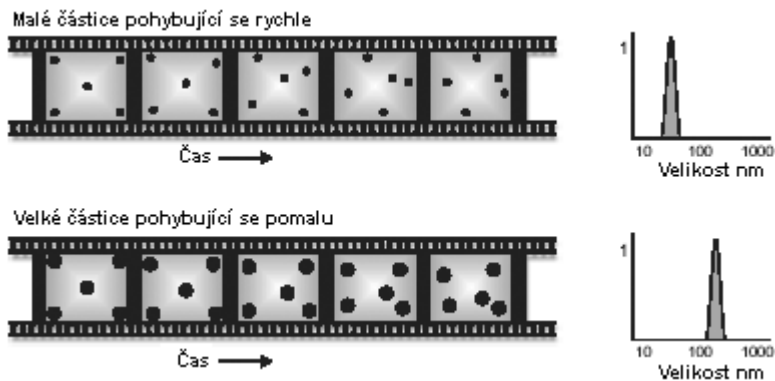
Brownov pohyb, charakterizovaný ako náhodný, neusporiadaný, neustály pohyb častíc s veľkosťou 1 μ m a menšou. Vzniká na základe neorganizovaných zrážok s molekulami tekutiny, ktoré obklopujú častice. K určeniu veľkosti je potrebná rýchlosť pohybu. Preukázaný je rýchlejší pohyb malých častíc v kvapaline oproti veľkým časticiam. Na podklade Brownovho pohybu častíc je prítomné zoslabovanie a zosilňovanie rozptylu. Zosilneniu odpovedá rýchlejší pohyb charakteristický pre menšie častice a naopak (vid'. Obr.6). [25] Vďaka nezastavujúcemu pohybu, ak v úzkom časovom rozmedzí spravíme dva obrázky vzorku, je možné pozorovať presun častice. Môžu nastať dve situácie. Prvou je

dostatočná zmena pohybu a polohy, prítomnosťou malých častíc. Druhou situáciou je prítomnosťou veľkých častíc spôsobená iba malá zmena polohy a pohybu. Tieto zmeny sú detekované zariadením a namerané údaje spracované pomocou Stokes-Einsteinovej rovnice. [26]

Obrázok 4 Rozptýlené svetlo po osvetlení častíc [26]



Obrázok 5 Schéma rýchlosti pohybu malých a veľkých častíc [26]



Zloženie obrazu škvŕn reprodukuje oblasti jasného svetla, ktoré sú vytvorené tam, kde svetlo rozptýlené časticami dopadne na detektor s rovnakou fázou a konštruktívne interferuje za vzniku jasnej škvŕny. Na mieste, kde nedochádza k žiadnej detekcii svetla sú tvorené tmavé oblasti. Zdanlivý pocit

pohybu škvŕn plynie zo stáleho pohybu častíc. Fluktuácia intenzity svetla, teda pokles intenzity svetlých a tmavých oblastí vzniká podkladom pohybu častíc okolo.

Tento jav zachytáva prístroj, zo získaných údajov o rýchlosti fluktuácie a dochádza k výpočtu veľkosti častíc. [26]

6.6.2 Povrchové vlastnosti nanočastíc

Povrchové vlastnosti zohrávajú rolu v ovplyvnení biodistribučného systému. Po intravenózne aplikácii majú nanočastice tendenciu byť rozoznané imunitným systémom. Môže dochádzať k rozsiahlej opsonizácii s následným vychytávaním mononukleárnym fagocytárnym systémom, ktorý sa vyskytuje hlavne v pečeni, pľúcach, slezine a kostnej dreni. Tento jav je podmienený hydrofobicitou povrchu častíc. Je tak žiadúce, ak nie je cieľom pôsobiť práve na RES systém, ovplyvniť rozsah opsonizácie a predĺženie cirkulácie in vivo, čím dôjde k možnosti rastúceho úspechu riadenej distribúcie. Naskytujúcimi možnosťami sú tak povrchová úprava nanočastíc alebo prepojenie nanočastíc s hydrofilnými polymérmi.

Povrchový náboj častíc je charakterizovaný zeta potenciálom, ktorý odráža elektrický potenciál častíc. Obecne sú stabilné suspenzie tvorené časticami s hodnotami zeta potenciálu +/- 30 mV, vďaka nemožnosti zoskupeniu častíc daným ich povrchovým nábojom. Povrchový náboj nanočastíc je dôležitý taktiež z hľadiska interakcie a vychytávania nanočastíc. Pozitívny náboj na povrchu častíc zvyšuje rozsah internalizácie kvôli elektrostatickej interakcii medzi pozitívnym nábojom častíc a negatívnym nábojom v bunkových membránach. Navyše, v závislosti od povrchového náboja môžu častice vykazovať odlišnú lokalizáciu vo vnútri buniek, to znamená, že pozitívne náboje sú schopné uniknúť z lyzozómov s perinukleárnou lokalizáciou, zatiaľ čo negatívne a neutrálne nábojové častice sú lokalizované po internalizácii v lyzozómoch. PLGA nanočastice majú negatívny náboj, ktorý môže byť modifikovaný na neutrálny alebo pozitívny funkcionalizáciou s rôznymi polymérmi, napr. chitosanom. [27]

6.7 Zabudovanie látky do NP

Úspešnosť systému je definovaná možnosťou naviazania liečivej látky vo väčšom množstve na nanočastice za súčasnej minimalizácie množstva použitého nosiča nutného k podaniu liečiva. Postup môže prebiehať dvoma spôsobmi, inkorporačným a absorpčným. V prvom prípade prebieha inkorporácia liečivej látky súčasne s prípravou a vznikom NP. Optimalizácia je dosahovaná vhodne zvoleným množstvom monoméru dostupného pre inkorporáciu liečivej látky, keďže bola preukázaná závislosť množstva inkorporovanej liečivej látky na jej koncentrácii v roztoku a koncentrácii monoméru v roztoku. Týmto spôsobom je dosiahnutý vyšší záchyt liečivej látky v porovnaní s metódou absorpčnou, kde princípom je vytvorenie a inkubovanie NP v roztoku liečivej látky a až následná absorpcia liečivej látky na NP. Absorpčná kapacita je závislá na hydrofobicite polyméru a špecifickom povrchu častice. Vplyv iných faktorov ako molekulová hmotnosť, prítomné funkčné skupiny či rozpustnosť liečiva v prostredí pomocnej látky taktiež rozhodnú o vhodnej enkapsulácii a uchytení liečiva. Dosahovanie vhodnej kvantity liečiva v nanočasticách je možné taktiež účinným ovplyvňovaním fyzikálno-chemických vlastností. Spôsobov modifikácie je viacero. Zvýšenie kvantity liečiva je možné doceliť napr. prevodom hydrofilných molekúl na hydrofóbnejšie. Ako napr. molekuly vo forme solí na odpovedajúce báze alebo kyseliny.

Je preukázané, že ako pozitívny prístup sa javí inkorporovať pri pH blízkeho elektrického bodu liečiv, proteínov, makromolekúl. Taktiež využitie iónových interakcií medzi materiálom a liečivom, čo vedie k zvýšeniu úspešnosti. Zabudovanie liečiv sa prejavuje aj ako faktor ovplyvnenia uvoľňovania liečiv. [28] [29]

6.8 Uvoľňovanie inkorporovanej látky

Pri vývoji aplikovateľného liečivého prípravku je podstatnou zložkou uvoľňovanie liečivej látky s následnou biodegradáciou. Profil uvoľňovania závisí

na viacerých faktoroch, napr. desorbcií liečivej látky z povrchu, difúzií cez matricu, kombinácii erózie a difúzie, ale taktiež na charaktere biodistribučného systému.

Difúzia a erózia sú cesty uvoľnenia liečiva z polyméru u PLGA nanočastíc. Veľkosť, hydrofilita a náboj patria medzi vlastnosti schopné ovplyvniť rozsah difúzie liečiva, cez parameter difuzivity látky a časticový koeficient. Samotné liečivo taktiež ovplyvňuje úroveň uvoľňovania. Hydrofóbne liečivo schopnosťou zamedziť difúzií vody do častice, a tým obmedziť fázu degradácie polyméru. Naopak hydrofilné liečivo obsiahnuté v časticiach vo vyššom množstve umožní prienik vody do častice a dochádza k vytvoreniu poréznej polymérovej siete.

6.9 Cielená distribúcia

Doručenie na cieľové miesto, tzv. targeting, prebieha aktívne po prepojení prenášaného systému s cieľovým miestom, vďaka priťahovaniu povrchovo nesených rozpoznávacích elementov NP špecifickými receptormi. Prebieha na základe aplikácie modifikácie NP pomocou ligandov špecifických pre cieľové miesto. Alebo inkorporáciou liečivej látky do nanočastíc je dosiahnuté cieľové miesto pasívne, vďaka difúzií. Je ovplyvnený vlastnosťami NP a taktiež cestou podania. Pasívny targeting je možné využiť pri doručení liečiv do orgánov RES, keďže NP sú v krvnom riečisku odstraňované zväčša makrofágmi. Vychytávané sú touto cestou zväčša častice s veľkosťou 6 μm – 100 nm. Väčšie častice (100–300 nm) sú vychytávané pečenou a slezinou, zatiaľ čo menšie častice (10–30 nm) sú bezprostredne vylúčené renálnou exkréciou. Špecifický, cielený presun liečiva vedie tak k možnosti zníženia incidence vedľajších účinkov, zvýšeniu koncentrácie v cieľovom mieste a ochrane pred metabolickou biodegradáciou. [17]

6.10 Zeta potenciál

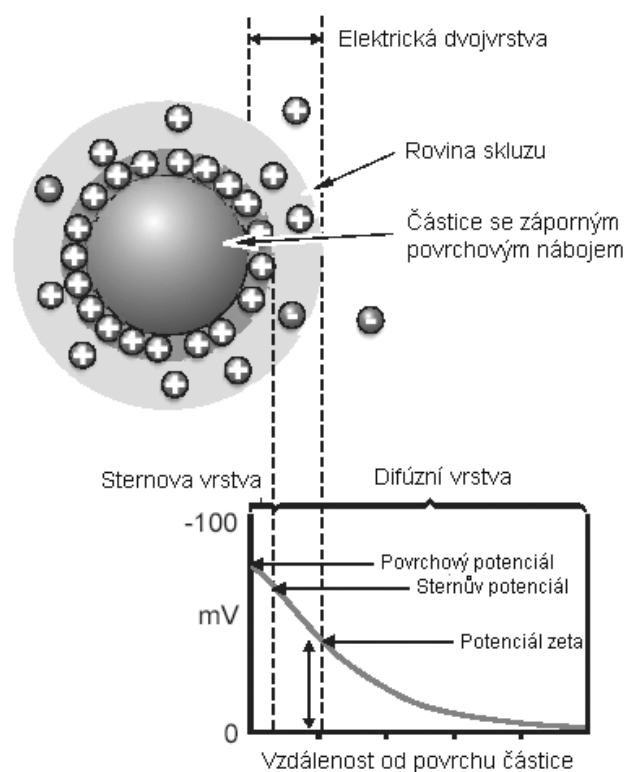
Odborný pojem, popisujúci dej elektrokinetického potenciálu v koloidných disperziách, je nazývaný ako zeta potenciál. Často býva aplikovaný pri hodnotení povrchu koloidov. Kvapalná vrstva obopínajúca časticu sa skladá z dvoch oblastí.

Vnútorou oblasťou, zvanou Sternova, sú pevne viazané ióny. Zatiaľ čo vonkajšiu oblasť, difúziu, tvoria ióny slabšie viazané s existenciou teoretickej vnútornej hranice, v ktorej sú častice a ióny stabilnou časťou. Pohyb častice je prevádzaný pohybom týchto iónov, ale nedochádza k prechodu všetkých iónov za hranicu. Táto hranica, povrch hydrodynamického šmyku, je nazývaná tiež rovinou sklzu. V tejto medzipovrchovej dvojvrstve je prítomný elektrický potenciál, zeta potenciál. Takpovediac ide o rozdielnosť potenciálov medzi disperzným médiom a vrstvou kvapaliny silovo priťahovanej k dispergovanej častici. [30]

Nedochádza k možnosti priameho merania zeta potenciálu. Meranie prebieha vložení meranej disperzie do elektrického poľa, kde častice so zeta potenciálom smerujú k elektróde s opačným nábojom. S narastajúcou hodnotou zeta potenciálu rastie rýchlosť tohto pohybu. Zeta potenciál môže byť meraný zetasizerom, pomocou elektroforetickej pohyblivosti a následnej aplikácie Henryho rovnice použitej k výpočtu.

Zeta potenciál je dôležitý k porozumeniu stability suspenzií. Častice v suspenziách, ktoré majú veľký negatívny alebo pozitívny zeta potenciál sú náchylné k odpudzovaniu, chýba sklon k flokulácii. Naopak pri veľmi nízkom zeta potenciále rastie náchylnosť častíc k aglomerácii a flokulácií, ak chýba sila odpudzujúca častice. Rozhranie oddeľujúce stabilné suspenzie od nestabilných je +30mV a -30mV, častice so zeta potenciálom nad a pod týmto rozmedzím sú definované ako stabilné. Na hodnotu zeta potenciálu vplýva aj pH, pri nízkych hodnotách nadobúda pozitívne hladiny, naopak pri vyššom pH sa zeta potenciál pohybuje v negatívnom rozsahu. Pri nulovej hodnote zeta potenciálu, teda v izoelektrickom bode, koloidný systém naberá najnižšiu stabilitu.

Obrázok 6 Popis zeta potenciálu [26]



6.11 siRNA

6.11.1 Stanovenie pojmu siRNA

Malá interferujúca ribonukleová kyselina, skratkou siRNA, má definovanú štruktúru dvojláčkovej RNA zloženej zvyčajne z 20-25 nukleotidov. Nukleotidy sú vo forme s fosforylovanými 5'koncami a hydroxylovanými 3'koncami s 2-3 nukleotidovým presahom. [31] Štruktúra je usmernená enzymatickým účinkom proteínu dicer, ktorý je schopný hydrolyticky štiepiť RNA na zmienenu siRNA a taktiež microRNA. Napriek určitej podobnosti sú badateľné významné odlišnosti, zatiaľ čo miRNA je odvodená zvyčajne zo „silence“ génov represiou translácie a nie je úzko špecifická, tak siRNA má vysokú cieľovú špecifickosť podmienenú plnou komplementaritou. [32]

Obrázok 7 Štruktúra siRNA [33]



6.11.2 Pôvod siRNA

Primárne bola siRNA ponímaná ako vychádzajúca z čisto exogenného pôvodu, dnes už je ale preukázané, že vzniká i prepisom časti genómu, či štiepením istých častí molekúl RNA.

Prvýkrát bola siRNA a jej úloha v posttranskripčnom tlmení génov objavená v rastlinách, skupinou Davida Baulcomba v laboratóriu Sainsbury v roku 1999. [34] Nasledovalo zistenie, že syntetická siRNA je schopná indukovať RNA interferenciu (RNAi) v cicavčích bunkách Tomashom Tuschlom. To následne viedlo k nárastu záujmu o využitie RNAi v biomedicínskom výskume a vývoji liečiv. Začal sa rozmáhať vývoj terapie siRNA s nanočasticami, organickými i anorganickými. [35]

6.11.3 Syntéza siRNA

Syntetické siRNA sú obvykle vytvárané metódami chemickej syntézy na pevnej fázy, poskytnú totiž vysoko čisté, stabilné a ľahko modifikovateľné siRNA. Výroba je prevažne zameraná na chemickú syntézu jednoreťazcových oligonukleotidov, ktoré hybridizujú do dvojvláknovej formy. Táto nemodifikovaná forma je hlavnou efektorovou formou RNAi. Kvôli zmierneniu prekážok terapeutického použitia siRNA sú prevádzané chemické modifikácie na úrovni sekvencie alebo štruktúry. [36] [37] Pri úpravách chemickými modifikáciami je potrebné zohľadniť určité parametre, ktoré by mali ostať zachované, a to voľná hydroxylová alebo fosfátová skupina na 5' konci „sense“ reťazca aby ostala zachovaná aktivita štiepenia siRNA. [38] Selekcia adekvátneho modifikačného modelu závisí od špecifickej sekvencie siRNA, spôsobu prenosu a účelu aplikácie. [36]

6.11.4 Funkcia siRNA

Malá interferujúca RNA (siRNA) je súčasťou nekodujúcich RNA (ncRNA), ktoré regulujú a ovplyvňujú funkciu RNA, génov a proteínov. Najznámejšie skupiny malých ncRNA, menovite siRNA a mikroRNA (miRNA), sú hlavnými mediátormi RNAi.

siRNA ako syntetické mediátory RNAi sú špecificky navrhnuté k tlmeniu expresie cieľových orgánov. Do bunky alebo organizmu môžu byť zavedené exogénne, v krátkych formách alebo vo forme dlhých molekúl dsRNA. Následne sú spracované endogénnymi RNAi mechanizmami. [39] [40] Na rozdiel od miRNA, siRNA je schopná viazať sekvencie s dokonalou alebo takmer dokonalou komplementaritou a spôsobuje štiepenie cieľov namiesto translačného potlačenia. [41]

Schopnosťou efektívne cieleného utlmenia génovej expresie sa siRNA stala nepostrádateľným nástrojom využívaným k štúdiu funkcie jednotlivých génov. [41] [42] siRNA je často využívaný nástroj RNA interferencie k indukovaniu krátkodobého tlmenia génov kódujúcich proteíny, pri inhibícii rôznych signalizačných dráh v proliferácii buniek a apoptóze.

6.11.5 Distribúcia siRNA

Prenos siRNA k cieľovým štruktúram je obmedzený mnohými bariérami na rôznych úrovniach. Predtým, ako môže byť použitá s plným potenciálom, je potrebné prekonať problémy týkajúce sa jej dodávania. Hlavným problémom, ktorý obmedzuje použitie siRNA je krátky plazmatický poločas pohybujúci sa v rozmedzí 15 minút až 1 hodiny, zapríčinený rýchlou kinetikou vylučovania a degradáciou nukleázami. [43] [44] Aby došlo k obmedzeniu alebo zabráneniu tohto deja, využívajú sa chemické modifikácie, ktoré chránia siRNA pred degradáciou nukleázami bez ovplyvnenia jej funkcie.

Dôležitými nástrojmi ochrany siRNA počas prenosu do cieľových tkanív sú nanonosiče, ktoré ju chránia pred rýchlou renálnou exkréciou i štiepením nukleázami. [36] [45] Sú tak sľubným prístupom k prekonaniu problémov súvisiacich so stabilitou a cieľovou distribúciou siRNA. Ukázalo sa, že nanočastice môžu byť endocytované a do určitej miery môžu uniknúť endozómom pred degradáciou a následne uvoľňovať liečivo, hoci sa jedná o mechanizmus, ktorý sa prejavuje v cytosole. Predpokladá sa, že PLGA sa pomaly degraduje a udržuje uvoľňovanie enkapsulovanej siRNA, ktoré je dôležité z hľadiska terapeutických účelov. Konceptia nanonosičov tak poskytuje príležitosť pre celú novú triedu liečiv. [46]

6.12 RNAi

RNA interferencia je mechanizmus, v ktorom molekuly dvojvláknovej RNA (dsRNA) umlčujú posttranskripčnú expresiu homológnych cieľových génov. Prvýkrát bol tento proces popísaný v rastlinách koncom 80. rokov [47] a neskôr v roku 1998, ho v *Caenorhabditis elegans* opísal Andrew Fire [5]. V roku 2001 boli preukázané podobné procesy v bunkách cicavcov, čo viedlo k vzniku nových nástrojov k štúdiu génovej funkcie. [35]

Molekuly siRNA sú transfekované do buniek, kde siRNA reaguje s multiproteinovým komplexom RISC, ktorý rozpletá dvojvláknovú štruktúru. Jedno vlákno ostáva spojené s RISC a naviaže sa na komplementárnu sekvenciu mRNA, spojenie je dané mierou komplementarity. Ak je komplementárna iba predná časť siRNA, dochádza k dočasnému spojeniu, a tým k časovo obmedzenému potlačeniu syntézy proteínu, ktoré je po odpojení siRNA obnovené. Ak je komplementarita úplná, tak aktivovaný proteín a komplex nukleovej kyseliny môžu vyvolať utlmenie génu väzbou, prostredníctvom dokonalej komplementarity k jedinej cieľovej sekvencii mRNA, a tým ju zamerať na štiepenie a degradáciu.

Tento mechanizmus umožňuje cieľový špecifický „knockdown“ génov, no napriek tomu ostáva určité percento možnosti i neúmyselného vyradenia génov, ktoré nie sú priamo cieľené. K zníženiu tohto rizika sú využívané chemické

modifikácie siRNA [48], ktoré sa taktiež praktikujú za účelom zlepšenia terapeutických vlastností, ako je zvýšená aktivita, zvýšená sérová stabilita, presnejšie zameranie cieľov a znížená imunologická aktivácia. [35]

Túto endogénnu dráhu využívajú všetky eukaryotické bunky na tlmenie génov po transkripcii. Vyhnutie spracovaniu enzýmom dicer je možné pri zavedení syntetickej siRNA priamo do bunky. [49] [50]

6.13 Systémy obsahujúce siRNA

Od roku 2001 vďaka podloženým poznatkom o schopnosti posttranskripčného tlmenia génov elimináciou cieľovej mRNA v bunkách cicavcov, si siRNA získala postavenie nielen v oblasti výskumu, ale aj ako perspektívne molekulárne farmakum. Súčasná medicína kladie dôraz na možnosti liečby priamo v mieste vzniku ochorenia. Práve siRNA vyniká výhodným parametrom, a to dokonalým párovaním báz s bázami cieľovej mRNA pri cieleňom tlmení génov cez RNAi. K terapeutickým účelom, vďaka súčasným znalostiam génových funkcií a značnému množstvu genetických a nádorových ochorení a ďalších nežiadúcich fenotypov, je predpoklad využitia siRNA terapeutík značne vítaný.

Potenciálne široký záber využitia je limitovaný najmä z hľadiska komplikovaného prostredia organizmu, teda problémom efektívneho transportu, následnej stability, eliminácie a imunogenity. Voľná siRNA je nositeľom nedostatkov v podobe transportu. Limitným prvkom je veľkosť, makromolekuly ako siRNA totiž voľne neprechádzajú medzibunkovými priestormi, k tomu dochádza iba v oblastiach perforovaného endotelu. Taktiež negatívny náboj, ktorý zapríčiňuje elektrostatické odpudzovanie medzi negatívne nabitým povrchom plazmatických membrán buniek a jej negatívnym nábojom.

Optimálne systémy dodávania siRNA by mali byť biokompatibilné, biologicky odbúrateľné a neimunogénne. Systémy by mali poskytovať účinné dodávanie siRNA do cieľových buniek alebo tkanív s ochranou aktívnych

dvojret'azcových siRNA produktov pred napadnutím sérovými nukleázami. Taktiež by mali poskytovať cieleňú distribúciu špecifickú pre tkanivo po systémovom podávaní, pričom by sa mali vyhýbať rýchlej hepatálnej alebo renálnej clearance. Po dodaní do cieľových buniek prostredníctvom endocytózy by systémy mali podporovať endozomálne uvoľňovanie siRNA do cytoplazmy, čo umožní interakciu siRNA s endogénnym RISC. K prenosu siRNA sú využívané rôzne nanonosiče, na základe povrchového náboja, veľkosti, hydrofóbnosti oplývajú jedinečným profilom. [51] [52] Polymérne nanonosiče sú vhodní adepti aplikácie in vivo z hľadiska bezpečnosti. [53]

7. Experimentálna časť

7.1 Použité prístroje

Magnetická miešačka IKA - WERKERT, 100 – 1000 ot./min

Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments

Váhy Kern 440 – 35N, max 400 g, d = 0,01 g

Váhy Kern PLE, max 420 g, d = 0,01 g

Váhy Kern FKB, max 8100 g, d= 0,05 g

Analytické váhy Kern, max 220 g , d = 0,0001 g

Automatické pipety Eppendorf Research plus

Ultrazvuková čistička BANDELIN SUPER 10P

Centrifuga Fischer Scientific Micro 7

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

Fluorimeter AMINCO-Bowman Series 2, Thermo electron corporation

pH meter - Hanna instruments HI 221

7.2 Zoznam použitých chemikálií a ich skratky

DMSO – dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, CAS: 67-68-5

AP – aqua purificata, FAF UK HK

CET - cetrimid (N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid), Merck,
CAS: 8044-71-1

DMAB - Didodecyldimethylammonium bromide, CAS: 3282-73-3

TRIZMA – Tris(hydroxymethyl)aminomethan, CAS: 77-86-1

HCl 35% - Kyselina chlorovodíková, CAS: 7647-01-0

siRNA - oligomér (25 nukleotidov) – Generi Biotech

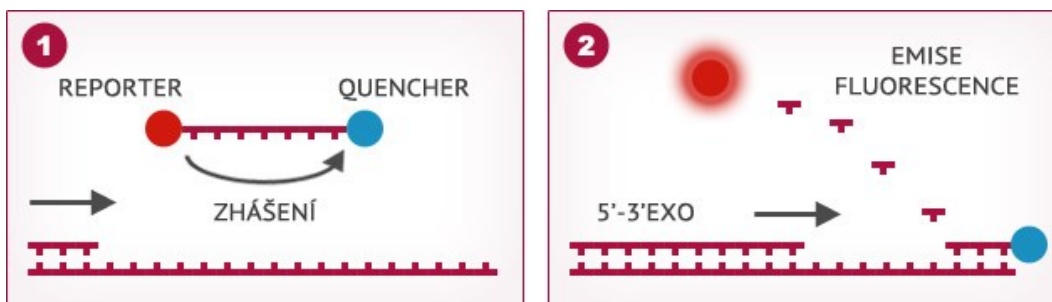
T3 – terpolymér kyseliny DL-mliečnej a kyseliny glykolovej vetvený na 3% tripentaerytritolu, originálne syntetizovaný FAF UK HK

A2 – terpolymér kyseliny DL-mliečnej a kyseliny glykolovej vetvený na 2% kyseliny polyakrylovej, originálne syntetizovaný FAF UK HK

7.3 Charakteristika použitého oligoméru

Technológia duálne značených hydrolyzačných sond využíva 5' a 3' exonukleázovú aktivitu Tag DNA polymerázy k štiepeniu sondy značenej na koncoch párom fluoreskujúceho (reportér) a nefluoreskujúceho fluoroforu (quencher = zhášač). Sonda je pripravená tak, aby jej sekvencia bola komplementárna k určitej cieľovej sekvencii. Ak je sonda v neaktívnom stave oba fluorofory sú v priestorovej blízkosti a quencher pohlcuje fluorescenčné žiarenie emitované reportérom. Po hybridizácii sondy s cieľovou sekvenciou, je štiepená prostredníctvom 5' - 3' exonukleázovej aktivity Tag DNA polymerázy, s následným oddelením fluoroforov a zvýšeniu fluorescenčnej aktivity reportéru. [54]

Obrázok 8 Duálne značené hybridizačné sondy [54]



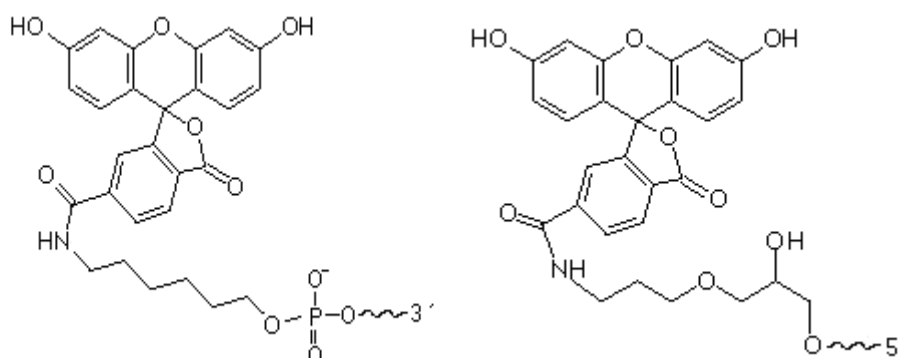
Sondy sú zvyčajne značené reportérom na 5'konci a quencherom na 3'konci. Voľba reportéra závisí na excitačných a emisných kanáloch použitého real-time PCR cycleru (takmer každý real-time PCR cycler disponuje kanálom pre fluorescein – FAM). Ako zhášače sa obvykle využívajú quenchery typu BHQ (Black Hole Quencher), ktoré zhášajú rozsiahle spektrum fluoroforov a nemajú autofluorescenciu.

Pri príprave oligoméru boli použité systémy s oligonukleotidovými sondami zaisťujúcimi vysokú špecifitu. V prípade oligonukleotidových sond prebieha zacielená detekcia určitej sekvencie v dvoch krokoch. V prvom na úrovni väzby

„primerov“ a v druhom na úrovni väzby sondy na komplementárnu sekvenciu vo vnútri amplifikovaného regiónu, čím je zaistená vysoká špecifickosť. Pokiaľ teda sonda zvýši svoju fluorescenčnú aktivitu, je to vždy preto, že špecificky hybridizovala s produktom amplifikácie. [54]

K značeniu použitého oligoméru bol využitý 6-karboxyfluoresceín (6-FAM). Ide o fluorescenčné farbivo s absorpčnou vlnovou dĺžkou 495 nm, emisné maximum je pri hodnote 520 nm. Molekula karboxyfluoresceínu je molekula fluoresceínu s pridanou karboxylovou skupinou. Komerčne dostupný FAM je zmes dvoch izomérov, 5-FAM a 6-FAM a správny názov je 5(6)-karboxyfluoresceín. 6-FAM môže byť naviazaný k oligonukleotidu na 5' konci i na 3' konci. Ide o čistý izomér, ktorý patrí k najpoužívanejšej fluorescenčnej modifikácii oligonukleotidov a je kompatibilný s väčšinou fluorescenčných zariadení. Používa sa často ako stopovacie činidlo, pri sekvenovaní nukleových kyselín a značení nukleotidov. [55]

Obrázok 9 Možnosť naviazania 6-FAM k oligonukleotidu na 3' a 5' konci [55]



7.4 Charakteristika použitých polymérov

Nanočastice boli pripravené pomocou polymérov A2, T3. Tieto polyméry boli pripravené modifikáciou polyméru PLGA pomocou vetviacej zložky, ide tak o terpolyméry s rozvetvenou štruktúrou. V reakčnej zmesi bolo vždy ekvimolárne množstvo kyseliny mliečnej (48,5 %), kyseliny glykolovej (48,5 %) a vetviaci monomér v množstve odpovedajúcom číslu označenia. Kyselina polyakrylová (2000 g/mol) v koncentrácii 2 % je vetviacou zložkou v polyméri A2, ktorý má

voľné karboxylové konce reťazcov PLGA, esterová väzba vzniká medzi karboxylovou skupinou kyseliny polyakrylovej a hydroxylovými koncami reťazca PLGA. Vetviacou zložkou polyméru T3 je molekula tripentaerythritolu 3 %, kde miestom vzniku esterovej väzby sú karboxylové konce PLGA a hydroxylové skupiny tripentaerythritolu, polymér T3 má voľné najmä hydroxylové konce PLGA. PLGA, polymér lineárnej štruktúry, je bližšie charakterizovaný v teoretickej časti.

Číselné (M_n) a hmotnostné (M_w) priemery molárnych hmotností, hmotnostný priemer vnútornej viskozity ($[\eta]_w$) a vetviaci pomer $g'(M_w)$ sú popísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Číselné a hmotnostné pomery polymérov A2, T3

Vzorka	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	$[\eta]_w$ (mL/g)	$g'(M_w)$
A2	8600	14400	8,9	0,54
T3	5300	17400	7,7	0,43

7.5 Príprava nanočastíc

Príprava roztokov polymérov

Polyméry boli uskladnené v exsikátore. Boli rozdrobené v trecej miske, kvôli vysokej viskozite pri laboratórnej teplote samostatne. Následne bolo navážené potrebné množstvo rozpustené pri 50 ° C za miešania v DMSO do vzniku číreho roztoku.

Vonkajšia fáza

Do 25 ml kadičky s umiestneným krížovým magnetickým miešadlom bolo automatickou pipetou napipetovaných 10,0 ml čistenej vody. Kadička bola následne umiestnená na magnetickú miešačku.

Vnútoraná fáza

siRNA sa uchovávala v mrazničke pri konštantnej teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred prípravou bola v časovom predstihu jednej hodiny z mrazničky vybratá a postupne šetrne zahrievaná pri konštantnej teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vo vodnom kúpeli po dobu nasledujúcej pol hodiny. Po dosiahnutí optimálneho stavu bolo do ampulky s siRNA pridané potrebné množstvo dimethylsulfoxidu, v ktorom sa siRNA rozpustila. Súbežne boli do skúmaviek napipetované roztoky polyméru, použité boli TT a AP polyméry, kde každý bol pripravovaný v koncentráciách 1%, 3%, 5%, 7%. Vzorky jednotlivých polymérov boli pripravované riedením zásobného 7% roztoku s DMSO. Po rozpustení siRNA v DMSO bolo automatickou pipetou odpipetované potrebné množstvo a pridané do skúmavky s určitým polymérom.

Príprava nanosuspenzie

Kadička s vonkajšou fázou a miešadlom bola uložená na magnetickú miešačku, kde za stáleho miešania bola pridávaná vnútoraná fáza dvoma spôsobmi, a to metódou „dropwise“ (pridávanie po kvapkách) a metódou „one-pot“ (pridanie naraz). Miešanie suspenzie bez prerušenia trvalo ďalej 30 minút, po domiešaní bola odobraná časť vzniknutej nanosuspenzie pre meranie veľkosti a ZP.

7.6 Meranie veľkosti a zeta potenciálu nanočastíc

Prístrojom Zetasizer Nano ZS bola u vytvorených nanosuspenzií premeriavaná veľkosť častíc a zeta potenciál. Vyhodnocovanie výsledných parametrov bolo realizované za použitia softvéru Zetasizeru DTS V4.20. Prístroj bol zapnutý minimálne 30 minút pred začatím merania, teplota bola ustálená kalibrovaná na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jednotlivé merania boli uskutočnené vždy minimálne triplicitne, priemerné hodnoty sú uvedené v kapitole výsledky. Kvôli sledovaniu stability častíc a taktiež iným možným zmenám, ku ktorým mohlo dôjsť, ako zhlukovanie, bobtnanie či rozpad častíc, boli vzorky premerané taktiež s odstupom 24, 48 a 72 hodín od prípravy, uskladnené boli pri konštantnej teplote $3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následne bolo možné tieto parametre preskúmať.

Veľkosť častíc bola meraná pomocou jednorázových polymethylmetakrylátových kyviet, do ktorých sa pipetoval vždy 1ml nanosuspenzie. Zeta potenciál bol meraný za pomoci kapilárnej cely DTS1060, do ktorej bola vzorka plnená injekčnou striekačkou tzv. tuberkulínkou, aby sa predišlo tvorbe bublín. Pri vkladaní každej ďalšej vzorky bola cela prečistená vodou a vysušená za pomoci stlačeného vzduchu. Kladnou stránkou tohto spôsobu je jednoduchá manipulácia s prístrojom, adekvátne rýchlosť merania, nie je nutná kalibrácia pred jednotlivými meraniami.

Hodnoty Z-Ave a PDI boli hodnotené pri meraní taktiež. PDI je definovaný ako bezrozmerné meranie šírky rozloženia veľkostí vypočítaného z kumulatívnych údajov. V softvéri Zetasizeru sa pohybuje od hodnoty 0-1. Hodnoty vyššie ako 1 predikujú, že distribúcia je tak polydisperzná, že daná vzorka nemusí byť vhodná na meranie dynamickým rozptylom svetla (DLS). Pri dynamickom rozptyle svetla sa meria autokorelačná funkcia intenzity rozptýleného svetla. Táto funkcia je vhodná k získaniu hodnoty veľkosti.

Tabuľka 2 Index polydispersity

PdI	
<0,05	častice, ktoré sú monodisperzné
<0,08	takmer monodisperzné, za normálnych okolností DSL môže distribuovať iba v tomto rozmedzí
0,08 – 0,7	stredná hodnota PDI, rozsah nad ktorým fungujú distribučné algoritmi najlepšie
>0,7	veľmi široké rozloženie častíc

Percentuálne zastúpenie a strednú veľkosť častíc vo vzorke zobrazujú píky. Ak sa vo vzorke vyskytuje skupina nanočastíc s podobnou veľkosťou tvorí pri meraní pík, charakterizovaný plochou a výškou. Za vhodnú formu je považované, ak sa v grafe vyskytuje len jeden pík. Percentuálne zastúpenie píku z celkovej

plochy všetkých pík je dané plochou píku. Priemer nanočastíc ktorý sa vyskytuje vo vzorke najfrekventovanejšie udáva výška píku.

7.7 Centrifugácia

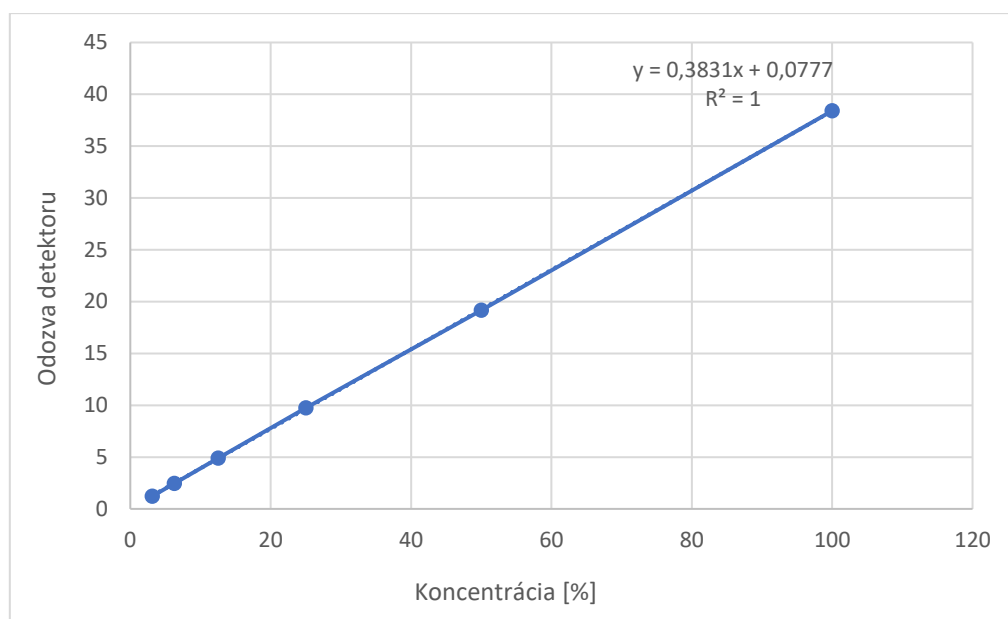
K separovaniu neenkapsulovaného oligoméru a následne k možnému prečisteniu bola využitá centrifugácia. Pri počiatocnom gravitačnom zrýchlení 30000G, po dobu 10 minút dochádzalo k nežiadúcemu javu spekaniu častíc s následnou neschopnosťou resuspendácie. Preto boli podmienky postupne upravované, gravitačné zrýchlenie bolo znižované až na 7000G a čas bol predlžovaný.

7.8 Kalibračná krivka

V Handbook of Fluorescent Dyes and Probes bol vyhľadovaný 6-FAM, ktorým bol značený stanovovaný oligomér. Bolo zistené, že najvýraznejšie fluoreskuje pri hodnote pH 9. Na riedenie vzorkov bol preto zvolený TRIS s touto hodnotou. Pripravili sme 0,2 mol/l roztok TRIS báze, a súčasne roztok HCl 0,1 mol/l. Následne sme zmiešali 25 ml pripraveného roztoku TRIS s 5,3 ml roztoku HCl a doplnili do 100 ml do odmernej banky. Následne sme hodnotu pH overili na pH metri.

1 ampulka obsahujúca 1.02 μmol oligoméru bola rozpustená v DMSO. Následne bolo množstvo 100 μL odpipetované a nariadené na požadované koncentrácie v TRIS pufri o pH 9. Do fluorescenčných kyviet bolo pipetované 3,5 ml. Následne bolo odmerané u jednotlivých vzoriek emitované žiarenie pri 520 nm a na podklade toho bola pripravená kalibračná krivka, ktorá bola použitá k výpočtu siRNA v NP v nasledujúcich krokoch.

Obrázok 10 Kalibračná krivka



7.9 Stanovenie množstva enkapsulovanej siRNA

Jednotným postupom bola pripravená séria nanosuspenzií za použitia oboch typov používaného polyméru (A2, T3) v štyroch rôznych koncentráciách (1 %; 3 %; 5 %; 7 %). Z jednotlivých vzoriek nanosuspenzií bol odpipetovaný objem 2 ml, ktorý bol následne centrifugovaný po dobu 20 minút pri tiahovom zrýchlení 7 000 G v dvoch cykloch. Po prvom cykle bol supernatant nahradený rovnakým objemom čistej vody, v ktorej boli častice resuspendované. Po ukončení druhého cyklu bol sediment okamžite rozpustený v 1 ml DMSO a príslušne nariadený pripraveným TRIS pufrom s hodnotou pH 9. U takto pripravených vzoriek bola prevedená kvantitatívna analýza za využitia spektrofluorimetru. Výsledky boli vyhodnotené pomocou pripravenej kalibračnej krivky, priamou metódou bola stanovená enkapsulačná aktivita, teda množstvo siRNA v percentách zachytené v NP.

8. Výsledky

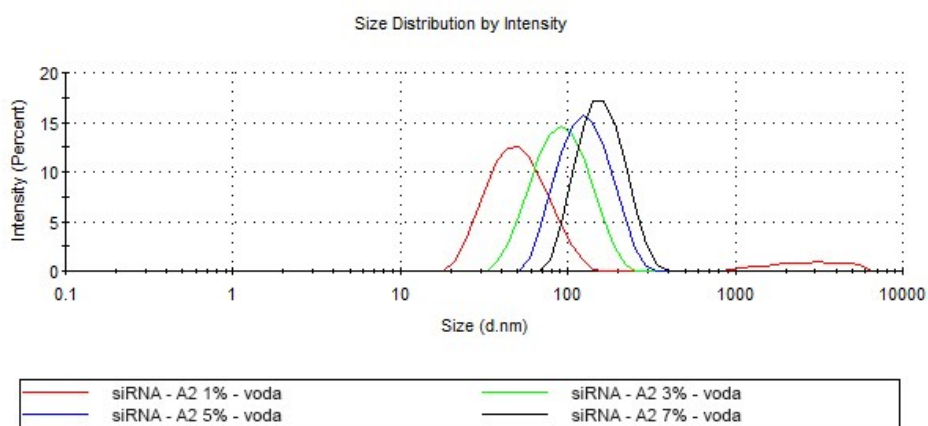
8.1 Závislost' veľkosti NP na použitom polyméri a jeho

koncentrácii

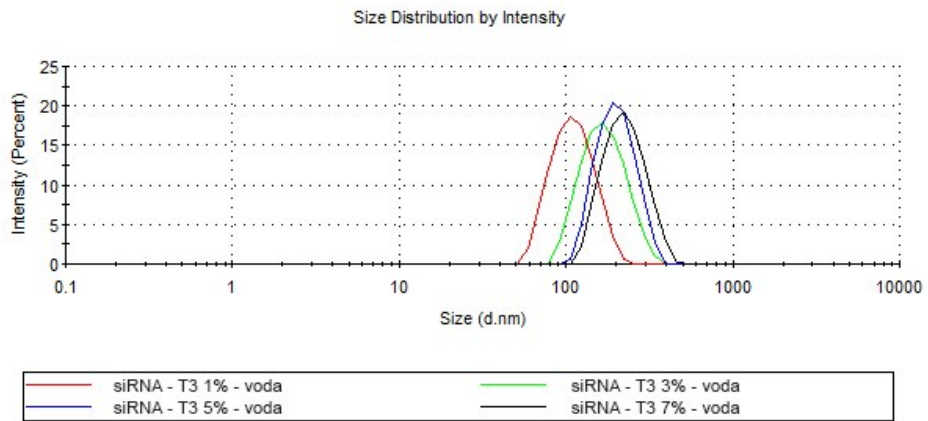
Tabuľka 3 Príprava NP s použitím polymérov rôznych koncentrácií

Číslo vzorku	Polymér	c polyméru	Z-Ave [nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1	A2	1%	50,52	0,248	54,19	93,9
2		3%	85,55	0,108	96,38	100
3		5%	118,5	0,083	130,8	100
4		7%	149,7	0,091	164,5	100
5	T3	1%	104,5	0,108	119,5	100
6		3%	158,5	0,085	173,7	100
7		5%	190,7	0,078	206,5	100
8		7%	215,4	0,023	225,5	100

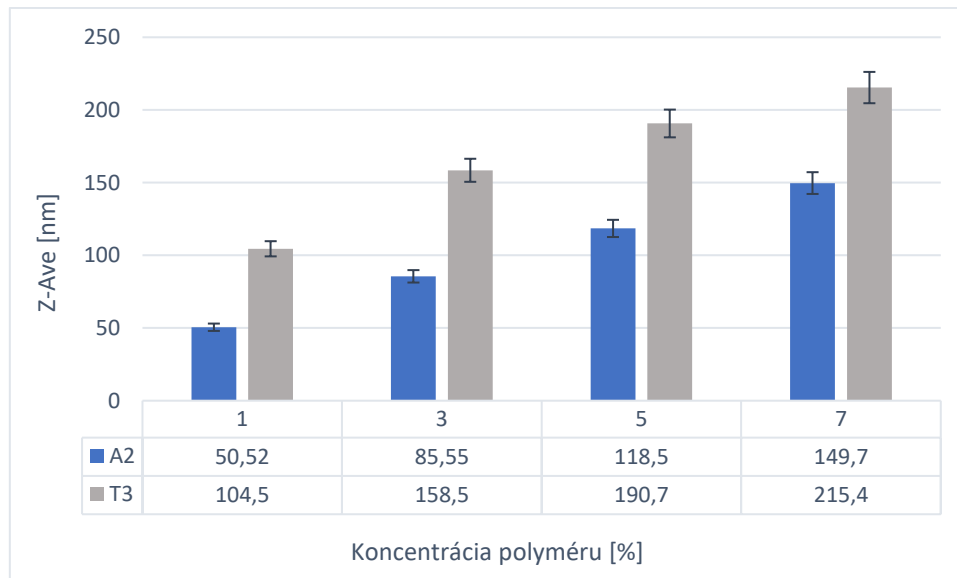
Obrázok 11 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na koncentrácii A2



Obrázok 12 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na koncentrácii T3



Obrázok 13 Veľkosť NP v závislosti na type a koncentrácii polyméru

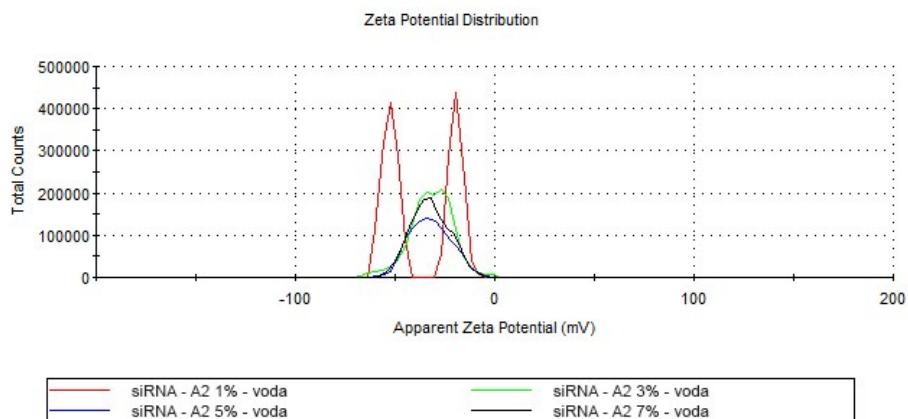


8.2 Zeta potenciál v závislosti na type a koncentrácií polyméru

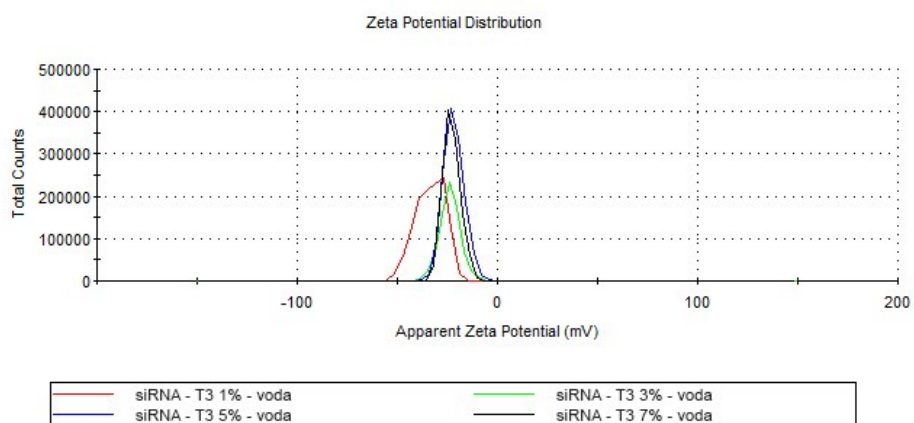
Tabuľka 4 Vplyv typu a koncentrácie polyméru na zeta potenciál

Vzorka číslo	Koncentrácia polyméru	Polymér	ZP [mV]
1	1%	A2	-54,8
2	3%		-31,8
3	5%		-32,4
4	7%		-32,7
5	1%	T3	-32
6	3%		-23,8
7	5%		-21,9
8	7%		-22,5

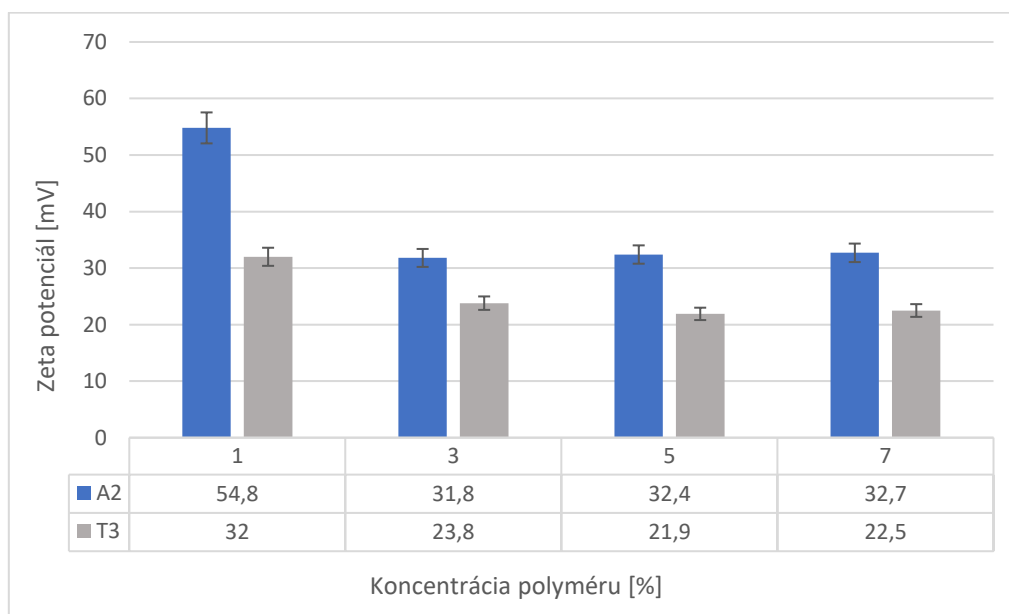
Obrázok 14 Frekvenčná krivka distribúcie zeta potenciálu v závislosti na koncentrácii A2



Obrázok 15 Frekvenčná krivka distribúcie zeta potenciálu v závislosti na koncentrácii T3



Obrázok 16 Zeta potenciál v závislosti na type a koncentrácii polyméru

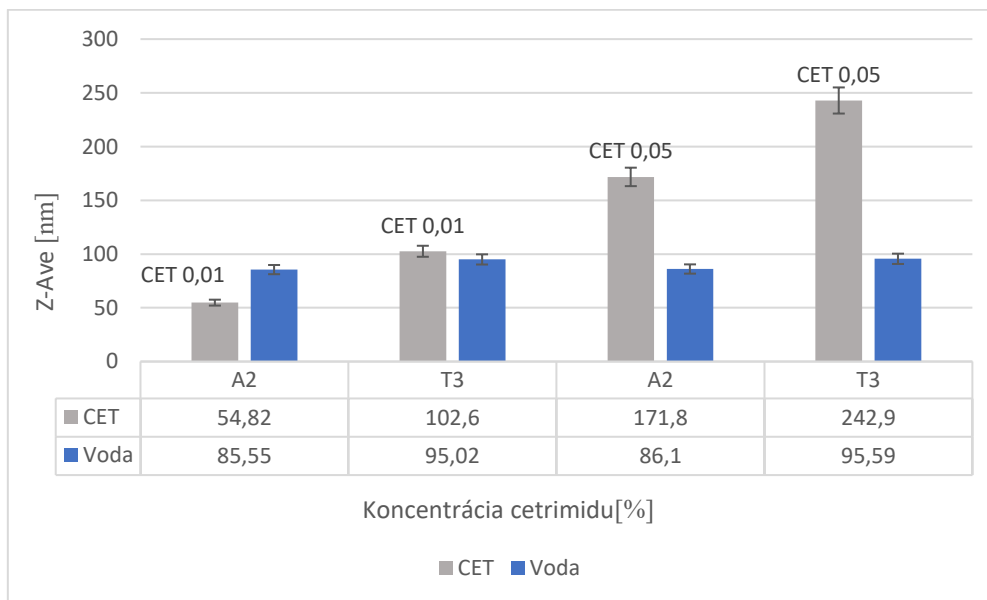


8.3 Veľkosť v závislosti na prítomnosti CET

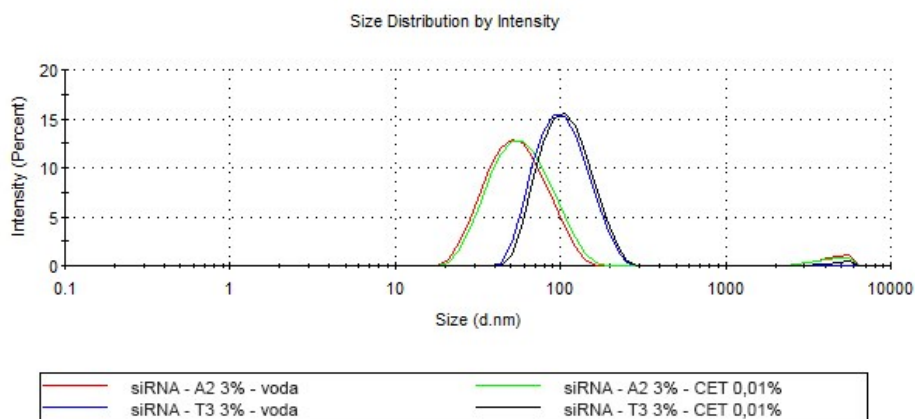
Tabuľka 5 Veľkosť NP v závislosti na pridanom množstve cetrimidu do vonkajšej fázy

Vzorka číslo	Poly-mér	CET [%]	Voda	Z-Ave[nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1	A2	0,01		54,82	0,209	61,9	97,1
2		-	+	85,55	0,108	96,38	100
3		0,05		171,8	0,185	211,2	100
4		-	+	86,1	0,109	97,71	100
5	T3	0,01		102,6	0,122	117,9	100
6		-	+	95,02	0,129	109,7	100
7		0,05		242,9	0,24	257,1	97,5
8		-	+	95,59	0,112	107,5	100

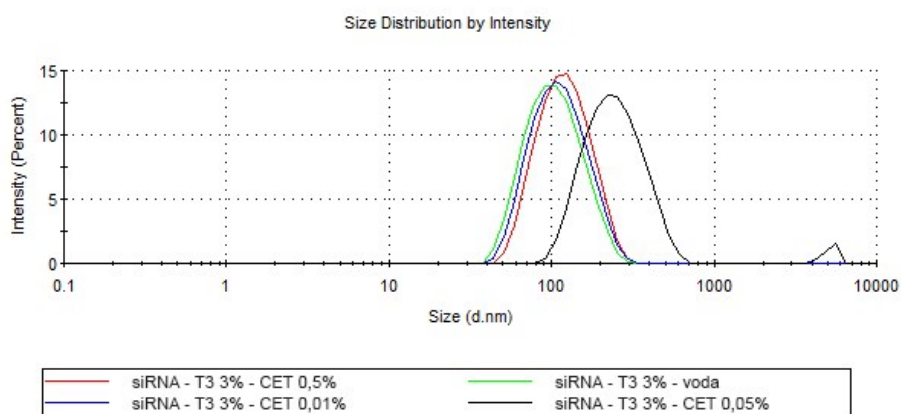
Obrázok 17 Veľkosť NP v závislosti na koncentrácii pridaného CET do vonkajšej fázy



Obrázok 18 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na použítom polyméri a koncentrácii pridaného CET do vonkajšej fázy



Obrázok 19 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v polyméri T3 v závislosti na koncentrácii CET pridaného do vonkajšej fázy

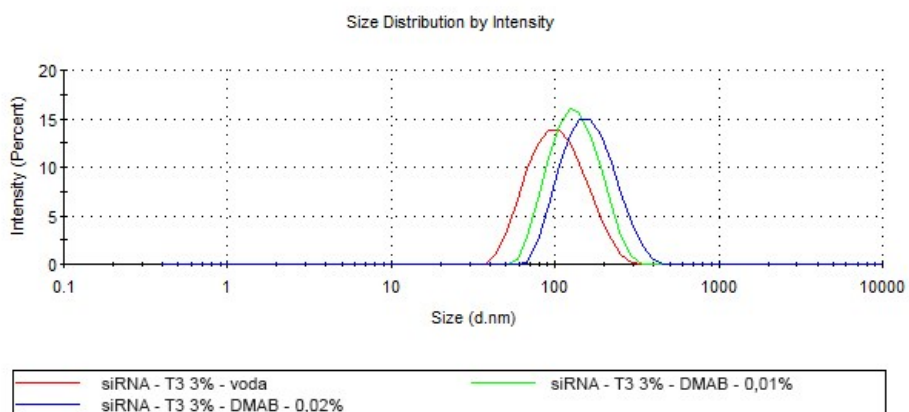


8.4 Veľkosť NP v závislosti na prítomnosti DMAB

Tabuľka 6 Vplyv koncentrácie DMAB na veľkosť NP

Číslo vzorky	Polymér	DMAB [%]	Z-Ave[nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1	T3-3%	0,01	123,9	0,099	138,1	100
2		0,02	149,8	0,109	169,2	100
3		0	95,59	0,112	107,5	100

Obrázok 20 Veľkosť NP pri použití polyméru T3 v závislosti na koncentrácii DMAB

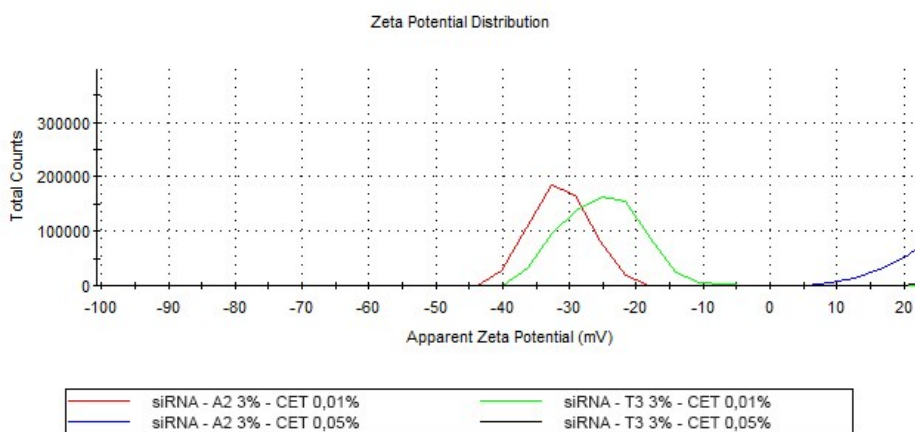


8.5 Zeta potenciál v závislosti na koncentrácii CET

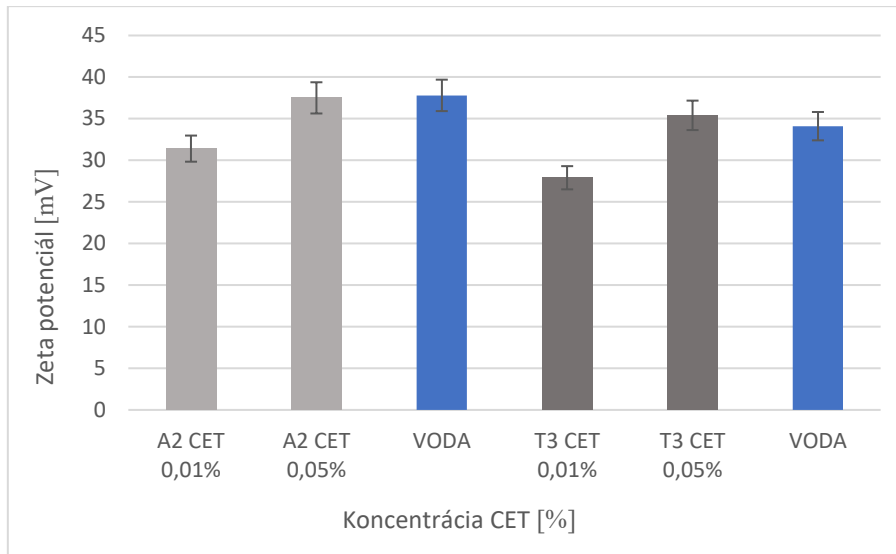
Tabuľka 7 Vplyv koncentrácie CET na zeta potenciál

Číslo vzorky	Polymér	CET [%]	ZP [mV]
1	A2	-	-37,8
2		-	-40,6
3		-	-40,6
4		0,01	-31,4
5		0,01	-32,8
6		0,05	37,5
7		0,05	42,9
8	T3	-	-34,1
9		-	-36,1
10		-	-38,4
11		0,01	-27,9
12		0,01	-25,2
13		0,05	35,4
14		0,05	34,7

Obrázok 21 Vplyv koncentrácie CET na veľkosť ZP



Obrázok 22 Vplyv koncentrácie CET na veľkosť NP

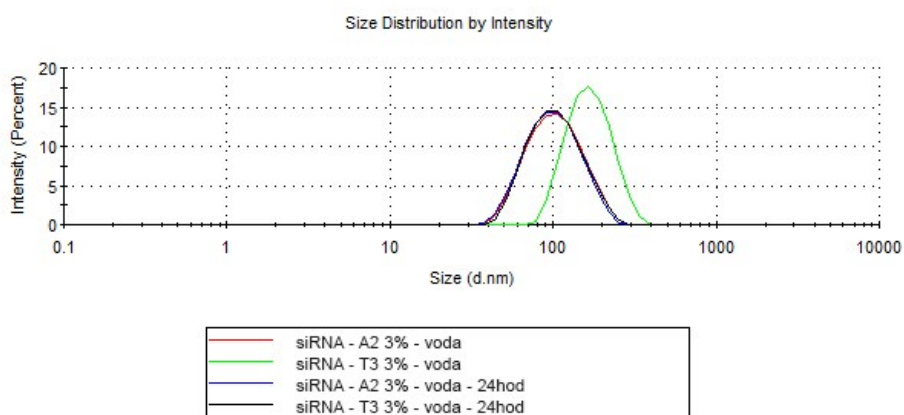


8.6 Stabilita veľkosti NP v závislosti na type a koncentrácii polyméru po 24, 48 a 72 hod

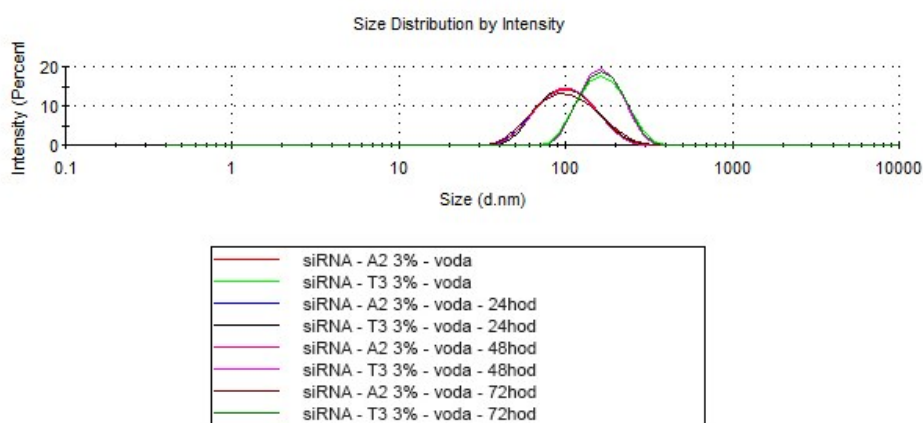
Tabuľka 8 Vplyv typu a koncentrácie polyméru na stabilitu veľkosti po 24, 48 a 72 hod

Číslo vzorky	Polymér	Po čase [hod]	Z-Ave[nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]
1	A2-1%	0	50,52	0,248	54,19	93,9
2		24	52,17	0,258	55	91,2
3	A2-3%	0	91,6	0,131	106,9	100
4		24	92,5	0,111	105,4	100
5		48	93,68	0,112	106,7	100
6		72	94,49	0,139	111,3	100
7	A2-5%	0	128,2	0,094	142,5	100
8		24	126,2	0,069	137,3	100
9		48	125,2	0,114	142,9	100
10		72	127,3	0,084	140,7	100
11	T3-1%	0	104,5	0,068	113,4	100
12		24	104,2	0,104	117,3	100
13	T3-3%	0	157,9	0,076	172,4	100
14		24	95,53	0,116	108,8	100
15		48	157,7	0,057	169,1	100
16		72	157,1	0,094	174	100

Obrázok 23 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti v závislosti na type polyméru po 24 hod



Obrázok 24 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti v závislosti na type polyméru po 24, 48 a 72 hod

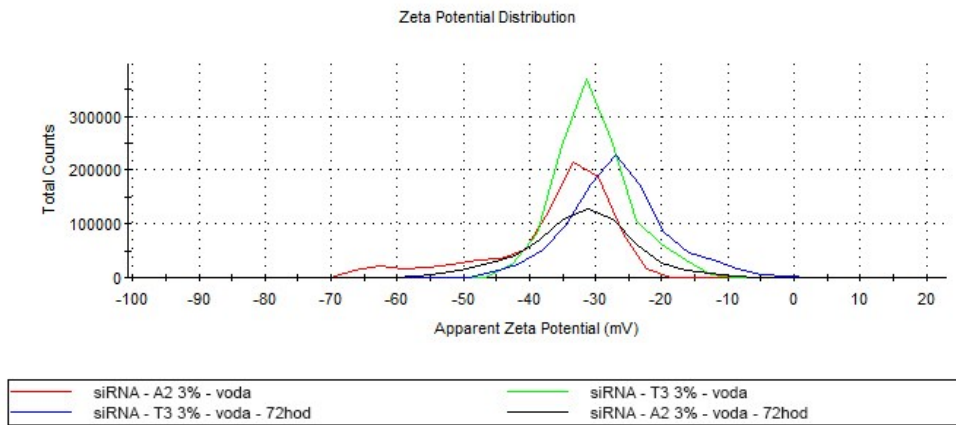


8.7 Stabilita zeta potenciálu po 24 hod v závislosti na type a koncentrácii polyméru a koncentrácii pridaného CET

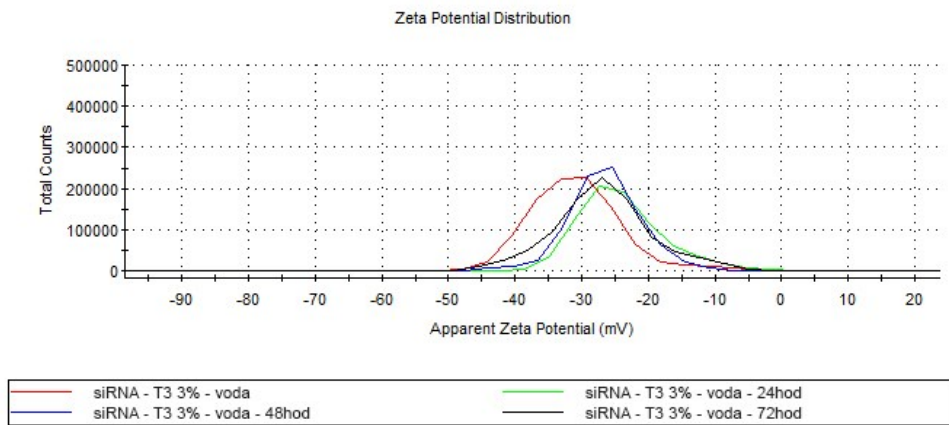
Tabuľka 9 Vplyv typu a koncentrácie polyméru a koncentrácie pridaného CET na veľkosť NP po 24 hod

Číslo vzorky	Polymér	Po čase	ZP [mV]
1	A2-3%	0	-36,4
2		24	-34
3	A2-5%	0	-37,1
4		24	-31,8
5	T3-3%	0	-30,8
6		24	-26,5
7	A2-3% +	0	-31,4
8	CET 0,01%	24	-31
9	T3-3% +	0	-25,2
10	CET 0,01%	24	-23

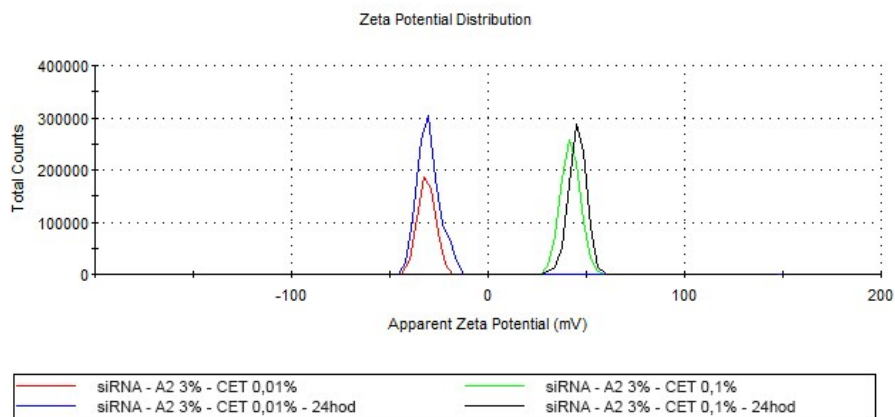
Obrázok 25 Frekvenčná krivka zeta potenciálu v závislosti na type polyméru pri koncentrácii 3% po 72 hod.



Obrázok 26 Frekvenčná krivka zeta potenciálu polyméru T3 po 24, 48, 72 hod.



Obrázok 27 Frekvenčná krivka zeta potenciálu použitím polyméru A2 – 3% v závislosti na koncentrácii CET



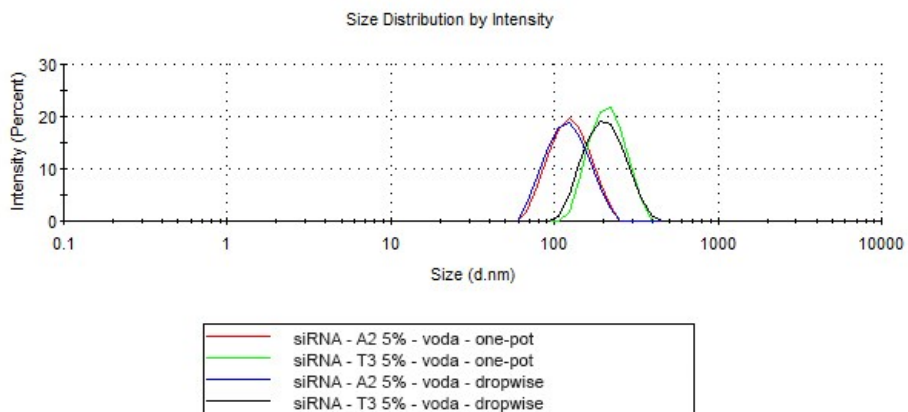
8.8 Veľkosť NP v závislosti na použití metódy „drop-wise“

a „one-pot“

Tabuľka 10 Vplyv použitej metódy „drop-wise“ a „one-pot“ na veľkosť NP

Číslo vzorky	Poly mér	Metóda	Z- Ave[nm]	PdI	Pk 1 Mean Int [nm]	Pk 1 Area Int [%]	ZP [mV]
1	A2-	Dropwise	114,7	0,078	124,2	100	-28,7
2	5%	One-pot	128,2	0,094	142,5	100	-37,9
3	T3-	Dropwise	195,3	0,058	209,9	100	-21,1
4	5%	One-pot	191,3	0,057	204,1	100	-21,9

Obrázok 28 Frekvenčná krivka distribúcie veľkosti NP v závislosti na použitej metóde drop-wise a one-pot

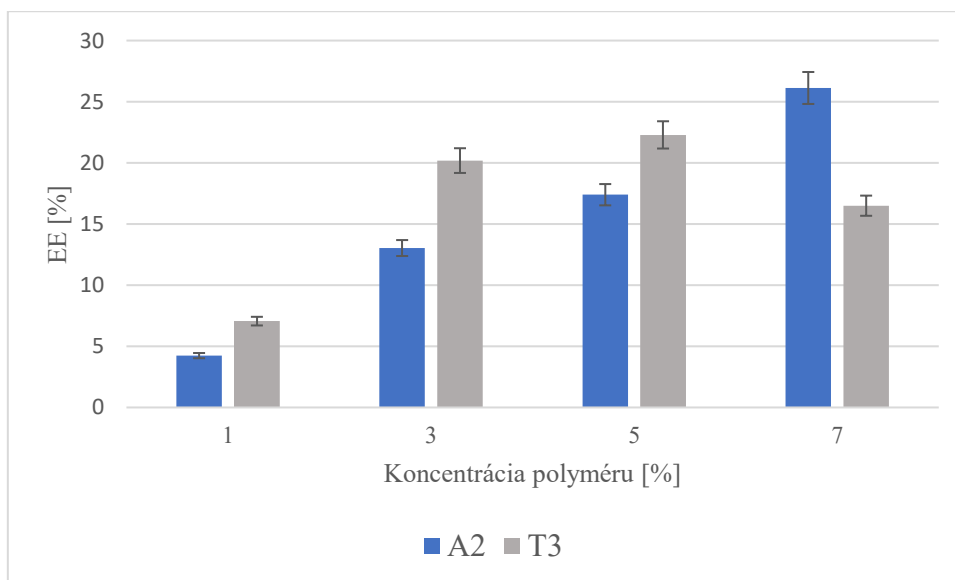


8.9 Stanovenie množstva enkapsulovanej siRNA

Tabuľka 11 Vplyv zvoleného polyméru a jeho koncentrácie na enkapsulačnú efektívnosť (EE)

Typ	Koncentrácia [%]	Signál	EE [%]
A2	1	1,654	4,23
	3	5,0239	13,03
	5	6,6941	17,39
	7	10,038	26,12
T3	1	2,7342	7,05
	3	7,763	20,18
	5	8,568	22,28
	7	6,3497	16,49

Obrázok 29 Závislosť enkapsulačnej efektívnosti (EE) na type polyméru pri rôznych koncentráciách



9. Diskusia

9.1 Obecné poznámky

V súčasnej dobe sa mnoho výskumných tímov venuje hľadaniu možností využitia nanočasticových systémov pri liečbe rôznych ochorení. Medzi najviac perspektívne materiály, využiteľné k cielenej distribúcii aktívnych látok, patria kopolyméry kyseliny DL-mliečnej a kyseliny glykolovej. Tieto zlúčeniny sú výhodné nielen vďaka ich biokompatibilite, je ale možné ich taktiež jednoducho modifikovať naviazaním viacfunkčných zlúčenín, a tak ich hydrofilizovať a tým doceliť zvýšenie kompatibility s biologickým prostredím. Aktivity vedúce k získaniu materiálov s vyššou kompatibilitou a ďalšími výhodnejšími parametrami sú na počiatku úsilia mnohých tímov s významnou účasťou technológov.

Veľmi zaujímavou témou pre farmaceutických technológov je formulácia kompozícii obsahujúcich zlúčeniny, ktoré ovplyvňujú gény so vzťahom k rôznym ochoreniam. Ako veľmi perspektívne pre terapeutické účely sa javí trieda dvojzvitnicových molekúl, obvykle s 20 až 25 párami báz. Tieto veľmi jednoduché zlúčeniny špecificky interferujú s expresiou špecifických génov komplementárnych nukleotidov. Úspešné vypnutie génov, ktoré má vzťah ku konkrétnemu ochoreniu, je veľmi sľubnou cestou k novým terapeutickým postupom. Optimalizácia zloženia nosičov terapeuticky aktívnych látok, ich štruktúry a ďalších parametrov môže viesť k významnému zvýšeniu efektivity príslušnej terapie.

9.2 K voľbe polymérov a metóde prípravy nanočastíc

Boli vybrané dva deriváty kyseliny poly(mliečnej-ko-glykolovej) vetvené do vysokého stupňa kyselinou polyakrylovou a tripentaerythritolom, líšiac sa koncentráciou a predovšetkým ionickým a neionickým charakterom koncových skupín. Uvedené polyméry boli už skôr preštudované z hľadiska interakcií s rozpúšťadlami, najmä s vodnými roztokmi pufrův. Vyznačujú sa obmedzeným bobtnaním a pomalou, relatívne kontinuálnou eróziou. Finálnym produktom degradácie sú oligoméry s menej než 10 monomérnymi jednotkami.

Ako vhodné rozpúšťadlo polymérov bol vybraný už skôr osvedčený dimethylsulfoxid, ktorý je kompatibilný s rozpúšťanými zložkami v biologickom i vo fyzikálne chemickom zmysle. Rozhodnuté bolo sledovať rýchlosť pridávania roztoku do vodnej fázy. Ako vonkajšia fáza bola s úspechom použitá samotná štandardne čistená voda, prípadne voda obsahujúca kationické tenzidy v rôznych koncentráciách.

Hotové nanočastice boli prečistené centrifugáciou. Ich veľkosť bola úspešne riadená koncentráciou polyméru v dimethylsulfoxidovom roztoku s siRNA metódou PCS. Zeta potenciál, ako ďalší dôležitý parameter nanočastíc, bol meraný metódou DLS. Miera enkapsulácie siRNA bola stanovená spektrofluorimetricky pomocou markeru.

9.3 Vplyv polyméru a jeho koncentrácie na veľkosť a zeta potenciál nanočastíc

V tabuľke 3 sú uvedené parametre veľkosti nanočastíc. Je viditeľný jednoznačný trend k zväčšovaniu so stúpajúcou koncentráciou polymérnej zložky. Pri porovnaní oboch polymérnych nosičov bola jednoznačne preukázaná menšia veľkosť častíc z polyméru vetveného na kyseline polyakrylovej. Ako významný výsledok je možno hodnotiť relatívne rovnaký vplyv zmeny koncentrácie polyméru na veľkosť nanočastíc z oboch testovaných polymérov (obr. 13).

V prípade zeta potenciálu je u oboch polymérov výrazne vyššia hodnota charakteristiky u najmenších 50 nm a 100 nm nanočastíc oproti kategórii väčších, ktoré mali prakticky rovnaký zeta potenciál (tab. 4). Ovplynenie hodnoty zeta potenciálu v zmysle jeho zvýšenia je možno pokladať za veľmi zaujímavý výsledok, ktorý môže súvisieť buď s prekročením limitnej hodnoty mobility častíc zmenou viskozity vonkajšej fázy disperzie, alebo so zvýšenou afinitou polárnych zložiek k časticiam s vyššou povrchovou energiou. Túto, prípadne inú pracovnú hypotézu by bolo nutné experimentálne potvrdiť. V tejto súvislosti je pozoruhodný obr. 16.

9.4 Vplyv kationických tenzidov na parametre nanočastíc

Cetrimid je kationická látka, ktorá je už tradične zaradená do liekopisu. Jej použitie môže slúžiť k modifikácii veľkosti nanočastíc a predovšetkým parametrov ich povrchu.

V tab. 5 sú porovnané hodnoty veľkostných parametrov nanočastíc pripravených v prostredí vody a v prostredí roztoku cetrimidu s veľmi nízkou koncentráciou. Ako prekvapivý výsledok je možno hodnotiť opačný vplyv roztokov rôznej koncentrácie cetrimidu na veľkosť nanočastíc oproti vode u nanočastíc z polyméru vetveného na kyseline polyakrylovej. Pri veľmi malej, 0,01% koncentrácii tenzidu boli získané menšie častice než vo vode. Pri vyššej, 0,05% koncentrácii boli naopak získané častice menšie. To teda znamená, že stopové koncentrácie cetrimidu majú pozitívny efekt v prípade snáh získať veľmi malé nanočastice (obr. 17). V polyméri vetvenom na tripentaerythritole sa efekt opačného vplyvu stopovej koncentrácie cetrimidu na veľkosť častíc neprejavil. V tabuľke 6 je vplyv kationického DMAB na veľkosť nanočastíc z polyméru T3 prakticky rovnaký ako u cetrimidu.

V tabuľke 7 je dokumentovaný markantný vplyv stopovej koncentrácie cetrimidu na zníženie hodnoty zeta potenciálu. Poznatok je významný, pretože sa týka nanočastíc z oboch testovaných polymérnych nosičov. Z vyššie uvedeného je možno urobiť záver o nutnosti venovať pozornosť stopovým koncentráciám tenzidov.

9.5 Stabilita veľkostných parametrov nanočastíc

V tabuľke 8 sú výsledky hodnotenia veľkostí nanočastíc v prostredí vody po dobu jedného až troch dní. Bolo preukázané, že behom sledovanej doby nedochádza k markantnejším zmenám veľkostných parametrov. Neprejavila sa z tohoto hľadiska ani rôzna veľkostná kategória častíc, ani rôzny typ polyméru.

Pokiaľ ide o stálosť hodnôt zeta potenciálu, prejavil sa vo všetkých vzorkách mierny pokles hodnôt, ako je patrné z tabuľky 9.

9.6 Vplyv postupov prípravy na veľkosť nanočastíc

Pri testovaní vplyvu rýchlosti pridávania 5% roztoku jednotlivých polymérov s siRNA do vodnej fázy na veľkosť a polydisperzitu výsledných nanočastíc bol preukázaný vplyv tohto parametru v prípade nanočastíc z nosiča vetveného na kyseline polyakrylovej (tabuľka 10). V prípade pomalého prikvapkávania dispergovanej kvapaliny boli získané menšie nanočastice. Závislosť veľkosti častíc na sledovanom technologickom parametre nebola preukázaná v prípade použitia nosiča vetveného na tripentaerythritole.

V rovnakej tabuľke sú tiež hodnoty zeta potenciálu. Odlišnosť nanočastíc s koncovými karboxylovými skupinami pripravených rôznou rýchlosťou miesenia je potvrdená odlišnými hodnotami zeta potenciálu. Prekvapivý výsledok bude nutné overiť jeho opakovaním.

9.7 Enkapsulácia siRNA

Z údajov v tabuľke 11 je zrejmé že podiel enkapsulovanej siRNA stúpa u nanočastíc z nosiča konštruovaného na kyseline polyakrylovej s koncentráciou tohoto nosiča a dosahuje 26 %. Odlišné výsledky boli dosiahnuté v prípade nosiča syntetizovaného vetvením na tripentaerythritole. Koncentrácia siRNA sa výrazne zvýšila po zvýšení koncentrácie nosiča z 1% na 3%. Pri ďalšom zvyšovaní koncentrácie nosiča už nedochádzalo k zmene v účinnosti enkapsulácie.

10. Závery

- A) Bola preukázaná dostatočná kompatibilita PLGA vetvenej na kyseline polyakrylovej alebo na tripentaerythritole s dimethylsulfoxidom a siRNA.
- B) Vyššie uvedená kompozícia je vhodná pro prípravu biodegradabilných nanočastíc nanoprecipitačnou metódou.
- C) So stúpajúcou koncentráciou polymérnej zložky dochádzalo k relatívne pravidelnému zväčšovaniu nanočastíc. Pri rovnakom postupe bola nameraná hodnota zeta potenciálu u najmenších nanočastíc získaných z 1% roztoku oboch nosičov najvyššia, väčšie nanočastice mali rovanaký zeta potenciál.
- D) Roztoky cetrimidu o 0,01% koncentrácii viedli v polyméri vetvenom na kyseline polyakrylovej k získaniu menších nanočastíc než v prostredí samotnej vody, u 0,05% roztoku tomu bolo naopak, v polyméri vetvenom na tripentaerythritole sa uvedený vplyv neprejavil.
- E) Nanočastice sú v prostredí vody pri teplote 3 ° C veľkostne stabilné.
- F) Zmena rýchlosti miesenia reaktantov s vonkajšou vodnou fázou sa prejaví odlišnými parametrami veľkostí ich častíc a hodnotami povrchového náboja.
- G) Účinnosť enkapsulácie je ovplyvnená koncentráciou nosiča v miere, ktorá je daná odlišnými parametrami, ako je viskozita, polarita, povrchový náboj apod.

11. Použitá literatúra

1. *Wondrous Nanotechnology*. **Nanotechnology, W., et al.** 38, 2016, Journal-Chemical Society of Pakistan.
2. *Multifunctional nanocarriers*. **Torchilin, V.** 58:14, 2006, *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 1532-1555. ISSN 0169409X.
3. *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. **D., Peer, et al.** 2:12, 2007, *Nature Nanotechnology*, pp. 751–760. ISSN 1748-3387.
4. *Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers*. **Caldorera-Moore, et al.** 7:4, 2010, *Expert Opinion on Drug Delivery*, pp. 479–495. ISSN 1742-5247.
5. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. **Fire, A., et al.** 391:6669, 1998, *Nature*, pp. 806–811. ISSN 0028-0836.
6. *Nanotechnologies - Vocabulary - Part 4: Nanostructured materials - ISO/TS 80004-4:2011*. **International Organization for Standardization.** 2011.
7. *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. **Auffan, M., et al.** 4:10, 2009, *Nature Nanotechnology*, pp. 634-641 . ISSN 1748-3387.
8. **Wythers, Maryann, C.** *Advances in materials science research*. Hauppauge, NY : Nova Science, 2011. ISBN 9781613245118.
9. *Nanotech approaches to drug delivery and imaging*. **Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V.** 8:24, 2003, *Drug Discovery Today*, pp. 1112-1120. ISSN 13596446.
10. *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. **KOO, et al.** 1:3, 2005, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, pp. 193-212. ISSN 15499634.
11. *Biodegradable polymers as biomaterials*. **Nair L.S. a Laurencin C.T.** 32:8, 2007, *Progress in Polymer Science*, s. 762-798. ISSN 00796700.

12. *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. **Makadia H.K. and Siegel S.J.** 3:3, 2011, *Polymers*, pp. 1377-1397. ISSN 2073-4360.
13. **Nanovex, Biotechnologies**. *Nanovesicles and Nanoparticles. SL, PLGA nanoparticles - EN Nanovex Biotechnologies*. [Online] [Cited: Máj 7, 2018.] <http://www.nanovexbiotech.com/858-2/>.
14. *Poly(ethylene glycol)-Modified Proteins: Implications for Poly(lactide-co-glycolide)-Based Microsphere Delivery*. **Pai S.S., Tilton R.D. a Przybycien T.M.** 11:1, 2009, *The AAPS Journal* , s. 88-98. ISSN 1550-7416.
15. *Influence of secondary preparative parameters and aging effects on PLGA particle size distribution: a sedimentation field flow fractionation investigation*. **Contado, C., et al.** 405:2-3, 2013, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp. 703-711. ISSN 1618-2642.
16. *PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles*. **Betancourt, T., et al.** 91A:1, 2009, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, pp. 263–276. ISSN 15493296.
17. *Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading*. **Han, et al.** 7, 2016, *Frontiers in Pharmacology*. ISSN 1663-9812.
18. *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. **Pinto Reis, K., et al.** 2:1, 2006, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, pp. 8-21. ISSN 15499634.
19. *Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior*. **Niwa, T., et al.** 25:1-2, 1993, *Journal of Controlled Release*, pp. 89-98. ISSN 01683659.
20. *Improved Stability of Proteins Immobilized in Microparticles Prepared by a Modified Emulsion Polymerization Technique*. **Ekman, B. and Sjfolm, I.** 67:5, 1978, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 693-696. ISSN 00223549.

21. *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review.* **Nagavarma, B.V.N., et al.** 5:3, 2012, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, pp. 16-23. ISSN 09742441.
22. *Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods.* **Galindo-Rodriguez, S., a iní.** 21:8, 2004, Pharmaceutical Research, s. 1428-1439. ISSN 1573904X.
23. *Multifunctional nanovehicles for combined 5-fluorouracil and gold nanoparticles based on the nanoprecipitation method.* **Karmi, A., et al.** 11:6, 2011, Journal of nanoscience and nanotechnology, pp. 4675-4683. ISSN 15334880.
24. *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue.* **Panyam, J. and Labhasewar, V.** 55:3, 2003, Advanced Drug Delivery Reviews, pp. 329-347. ISSN 0169409X.
25. *Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů.* **Ševčíková, P., et al.** 108:5, 2014, Chemické listy, pp. 479-482. ISSN 12137103.
26. *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele.* **Malvern, Instruments.** 3, 2007.
27. *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1).* **Honary, S. and Zahir, F.** 12:2, 2013, Tropical Journal of Pharmaceutical Research. ISSN 1596-9827.
28. *Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles.* **Govender, T., et al.** 199:1, 2000, International Journal of Pharmaceutics, pp. 95-110. ISSN 03785173.
29. *Solid-state Solubility Influences Encapsulation and Release of Hydrophobic Drugs from PLGA/PLA Nanoparticles.* **Panyam, J., et al.** 93:7, 2004, Journal of Pharmaceutical Sciences, pp. 1804-1814. ISSN 00223549.
30. *Zeta potential determination of polymeric materials using two differently designed measuring cells of an electrokinetic analyzer.* **Bukšek, H., Luxbacher, T. and Petrinić, I.** 57:3, 2010, Acta chimica Slovenica, pp. 700-706.

31. *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.* **Bernstein, E., et al.** 409:6818, 2001, Nature, pp. 363-366. ISSN 00280836.
32. *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.* **Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J.** 136:4, 2009, Cell, pp. 642-655. ISSN 00928674.
33. **Abcam.** Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science, RNA interference overview. [Online] 1998. [Cited: December 10, 2017.] <http://www.abcam.com/pathways/rna-interference---a-comprehensive-overview>.
34. *A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants.* **Hamilton, A. and Baulcombe, D.** 286:5441, 1999, Science, pp. 950-952. ISSN 00368075.
35. *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* **Elbashir, S.M., et al.** 411:6836, s.l. : Nature, 2001, Nature, pp. 494-498. ISSN 00280836.
36. *Chemical Modification of siRNAs for In Vivo Use.* **Behlke, M.A.** 18:4, 2008, Oligonucleotides, pp. 305-320. ISSN 15454576.
37. *SiRNAs: their potential as therapeutic agents – Part I. Designing of siRNAs.* **Hajeri, P.B. and Singh, S.K.** 14:17-18, 2009, Drug Discovery Today, pp. 851-858. ISSN 13596446.
38. *Does the understanding of immune activation by RNA predict the design of safe siRNAs?* **Sioud, M.** 13, 2008, Frontiers in Bioscience, pp. 4379-4392. ISSN 10939946.
39. *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.* **Meister, G. and Tuschl, T.** 431:7006, 2004, Nature, pp. 343-349. ISSN 00280836.
40. *On the road to reading the RNA-interference code.* **Siomi, H. and Siomi, M.C.** 457:7228, 2009, Nature, pp. 396-404. ISSN 00280836.
41. *Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics.* **de Fougères, A., et al.** 6:6, 2007, Nature Reviews Drug Discovery, pp. 443-453. ISSN 14741776.

42. *RNA interference in the clinic: challenges and future directions.* **Pecot, C.V., et al.** 11:1, 2011, Nature Reviews Cancer, pp. 59-67. ISSN 1474175X.
43. *Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing.* **Bartlett, D.W. and Davis, M.E.** 97:4, 2007, Biotechnology and Bioengineering, pp. 909-921. ISSN 00063592.
44. *Selective Protection of Nuclease-Sensitive Sites in siRNA Prolongs Silencing Effect.* **Volkov, A.A., et al.** 19:2, 2009, Oligonucleotides, pp. 191-202. ISSN 15454576.
45. *Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer.* **Ozpolat, B., Sood, A.K. and Lopez-Berestein, G.** 267:1, 2010, Journal of Internal Medicine, pp. 44-53. ISSN 09546820.
46. *Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation.* **Jensen, D.M.K, et al.** 142:1, 2010, Journal of Controlled Release, pp. 138-145. ISSN 01683659.
47. *Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes.* **Jorgensen, R.** 8:12, 1990, Trends in Biotechnology, pp. 340-344. ISSN 01677799.
48. *Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analogs.* **Vaish, N., et al.** 39:5, 2011, Nucleic Acids Research, pp. 1823-1832. ISSN 13624962.
49. *Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi.* **J., Martinez, et al.** 110:5, 2002, Cell, pp. 563-574. ISSN 00928674.
50. *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery.* **Whitehead, K.A., Langer, R. and D.G., Anderson.** 8:2, 2009, Nature Reviews Drug Discovery, pp. 129-138. ISSN 14741776.
51. *Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy.* **Ozpolat, B., Sood, A.K. and Lopez-Berestein, G.** 66, 2014, Advanced Drug Delivery Reviews, pp. 110-116. ISSN 0169409X.

52. *All-in-One Target-Cell-Specific Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Molecular Imaging and siRNA Delivery*. Lee, J.H., et al. 48:23, 2009, *Angewandte Chemie International Edition*, pp. 4174-4179. ISSN 14337851.

53. *Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges*. Zhou, J., et al. 6:1, 2013, *Pharmaceuticals*, pp. 85-107. ISSN 14248247.

54. **Generi Biotech**. Duálně značené sondy. [Online] 2013. [Cited: Marec 7, 2018.] <http://www.generi-biotech.com/sondy-dualne-znacene/>.

55. **Generi, Biotech**. Modifikace oligo. [Online] 2013. [Cited: Marec 7, 2018.] <http://www.generi-biotech.com/modifikace-oligo/#htm-6-fam>.