

## VÝVOJ PLGA MIKROČÁSTIC A STUDIUM JEJICH DEGRADACE PRO CÍLENOU DOPRAVU LÉČIV

### Diplomová práce

*Studijní program:* N3106 – Textilní inženýrství  
*Studijní obor:* 3106T018 – Netkané a nanovláčkové materiály  
*Autor práce:* **Bc. Lucie Kuncová**  
*Vedoucí práce:* Ing. Petr Mikeš, Ph.D.



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
Fakulta textilní  
Akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Lucie Kuncová  
Osobní číslo: T13000023  
Studijní program: N3106 Textilní inženýrství  
Studijní obor: Netkané a nanovláknenné materiály  
Název tématu: Vývoj PLGA mikročástic a studium jejich degradace pro cíle-  
nou dopravu léčiv  
Zadávací katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma.
2. Studium vlivu molekulové hmotnosti, případně poměru jednotlivých složek kopolymeru PLGA na degradaci a tvar částic.
3. Inkorporace aktivních látek do roztoků PLGA a sledování kinetiky uvolňování.
4. Diskuze výsledků, vyhodnocení dosažených výsledků.

## **Prohlášení**

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

V Liberci dne

## **Poděkování**

Chtěla bych touto cestou poděkovat Ing. Věře Jenčové Ph.D za cenné rady a vstřícnost, dále svému vedoucímu diplomové práce Ing. Petru Mikešovi Ph.D, a spolu s ním i konzultantovi Ing. Aleši Šamanovi za odborné vedení, vstřícný přístup, jejich cenné rady a strávený čas při provádění experimentů a vypracovávání této práce. Rovněž bych ráda poděkovala celé katedře Netkaných textilií, díky které jsem vůbec dostala možnost psát tuto práci a být její součástí.

Speciální poděkování patří mé kamarádce Terezce Jansové, v neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, a především svému příteli Marcelovi za neskutečnou trpělivost a podporu během celého mého studia.

## **Anotace**

Podstatou diplomové práce je vývoj PLGA mikročástic pro cílený transport léčiv, za použití metody elektrosprayingu. Teoretická část popisuje základní principy elektrosprayingu a elektrosprayingu, které jsou doplněny materiálovými a procesními parametry. Dále jsou vysvětlovány pojmy týkající se cíleného transportu léčiv, jako je enkapsulace, kinetika uvolňování a degradace. Celá teoretická část je doplněna odbornými články související s danou problematikou. Praktická část je dále rozdělena do čtyř dílčích experimentálních částí. První se věnuje koncentračním řadám a výběru vhodných koncentrací pro dva typy rozpouštědlových systémů u modelového kopolymeru PLGA v poměru 75:25, jež jsou následně použity u všech poměrů kopolymeru PLGA. Druhá část se zabývá inkorporací aktivních látek pomocí elektrosprayingu částic polyvinylalkoholu na volnou hladinu. Třetí část je zaměřena na sledování kinetiky uvolňování aktivních látek. A poslední, čtvrtá část se zabývá degradací kopolymeru PLGA v poměru 85:15. Jednotlivé části jsou interpretovány snímky z elektronového mikroskopu, doplněné tabulkovými hodnotami a odpovídajícími grafy.

## **Klíčová slova**

Cílený transport léčiv, degradace, elektrostatické rozprašování, elektrostatické zvlákňování, enkapsulace, kinetika uvolňování, polymer

## **Anotation**

The essence of the thesis is the development of PLGA microspheres for drug delivery system by use the electro spraying method. The theoretical part describes the basic principles of electro spraying and electro spinning, which are supplemented by material and process parameters. Further, the concepts related to drug delivery, such as encapsulation, release kinetics and degradation are added. The entire theoretical part is supplemented with literature searches related articles. The entire theoretical part is complemented with articles related to given issues. The practical part is divided into four sub-experimental parts. The first deals with the concentration series and choosing suitable concentrations for two types of solvent systems for PLGA with ratio 75:25, which are then used for other copolymers. The second part deals with the incorporation of active substances using electro spraying particles of polyvinyl alcohol on the free surface. The third part is focused on monitoring the kinetics of release of active substances. The final fourth part deals with the degradation of PLGA with ratio 85:15. Individual parts are interpreted by scanning electron microscopy, supplemented with the data and the corresponding graphs.

## **Key Words**

Drug delivery system, electro spinning, electro spraying, encapsulation, release kinetics, polymer

## Obsah

<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>10</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>13</b>
<b>Seznam grafů</b> .....	<b>14</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>15</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Základní principy tvorby nanovláken</b> .....	<b>19</b>
1.1 Princip elektrospinningu .....	19
1.2 Parametry elektrospinningu .....	20
Technologie výroby .....	22
<b>2. Základní principy elektrostatického rozprašování (elektrospraying)</b> .....	<b>23</b>
2.1 Parametry elektrostatického rozprašování .....	24
2.1.1 Materiálové parametry .....	24
2.1.2 Procesní parametry .....	28
<b>3. Enkapsulace</b> .....	<b>31</b>
<b>4. Cílený transport léčiv</b> .....	<b>35</b>
<b>5. Kinetika uvolňování</b> .....	<b>38</b>
5.1 Měření absorbance .....	40
<b>6. Alifatické polyestery, kopolyestery a jejich použití v tkáňovém inženýrství</b> .....	<b>41</b>
6.1 Poly(glykolová kyselina) PGA .....	41
6.2 Kyselina polymléčná (PLA) .....	42
6.3 Poly(laktid-co-glykolid), PLGA .....	42
6.3.1 Syntéza PLGA .....	43
<b>7. Degradace</b> .....	<b>45</b>
7.1 Degradace alifatických polyesterů .....	46
7.2 Enzymatická degradace .....	48
Enzymy .....	49
<b>9. Použité látky</b> .....	<b>51</b>
9.1 Polymery .....	51

Polyvinylakohol (PVA) .....	51
Polyvinylbutyral (PVB) .....	52
9.2 Rozpouštědla.....	52
9.3 Fluorescenční barviva.....	54
<b>10. Použité přístroje a laboratorní zařízení.....</b>	<b>55</b>
10.1 Zařízení pro elektrostatické rozprašování z jehly .....	55
10.2 Zařízení pro elektrostatické rozprašování na volnou hladinu .....	56
10.3 Zařízení pro kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu .....	57
10.4 Analytické nástroje .....	58
<b>11. Popis experimentu.....</b>	<b>59</b>
11.1 Koncentrační řady.....	59
11.1.1 Procesní parametry elektrosprayingu.....	60
11.1.2 Modelová analýza vyrobených částic kopolymeru PLGA v poměru 75:25	60
11.1.3 Analýza vyrobených PLGA částic pro poměry 75:25; 60:40; 85:15; 50:50	64
11.2 Inkorporace aktivních látek .....	73
11.2.1 Popis experimentu.....	73
11.2.2 Procesní parametry .....	74
11.2.3 Analýza vyrobených částic .....	74
11.3 Kinetika uvolňování aktivních látek .....	76
11.3.1 Procesní parametry vánočního stromku.....	76
11.3.2 Analýza vyrobených částic .....	76
11.3.3 Postup měření kinetiky uvolňování .....	78
11.3.4 Analýza vzorků průběhu kinetiky uvolňování.....	78
11.3.4 Postup měření absorbance .....	80
11.4 Degradace PLGA 85:15.....	82
11.4.1 Postup degradace PLGA 85:15 (AP 24).....	83
<b>Závěr .....</b>	<b>86</b>
<b>Použitá literatura .....</b>	<b>89</b>



<b>Seznam příloh.....</b>	<b>95</b>
<b>Příloha B .....</b>	<b>99</b>
<b>Příloha C .....</b>	<b>104</b>
<b>Příloha D .....</b>	<b>107</b>
<b>Příloha E .....</b>	<b>110</b>

## Seznam obrázků

Obr. 1 Formování polymerního roztoku .....	19
Obr. 2 Morfologie nanoseného vzorku z roztoku s různou koncentrací .....	21
Obr. 3 Schematické znázornění elektrostatického zvlákňování z jehly.....	22
Obr. 4 Kapilární síly .....	26
Obr. 5 Mřížový model s vydělenými fázemi .....	27
Obr. 6 Maxwellův experiment .....	27
Obr. 7 Vývoj dceřiné kapky z kapky mateřské .....	29
Obr. 8 Morfologické typy kapslí .....	34
Obr. 9 Schematické znázornění morfologie různých typů nano- a mikročástic bez léčiva a s léčivou látkou . .....	36
Obr. 10 Poly(glykolová) kyselina .....	41
Obr. 11 Kyselina poly(mléčná) .....	42
Obr. 12 Poly(laktid-co-glykolid) .....	43
Obr. 13 Hydrolýza a štěpení esterové vazby .....	48
Obr. 14 Navázání substrátu do aktivního centra enzymu a vznik komplexu .....	49
Obr. 15 Polyvinylalkohol.....	51
Obr. 16 Polyvinylbutyral .....	52
Obr. 17 Chloroform .....	52
Obr. 18 Kyselina octová .....	53
Obr. 19 Ethylalkohol .....	53
Obr. 20 Aparatura pro elektrostatické zvlákňování z injekční stříkačky.....	55
Obr. 21 Aparatura pro elektrostatické rozprašování na volnou hladinu její schéma .....	56
Obr. 22 Aparatura pro kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu .....	57
Obr. 23 Schéma zařízení pro kombinaci elektrostatického zvlákňování a rozprašování	57
Obr. 24 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace PLGA v poměru 75:25 (AP 61) na tvar produktu při elektrostatickém rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla .....	60
Obr. 25 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace PLGA v poměru 75:25 (AP 61) na tvar produktu při elektrostatickém rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla .....	61

Obr. 26 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace PLGA v poměru 75:25 (AP 61) na tvar produktu při elektrostatickém rozprašování za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla .....	62
Obr. 27 Snímky z elektronového mikroskopu, mezních koncentrací pro kopolymer PLGA v poměru 75:25 (AP 61) při elektrostatickém rozprašování za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla .....	63
Obr. 28 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla pro 2 hm. % .....	64
Obr. 29 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla pro 5 hm. % .....	66
Obr. 30 Snímky z elektronového mikroskopu za použití CHEKO jako rozpouštědla pro 20 hm. % .....	68
Obr. 31 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití chloroformu jako rozpouštědla pro 4 hm. % .....	69
Obr. 32 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití chloroformu jako rozpouštědla pro 7 hm. % .....	71
Obr. 33 Schéma pro kapsle v kapsli. ....	73
Obr. 34 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování v kombinaci s elektrostatickým rozprašováním na volnou hladinu pro 4 hm. % .....	74
Obr. 35 Snímky z fluorescenčního mikroskopu při elektrostatickém rozprašování v kombinaci s elektrostatickým rozprašováním na volnou hladinu pro 4 hm. % .....	75
Obr. 36 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování na volnou hladinu pro 4 hm. % .....	75
Obr. 37 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování na volnou hladinu a kombinace elektrospayingu a elektrospinningu pro 4 hm. % .....	76
Obr. 38 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování na volnou hladinu a kombinaci elektrospayingu a elektrospinningu pro 4 hm. % .....	77
Obr. 39 Snímky z elektronového mikroskopu průběhu hodinové kinetiky uvolňování pro 4 hm. % .....	78
Obr. 40 Snímky z elektronového mikroskopu průběhu hodinové kinetiky uvolňování pro 4 hm. % .....	79
Obr. 41 Snímky z elektronového mikroskopu 3denní kinetiky uvolňování pro 4 hm. % kopolymeru PLGA.....	79

Obr. 42 Snímky z elektronového mikroskopu 3denní kinetiky uvolňování pro 4 hm. % kopolymeru PLGA.....	80
--	----

## Seznam tabulek

Tabulka 1.: Nejvýznamnější veličiny a parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování. .....	20
Tabulka 2 : Statistické parametry různých koncentrací vyrobených částic a nanovláken PLGA 75:25 (AP 61) při použití CHEKO jako rozpouštědla .....	61
Tabulka 3: Statistické parametry různých koncentrací vyrobených částic a nanovláken PLGA 75:25 (AP 61) při použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.....	63
Tabulka 4.: Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 2 hm. %, za použití CHEKO jako rozpouštědla. ....	65
Tabulka 5.: Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 5 hm. %, za použití CHEKO jako rozpouštědla. ....	66
Tabulka 6: Statistické parametry pro různé poměry kopolymeru PLGA při 20 hm. %, za použití CHEKO jako rozpouštědla. ....	68
Tabulka 7.: Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 4 hm. %, za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.....	70
Tabulka 8 : Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 7 hm. %, za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla. ....	71
Tabulka 9 : Hmotností úbytky v průběhu degradace kopolymeru PLGA v poměru 85:15 .....	83

## Seznam grafů

Graf 1: Závislost průměru vyrobených částic a nanovláken na koncentraci roztoku PLGA v poměru 75:25 (AP 61) při použití CHEKO jako rozpouštědla.....	62
Graf 2: Závislost průměru vyrobených částic a nanovláken na koncentraci roztoku PLGA v poměru 72:25 (AP 61) při použití čistého chloroformu jako rozpouštědla. ....	64
Graf 3: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA pro 2 hm. % při použití CHEKO jako rozpouštědla. ....	65
Graf 4: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA při 5 hm. % za použití CHEKO jako rozpouštědla. ....	67
Graf 5: Závislost průměru vyrobených nanovláken na poměru kopolymeru PLGA při 20 hm. % za použití CHEKO jako rozpouštědla. ....	69
Graf 6: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA při 4 hm. % za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla. ....	70
Graf 7: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA při 7 hm. % za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla. ....	72
Graf 8: Absorbance VIS kalibračních roztoků FITC.....	81
Graf 9: Absorbance VIS kalibračních roztoků Rhodamin B. ....	81
Graf 10: Degradace kopolymeru PLGA (AP 24) pro 5 dní, za použití enzymu proteinázy K.....	84

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
BSA	hovězí séroví albumin
CEL	celecoxib
DCM	dichlormethan
DDS	drug delivery systems, cílený transpórt léčiv
DOX	doxorubicin
dv	posun dvou paralelních vrstev kapaliny
FITC	fluorescein isothiocyán, fluorescenční barvivo
E	síla [N]
EE	účinnost zapouzdření [%]
ES	efektivita zapouzdření [%]
$G_e$	elektrická vodivost [S/m]
hm. %	hmotnostní procento
CHEKO	chloroform/etanol/kyselina octová v poměrech 8:1:1
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny polyglykolové a polymléčné
PVA	polyvinylalkohol
PVB	polyvinylbutyral

$p_c$	kapilární tlak [Pa]
$r$	poloměr [m]
$R$	elektrický odpor [ $\Omega$ ]
$R_0$	vzdálenost [m]
$R_e$	elektrický odpor [ $\Omega$ ]
SEM	skenovací elektronový mikroskop
$\gamma$	napětí [N/m]
$F_c$	kapilární síla [N]
$\nu$	kinematická viskozita [ $m^2 \cdot s^{-1}$ ]
$\eta$	dynamická viskozita [Pa.s]
$W$	práce [J]
$W_A$	povrchová energie [ $J/m^2$ ]



## Úvod

Velkým boomem posledních několika let se v oblasti medicíny a biologie staly polymerní nanočástice, se kterými souvisí velmi atraktivní téma cíleného transportu léčiv, nebo také funkcionalizace vláknenných scaffoldů.

Úkolem této práce byla výroba a následná optimalizace PLGA mikročástic ve formě polymerních kapslí a studium jejich degradace pro cílený transport léčiv. Kapsle vyrobené metodou elektrosprayingu měly ve své struktuře obsahovat inkorporované aktivní látky, a jelikož některé aktivní látky mohou být pro zdravou tkáň toxické, je třeba zajistit dostatečné zabalení těchto látek, aby bylo zabráněno předčasnému uvolnění, a látky tak bezpečně prošly krevním řečištěm k požadovanému místu. Proto jednou z nejdůležitějších vlastností polymerních nosičů je jejich biodegradabilita, díky které by mělo být zabráněno případným komplikacím v lidském těle.

Práce se skládá z teoretické a praktické části, která je dále rozdělena do čtyř dílčích experimentálních částí. První část se zaměřuje na koncentrační řady pro výběr vhodné koncentrace roztoku a vhodného rozpouštědlového systému metodou elektrosprayingu z injekční stříkačky. Druhá část se již zabývá inkorporací aktivních látek za použití elektrosprayingu na volnou hladinu, kdy jsou sprejovány PVA částice obarvené fluorescenčním barvivem FITC. Sledováním kinetiky uvolňování aktivních látek se zabývá část třetí, kde se opět sprejují PVA částice na volnou hladinu, což je následně doplněno metodou tzv. vánočního stromku, jedná se o kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu, která je vysvětlena v kapitole (10.3). Sprejovány jsou opět obarvené částice polyvinylalkoholu a zvlákněn je polyvinylbutyral. Takto připravená vrstva nám poslouží jako vzorek pro již zmíněné sledování kinetiky uvolňování, která je rozdělena do dvou částí, na hodinovou kinetiku a kinetiku rozloženou do tří dnů. Poslední, čtvrtá část se zabývá degradací polymerního nosiče, konkrétně kopolymeru PLGA v poměru 85:15 (AP 24), za použití enzymu proteinázy, kdy lze ze snímků vidět, že již 5. den degradace dochází k narušování struktury polymeru. V každé části jsou výsledky interpretovány pomocí obrázků, které jsou doplněny tabulkovými hodnotami, jež jsou následně vyneseny do odpovídajících grafů.

# **TEORETICKO-REŠERŠNÍ ČÁST**

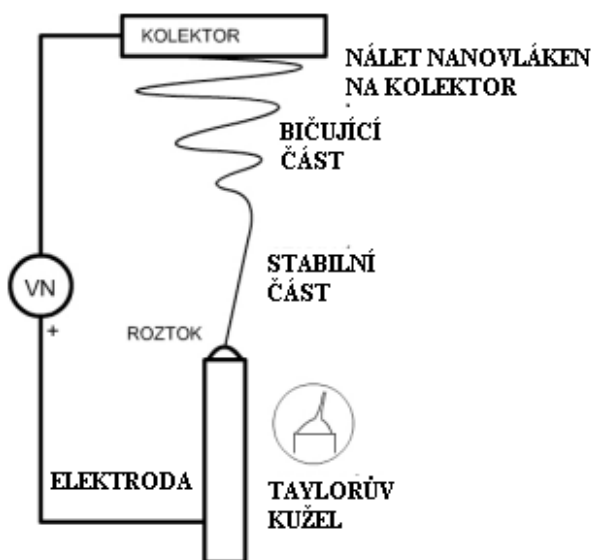
# 1. Základní principy tvorby nanovláken

## 1.1 Princip elektrospinningu

Podstata procesu elektrostatického zvlákňování, neboli elektrospinningu spočívá v samoorganizaci polymerního roztoku či taveniny do nanovláken za pomoci působení elektrostatického pole. Z fyzikálního hlediska se jedná o překonání kapilárních mezimolekulárních sil mezi řetězci v roztoku polymeru, silami elektrostatickými. Vlivem kapilárních sil se kapaliny snaží držet pohromadě, aby minimalizovaly svůj povrch a tím povrchovou energii. Zatímco elektrostatické síly se týkají nabitých kapalinových těles, která se rozpadají na základě Coulombických sil mezi ionty stejného znaménka (Lukáš, 2009).

Elektrospinning jako fyzikální jev poprvé navrhl Morton v jeho patentu podaném v roce 1900. Principy moderního jehlového elektrospinningu poté vznikaly v práci od Johna Zeleného (1914), který se věnoval studiu vlivu elektrického pole na kapalinu, kde se zabýval výboji mezi kapalinou a deskou (Lukáš, 2009).

Proces elektrospinningu můžeme rozdělit do několika částí, nejprve máme kořen



u kapalinové trysky – Taylorův kužel nebo také Taylor cone, poté následuje stacionární část trysky – stable jet, stabilní část přechází v bičující část trysky, které říkáme whipping zone, dále dochází k odpaření rozpouštědla – solvent evaporation a následnému náletu nanovláken na kolektor.

Obr. 1 Formování polymerního roztoku. Upraveno podle (Běťák, 2012).

## 1.2 Parametry elektrospinningu

Elektrospinning je komplexní a mezioborový proces. Navíc není jednoduché předpovědět optimální parametry roztoku pro přípravu vláken, která budou mít požadovaný průměr i přesto, že se pracuje s přesně definovanými fyzikálními veličinami (Běťák, 2012). Také Xie et al. se ve své práci zabývají elektrostatickým zvlákňováním, rovněž rozprašováním pro cílený transport léčiv, kde jako modelový protein byl použit hovězí séroví albumin (BSA), který byl rozptýlený v PLGA (kopolymer kyseliny polyglykolové a polymlečné) roztoku (Xie et al., 2009). Rovněž Chakraborty se ve svém článku zabývá elektrostatickým zvlákňováním a rozprašováním pro cílený transport léčiv, popisuje jednotlivé parametry mající vliv na tvorbu vláken nebo částic, kde mezi hlavní parametry patří typ polymeru, rozpouštědla a viskozita polymeru (Chakraborty, 2009).

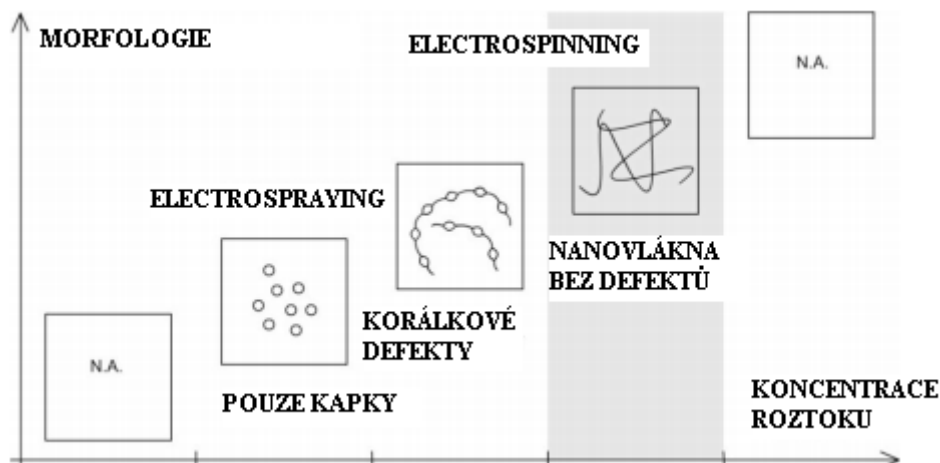
Nejvýznamnější veličiny a parametry elektrostatického zvlákňování, které byly získány na základě procesních fází

Tabulka 1. : Nejvýznamnější veličiny a parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování.

<b>Roztokové</b>	<b>Regulované</b>	<b>Okolní</b>
viskozita	vzdálenost emitor/kolektor	teplota
vodivost	gradient elektrického pole	vlhkost
povrchové napětí	tvar emitoru/kolektoru	proudění vzduchu
koncentrace	rychlost dávkování	složení atmosféry
permitivita	intenzita elektrického pole	
molekulová hmotnost		
topologie polymeru		

*Převzato z (Běťák, 2012).*

Zvyšováním viskozity se mění morfologie od kapek, či korálků na vláknech, přes vlákna bez defektů, až je viskozita natolik vysoká, že dojde k zastavení zvlákňování (Běťák, 2012).



Obr. 2 Morfologie nanoseného vzorku z roztoku s různou koncentrací. Převzato z (Běťák, 2012).

Z pohledu termodynamického hraje teplota a vlhkost velkou roli, protože je třeba, aby se z letícího vlákna během krátké doby odpařilo velké množství rozpouštědla, kde je právě třeba vyšší teplota a nižší vlhkost. Celému ději napomáhá velmi nízký poloměr křivosti (Běťák, 2012).

Koaxiálním elektrospinningem se zabývá Jiang, což je jednokroková technika zapouzdření krystalické, ve vodě rozpustné bioaktivní látky, včetně růstových faktorů, DNA do nanovláken. Proces koaxiálního elektrospinningu eliminuje škodlivé účinky v důsledku přímého kontaktu aktivní látky s rozpouštědlem, a rovněž slouží jako bariéra k zamezení předčasného uvolnění léku. Jiang zde zkoumá nejen vznik této techniky, ale právě také její potenciální budoucí vývoj pro řízené uvolňování (Jiang, 2014).

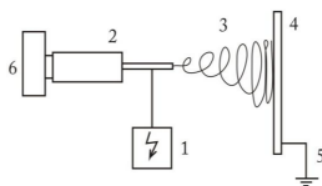
Wen se ve své práci zabývá kombinací elektrospinningu a elektrosprayingu pro výrobu PLGA mikrokuliček k přípravě scaffoldů v tkáňovém inženýrství (Wen, 2013).

Pomocí elektrostatického zvlákňování je možné vyrábět materiály pro tkáňové inženýrství, nosiče pro řízené uvolňování léčiv, scaffoldy, kryty ran, regeneraci cév, nervů a kostí.

## Technologie výroby

Zvlákňovat můžeme z různých typů elektrod, jako je například jehla, tyčka, váleček nebo struna, jejichž podmínkou je jejich vodivost. Interpretace procesu pro elektrostatické zvlákňování bude implementována pro zvlákňování z jehly, vzhledem k tomu, že tato metoda byla uplatňována v experimentální části.

**Metoda tvorby nanovláken z jehly** - při této metodě je do injekční stříkačky umístěn polymerní roztok, a poté je společně s jehlou vložen do dávkovacího zařízení. Na kovovou část jehly je přivedeno vysoké napětí. Proti jehle je umístěn uzemněný kolektor, jehož vzdálenost regulujeme na základě potřeby pro tvorbu nanovláken. Po nastavení vhodného dávkování polymeru, spustíme samotný proces elektrostatického zvlákňování, při kterém jsou vlákna zachytávána na již zmíněném kolektoru.



Obr. 3 Schematické znázornění elektrostatického zvlákňování z jehly, 1 zdroj vysokého napětí, 2 stříkačka s polymerním roztokem, 3 nanovlákná putující ke kolektoru, 4 kolektor, 5 uzemnění, 6 dávkovací pumpa. Převzato z (Chvojka, 2012).

## 2. Základní principy elektrostatického rozprašování (electrospraying)

Elektrostatické rozprašování neboli electrospraying je způsob rozprašování kapaliny. Tato metoda je odvozena od technologie elektrostatického zvlákňování, používá i totéž zařízení, rozdíl těchto technologií je především v materiálových parametrech a ve výsledném produktu, kdy při electrosprayingu nedochází k tvorbě vláken, ale částic. Princip electrosprayingu je založen na teorii nabitých kapiček, kde je elektrické pole aplikováno na kapičky vystupující z Taylorova kužele. Kapky produkované elektrostatickým rozprašováním jsou vysoce nabité. Jedná se o částice, jejichž rozměry bývají mnohdy menší, než 1  $\mu\text{m}$ . Electrospraying se uplatňuje v mnoha průmyslových procesech jako je mikroenkapsulace, elektroemulsifikace, produkce jemného prášku, nebo mikro a nano tenkých filmů, připravených z roztoků nebo koloidní suspenze. Sprejování z roztoků nebo suspenzí umožňuje výrobu jemných částic, až do velikosti nanometrů (Bock, 2012, Jaworek, 2007).

Elektrostatické rozprašování je založeno na dvou protilehlých elektrodách, mezi nimiž musí být nezbytný rozdíl potenciálů. První elektroda je tvořena zařízením pro rozprašování roztoku a na druhou elektrodu, také jinak kolektor, se hromadí vytvořené částice. Elektrostatické rozprašování je možné provádět z různých typů elektrod, jako je například kapilára, váleček, tyčka nebo struna, kde důležitou podmínkou je jejich vodivost. Dalšími důležitými vlastnostmi sprejovacího systému a samotného způsobu sprejování jsou povrchové napětí, viskozita a rychlost proudění kapaliny. Nicméně není zcela jednoduché nastavit vhodně tyto parametry, vždy je třeba vše nejprve optimalizovat (Jaworek, 2007).

Ghayempour a Mortazavi se ve své práci zabývají novou metodou enkapsulace, jedná se o koaxiální electrospraying, kde pro studii vlivu provozních parametrů na velikost a morfologii vyrobených částic, použili celou řadu experimentů, ze kterých zjistili, že například zvýšením napětí, průtoku, průměru trysky, vzdálenosti, molekulové hmotnosti polymeru a koncentrace, dojde ke zvýšení velikosti částic. Takto získané částice lze využít pro řízené uvolňování léčiv, kde dokáží zajistit zvýšenou efektivitu zapouzdření a jejich následné použití ve farmacii k zapouzdření enzymů, bakterií, minerálů a vitamínů

(Ghayempour a Mortazavi, 2013). Také Zamani se ve své studii zabýval koaxiálním elektro sprayingem pro výrobu core-shell PLGA mikročástic obsahující BSA, jako modelový protein. Byly použity dvě různé molekulové hmotnosti pro zapouzdření. Jako kontrola byla provedena fluorescenční mikroskopická analýza elektro sprayovaných částic pomocí barviva Fitc. Metoda koaxiálního elektro sprayingu by měla být tedy vhodná k minimalizaci kontaktu organického rozpouštědla s vodným roztokem proteinu, a to díky vysokému zapouzdření, čímž se snižuje riziko předčasné degradace léčiva (Zamani, 2014).

Morfologie a velikost kapiček může být dále řízena nastavením dalších parametrů, jako je například koncentrace polymeru a molekulová hmotnost či vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem (Bock, 2011).

## **2.1 Parametry elektrostatického rozprašování**

Parametry elektrostatického rozprašování můžeme rozdělit na procesní a materiálové. U materiálových parametrů je možné sledovat parametry roztoku jako takového, nebo se můžeme soustředit zvláště na samotný polymer, a zvláště na rozpouštědlo. Procesní parametry jsou takové, za kterých se mění podmínky dané technologie, mezi něž patří například vzdálenost elektrody a kolektoru, velikost napětí, klimatické podmínky, rychlost dávkování polymerního roztoku či rychlost odpařování rozpouštědla (Jaworek, 2009).

### **2.1.1 Materiálové parametry**

Záleží již na samotném výběru polymer – rozpouštědlo, protože ideální podmínky, které platí pro určitý polymer, nemusí platit pro jiný a to platí i pro rozpouštědlový systém.

V článku A. Jaworka, je jako hlavní parametr rozhodující o tvorbě sprejovaných částic, popřípadě vláken, uváděna viskozita. Kdy se zvyšující se viskozitou, jak bylo znázorněno na obrázku č. 2 (Běťák, 2012), dochází k produkci vláken, nikoli sprejování. S vyšší molekulovou hmotností polymeru, se řetězce vzájemně proplétají, čímž se zvyšuje množství mezimolekulárních vazeb, ale i již zmíněná viskozita. Proto je vhodné při procesu elektrostatického rozprašování používat roztoky s nižší koncentrací nebo také s nižší moleku-



lovou hmotností (Jaworek, 2009). Molekulová hmotnost je charakteristikou daného polymeru, a je dána poměrem látkového množství a hmotnosti. Viskozita jako taková je fyzikální veličina, která vyjadřuje odpor materiálu vůči toku, jejíž hodnota vzrůstá spolu s koncentrací roztoku, a je definována vztahem (1). Viskozita může být kinematická ( $\nu$ ) nebo dynamická ( $\eta$ ), jejichž vztah je znázorněn rovnicí (2). Viskozita je tedy závislá na molekulové hmotnosti, koncentraci, druhu rozpouštědla, teplotě, aditivech a množství případných nečistot (Lukáš, 2009).

$$\sigma = \eta \cdot \frac{dv}{dx} \quad (1)$$

Kde  $\sigma$  značí tečné napětí působící na jednotkovou plochu, a to při posuvu dvou paralelních vrstev kapaliny, jež má rozměr [Pa],  $dx$  značí vzdálenost vrstev v [m],  $dv$  je rozdíl rychlostí vrstev v [m.s<sup>-1</sup>].

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (2)$$

Kinematická viskozita  $\nu$ , má rozměr v **m<sup>2</sup>. s<sup>-1</sup>**

Dynamická viskozita  $\eta$ , má rozměr v **Pa.s**

Na sprejování má také vliv zvolené rozpouštědlo, což je látka, která je schopná v sobě rozptýlit nebo disociovat částice jiných látek za vzniku roztoku. Máme ideální, dobrá a špatná rozpouštědla. Ve skutečnosti však ideální rozpouštědla neexistují, nicméně velmi se k nim blíží tzv. dobrá rozpouštědla, kde jsou polymerní klubka již výrazně rozvinuta a řetězce jsou téměř napřímené, zatímco ve špatných rozpouštědlech zůstávají polymerní klubka sbalená a to při všech teplotách. Organická rozpouštědla jsou nutná pro rozpuštění polymerů před procesem elektrosprayingu (Lukáš, 2009).

Široce používané rozpouštědlo pro elektrospraying částic naplněných léky, je dichlormethan, který má z používaných rozpouštědel nejnižší teplotou varu (40°C). Ostatní rozpouštědla používaná pro tento proces mají vyšší teplotu varu, a patří mezi ně například aceton, chloroform, etanol, acetonitril, 1,2-dichlorethan nebo kyselina octová, která mohou být používána buď samostatně, nebo v kombinaci.

Teplota má podstatný vliv na velikost a morfologii částic. Rozpouštědla s vysokými teplotami varu se odpařují hůře a naopak. Bod varu rozpouštědla je teplota, při které se tlak páry rovná okolnímu atmosférickému tlaku. Již dříve bylo prokázáno, že zvýšení teploty varu, snižuje těkavost a to souvisí s menší velikostí produkovaných částic. Což platí pro rozpouštědla s teplotou varu nad 140°C. Naopak u chloroformu (61°C), můžeme spatřit větší velikosti částic, kde dochází k rychlému odpařování, které může vést k tvorbě pórů, a dokonce i dutých částic. Ale jak už jsem jednou uváděla různé polymery, mají různé interakce s danými rozpouštědly, tudíž se případ od případu liší. Proto záleží i na rozpustnosti polymerů, které nejprve nabobtnají a až poté se začnou rozpouštět. Obecně platí, že čím vyšší molekulovou hmotnost mají, tím delší dobu se rozpouštějí (Bock, 2012).

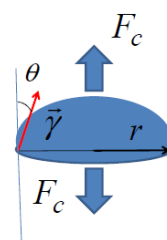
Dále sem také patří kapilární síly, zobrazené na obrázku (6), které souvisí s povrchovým napětím, dávají kapalinovým tělesům kulovitý tvar, a to z toho důvodu, že se kapaliny snaží minimalizovat svou volnou energii, a tak dochází k přetahování mezi elektrickými a kapilárními silami. Pro proces elektrostatického rozprašování je důležité překonat pomocí elektrostatických sil, síly kapilární, které jinak chrání kapalinu proti její deformaci (Lukáš, 2009).

Jestliže máme ideální kulovou kapalnou polokouli s poloměrem  $r$ , působí po jejím obvodu povrchové napětí  $\gamma$ , dochází ke vzniku kapilární síly  $F_c$ , což je síla potřebná k odtržení kapičky. Síla  $F_c$  způsobuje kapilární tlak  $p_c = \frac{F_c}{\pi r^2} = \frac{2\pi r \cdot \gamma}{\pi r^2} = \frac{2\gamma}{r}$

Laplaceův kapilární tlak je všeobecný kapilární tlak na libovolně zakřiveném povrchu kapaliny, kde  $K_1$ ,  $K_2$  jsou hlavní křivosti a obecně platí:

$$p_c = \gamma(K_1 + K_2) = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

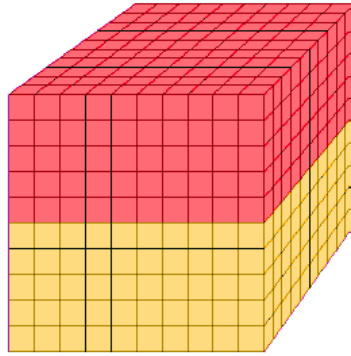
Kapilární síla je dána vztahem:  $F_c = 2\pi r \cdot \gamma \cdot \cos\theta$



Obr. 4 Kapilární síly. Převzato z (Lukáš, 2013).

Lukáš, D. ve své práci popisuje povrchové napětí pomocí mřížového modelu s konstantní teplotou. V mříži se nacházejí buňky, představující vždy jeden druh kapaliny. Buňky, které spolu sousedí, se navzájem energeticky ovlivňují, kdy interakční energie

mezi stejnými buňkami je menší, než mezi různými buňkami. Na obrázku 7 je znázorněn mřížový model, kdy došlo k vydělení fází dvou druhů kapalin, v důsledku minimalizování jejich volné energie (Lukáš, 2009).

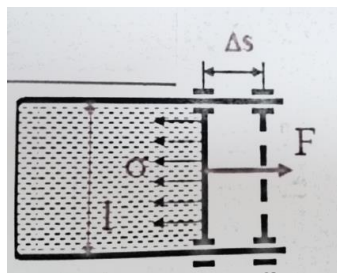


Obr. 5 Mřížový model s vydělenými fázemi. Zpracováno podle (Lukáš, 2009).

Maxwell ve svém experimentu, znázorněném na obrázku 8, potvrdil, že povrchové napětí má stejný rozměr jako povrchová energie, což je možné vidět v rovnici (3) a (4), kdy k vytvoření nové oblasti  $A$  obdélníkového tvaru, je potřeba síla  $F$  působící na hranu  $l$ . Práce  $W$  je vynaložena na posunutí hrany  $l$  o délku  $a$ . Tato práce  $W$  musí být rovna povrchové energii  $\Delta W_A$  elementární plochy rozhraní mající plochu  $\Delta A = a \cdot l$

$$\text{Povrchová energie } W_A \text{ je tedy rovna: } W_A = \frac{\Delta W}{\Delta A} = \frac{F \cdot a}{a \cdot l} = \frac{F}{l} = \gamma \quad [\text{N/m}] \quad (3)$$

$$\text{Povrchové napětí } \gamma \text{ je tedy síla působící na jednotku délky } \gamma = \frac{F}{l} \quad [\text{N/m}] \quad (4)$$



Obr. 6 Maxwellův experiment. Převzato z (Lukáš, 2013).

## Maxwellův experiment

Drátěný rámeček s posuvnou příčkou ponoříme do mýdlového roztoku, vlivem povrchového napětí se na něm vytvoří tenká kapalinová blána s povrchovými vrstvami na obou stranách, kdy povrchové napětí působí na 1 vrstvu silou:  $F = \gamma \cdot l$

A jelikož má blána dvě vrstvy, tak síla  $F'$ , která drží příčku v rovnováze, je rovna:

$$F = 2\gamma \cdot l$$

Na posun příčky o  $\Delta s$  potřebujeme vykonat práci  $\Delta W = 2\gamma \cdot l \cdot \Delta s$

**Elektrická vodivost** - rovněž elektrická vodivost je důležitým parametrem elektroprayingu, kde se jako ideální vodivost podle Jaworka, jeví hodnota v rozsahu  $10^{-4} - 10^{-8}$  S/m. Elektrická vodivost udává, jak dobře je materiál schopen vést elektrický proud, kde víme, že většina polymerů jsou izolanty, ale pokud jsou ve směsi s rozpouštědly, tak už vykazují nepatrnou elektrickou vodivost. Elektrická vodivost je v podstatě převrácená hodnota elektrického odporu  $R_e$  (Bock, 2012, Jaworek, 2009, Lukáš, 2009).

### 2.1.2 Procesní parametry

Mezi parametry procesu patří intenzita elektrostatického pole a vzdálenost elektrod. Při elektrostatickém rozprašování není třeba tak vysokých hodnot, jako u elektrostatického zvlákňování, kdy se vlivem vysokého napětí zvětšuje průměr částic, což má za následek tvoření defektů a následně vláken. Intenzita elektrostatického pole je Coulombova síla na 1 náboj v prostoru. Intenzita nepůsobí sama na sebe – náboj působí na všechny ostatní, jen na sebe ne. Jednotkami intenzity jsou  $\mathbf{E} = [\text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{C}^{-1} = \text{N} \cdot \text{C}^{-1} = \text{V} \cdot \text{m}^{-1}]$

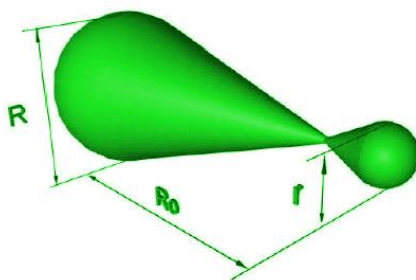
Lord Rayleigh na základě dynamického chování kapky, jako první, odvodil podmínky pro destabilizaci kapek vodivých kapalin. Kapka vystavená vnějšímu elektrickému poli se začne deformovat z dokonalé sféry na oválný tvar a následně se rozdělí, přitom stačí vyvinout pouze nepatrnou nestabilitu. Lord Rayleigh počítal všechny možné deformace

kapky, kterých by kapka mohla dosáhnout, čímž došel ke stanovení dynamického kritéria rozpadu:  $Q^2 \geq (n + 2) \cdot 4\pi\gamma r^3 \cdot (4\pi\epsilon)$ , kde  $n$  jsou všechny možné deformace. Statické kritérium rozpadu:  $Q^2 \geq 64\pi^2 \epsilon\gamma r^3$

Čím je náboj větší, tím menší je tendence k rozpadu kapky.

Kapka s rovnoměrně rozloženým nábojem je nestabilní, dochází k její postupné deformaci do tvaru rotačního elipsoidu, kdy je náboj rozložen nerovnoměrně. Kapka tvaru elipsoidu nepraskne, ale vytvoří si na jednom apexu svůj vlastní Taylorův kužel, ze kterého se uvolní přibližně 20 dceřiných kapiček, jejichž velikost je cca 10x menší než původní kapky. Z každé dceřiné kapičky se uvolní další dceřiné kapičky, tento proces se opakuje tak dlouho, dokud v kapičkách nezbyde pouze jeden elementární náboj (Lukáš, 2009).

Vývoj dceřiné kapky vlivem elektrostatických sil je znázorněn na obrázku 9, kde  $r$  je průměr dceřiné kapky, velké  $R$  značí průměr mateřské a  $R_0$  je vzdálenost mezi středy potenciálních koulí.



Obr. 7 Vývoj dceřiné kapky z kapky mateřské. Upraveno podle (Mikeš, 2011).

Vzdálenost elektrod souvisí s velikostí napětí a má opět vliv na velikost a produkci částic. Pokud bude vzdálenost příliš malá, tak nedojde k dostatečnému odpaření rozpouštědla, což způsobí, že částice, které dopadnou na kolektor, se nakonec začnou slévat v jednu vrstvu. Vzdálenost elektrod je tedy jedním z dalších důležitých parametrů ovlivňující proces elektrosprayingu, je třeba nalézt tu správnou vzdálenost, kde ani příliš velká nezaručí úspěch, jelikož při velké vzdálenosti hrozí, že částice ani nedolétnou na kolektor

a tudíž tam ani nemohou být zachyceny. Podle článku *Micro- and nanoparticle production by electrospraying* od Jaworka, A. je vhodné pro produkci jemnějších částic volit kratší vzdálenosti (Jaworek, 2007).

### **Velikost polymerních částic**

Velikost polymerních částic, které obsahují bioaktivní molekuly, významně ovlivňuje jejich léčebné schopnosti. Větší plocha povrchu k poměru objemu (menší částice), vede k rychlejšímu uvolnění, a tím i ke snadnějšímu šíření léků a rychlejší degradaci polymerní matrice. Technika elektrostatického rozprašování může produkovat částice o velikostech pohybujících se od desítek mikrometrů až po desítky nanometrů (Bock, 2012).

Je však důležité zdůraznit, že to není jenom sama velikost, která řídí profily uvolňování, ale také to úzce souvisí s výběrem polymer/léčivo/rozpouštědlo, a rovněž procesní parametry.

Monodisperzita se získá snížením průtoku, zvýšením koncentrace polymeru (vyšší viskozitou), snížením vodivosti elektrostaticky rozprašovaného roztoku a snížením použitého napětí (Bock, 2012).

V článku od Yao et al. byly pro výrobu částic použity PLGA, EVAC a PCL. Jedná se o běžně používané polymery pro výrobu mikro-a nanočástic užívaných pro cílený transport léčiv. Dichlormethan (DCM) a acetonitril (ACN) byly použity, jako organická rozpouštědla. Pracovalo se tedy se dvěma organickými kapalinami: PLGA + DCM ( $w / v = 7\%$ ), PLGA + ACN ( $w / v = 8\%$ ), které byly rozprašovány v elektrickém poli na třech tryskách s různými vzdálenostmi. Bylo zjištěno, že velikost částic se snižuje s klesající vzdáleností trysky, tedy s rostoucí intenzitou elektrického pole, stejně jako při použití rozpouštědla s vyšší vodivostí (Yao et al., 2008). Je však důležité mít na paměti, že zvýšení vodivosti snižuje oblast stabilního režimu kužel-tryska a tím má i standární odchylka potřebu se zvyšovat.

Použití techniky koaxiálního elektrosprayingu ve spojení s technikou elektrospinningu aplikované na podávání léku bylo poprvé zaznamenáno ve studii Wang et al., kdy vytvořili tkáňový scaffold, s anizotropní strukturou, díky němuž bylo možné dodávat růstové faktory pro přežití buněk (Wang et al., 2009).

### 3. Enkapsulace

Enkapsulací se rozumí zapouzdření aktivní látky do obalového materiálu, který bývá z biologicky rozložitelných polymerů, které mají za úkol udržet biologickou integritu a dlouhodobou biologickou aktivitu terapeutické molekuly. Toto polymerní zařízení nám poskytuje expozici po delší dobu, v rozmezí od několika hodin až po měsíce, a to díky již zmíněné postupné degradaci polymeru.

Enkapsulací se ve své práci zabývá Ma, kde se řeší uplatnění biologicky rozložitelných polymerů PLA a PLGA pro cílený transport léčiv. Do PLA/PLGA kapslí jsou zapouzdřeny peptidové léky a proteiny (Ma, 2014).

Pro cílený transport léčiv ve formě kapslí existuje mnoho technologií výroby, kde mezi tři základní metody, kterými se ve svém článku zabývá Ye, patří emulgace, která je založená na odpařování rozpouštědla, dále sušení rozprašováním a fázová separace (Ye, 2010).

Feczko ve své studii zjišťuje vliv procesních podmínek na velikost PLGA částic, které jsou určeny pro cílený transport léčiv, jež byly vytvořeny dvojitou emulzí metodou odpaření rozpouštědla (Feczko, 2011). Dalším, kdo se zabýval efektivitou této metody, byl Martín-Sabroso, v článku *Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles* (Sabroso, 2015).

V práci od Vysloužila et al., se autoři zabývají vlivem různých formulací a parametrů při procesu přípravy léků vložených do PLGA mikročástic. Příprava proběhla metodou odpaření rozpouštědla, kde enkapsulovaným lékem byl ibuprofen. Měnila se rychlost míchání mechanickým míchadlem, koncentrace emulgátoru a výběr rozpouštědla. Ukázalo se, že rychlost míchání v průběhu odpařování rozpouštědla má vliv na velikost částic, kdy se jejich střední velikost snižovala s rychlostí míchání, při kterém docházelo k rozdělování vnitřní fáze na menší kapičky. Velikost částic je závislá i na viskozitě vnější fáze, protože s rostoucí koncentrací PVA se jejich velikost snižovala. Velikost částic, které byly připraveny s 0,1 % PVA, se pohybovala v rozmezí 169,7 – 382,8  $\mu\text{m}$ , zatímco s 1% PVA byla velikost částic od 90,7 do 284,3  $\mu\text{m}$ . Také typ rozpouštědla měl vliv na vyrobené částice, kdy při použití dichlormethanu vznikaly hladké částice, zatímco při použití

ethylacetátu měly částice drsný povrch. Rozdíly mohou být vlivem rozdílných polarit. Dále se v tomto článku zabývají kinetikou uvolňování (Vysloužil et al., 2014).

Wan et al. se snaží porozumět dopadu PLGA mikročástic na uvolňování aktivní látky připravených metodou sušení rozprašováním, kde se ukázalo, že důležitou roli hraje volba rozpouštědla (Wan et al., 2013).

Jako další známá metoda pro zapouzdření aktivní látky se používá elektrostatické rozprašování, při kterém vznikají polymerní částice ve formě mikrokapslí nebo nanokapslí, většinou kulovitého, ale mohou být i jiného, tvaru o velikosti od 50 nm až po 1 mm. V případě mikrokapslí je aktivní látka distribuována rovnoměrně v celé struktuře polymeru, zatímco u nanokapslí, je aktivní látka umístěna pouze v jádru kapsle, která je obalena polymerem. Kapsle mohou být získávány také koaxiálním rozprašováním, kde v jádře je umístěna léčivá látka ve formě roztoku, a jako obal slouží určitý polymer. Tato metoda se provádí většinou v případě, kdy roztok léčiva není samostatně zvláknitelný. Zároveň by jádro nemělo být mísitelné s obalem, proto se musí volit vhodná kombinace obal-jádro (Bock, 2012).

Elektrostatické rozprašování je známá jako technika, která může poskytnout vysokou účinnost zapouzdření, jež se značí zkratkou (EE), což je překlad z anglického „encapsulation efficiency“. Bylo skutečně prokázáno dosažení 100 % EE pro doxorubicin a PLGA částice za použití loadingu v Rhodaminu B. Je zde možnost zapouzdření obou typů léků, jak hydrofilních, tak hydrofobních, kdy jsou efektivně získány v porovnání s tradičními metodami, především proto, že není potřeba emulzní roztok. V disperzních metodách může přítomnost obou fází, tedy vodné a organické, vést k preferenčnímu šíření léku do jedné fáze, nebo do ostatních podle jejich hydrofilicity/hydrofobocity, a v konečném důsledku tak může dojít ke snížení efektivnosti zapouzdření. Této možnosti je právě díky elektrostatickému rozprašování, kde emulze není potřeba, zabráněno (Almería et al., 2011).

Efektivita zapouzdření se liší případ od případu, záleží na kombinaci léčivo/rozpouštědlo/výběr polymeru, kde hydrofilicita těchto prvků, hraje důležitou roli. To může být ilustrováno s ohledem na povahu samotného polymeru, kde například zapouzdření BSA ve více hydrofobním polymeru, jako například v PCL, vedlo k pouhé 28 % efektivitě



zapouzdření, ve srovnání s PLGA, kdy za stejných podmínek, byla efektivita 40 % (Xie et al., 2007).

Rovněž použití hydrofilních přísad je třeba zvážit, bylo prokázáno, že vysoce hydrofilní kopolymer – Pluronic F- 127, použitý jako povrchově aktivní látka, zvýšila účinnost zapouzdření z 53,4 na 76,7 % a to při použití 5 a 10 % Pluronicu, respektive PLGA mikročástice naložené s BSA, zvýšením w/o stability emulze (Xie et al., 2007).

Zvýšení loadingu vede obecně ke snížení efektivnosti zapouzdření, což bylo pozorováno na elektrostaticky rozprašovaných PLGA filmech, naložených s paklitaxelem, kde 5, 10, 15 a 30 % zatížení, vedlo k 80; 71,9; 66,4 a 63 % efektivnosti zapouzdření. Příčinou byl rozdělovací koeficient, s odkazem k rovnovážné rozpustnosti léčiva v polymeru, proti rovnovážné rozpustnosti léčiva v rozpouštědle, jež byl také odpovědný za šíření léčiva do polymerní fáze (Xie et al., 2008).

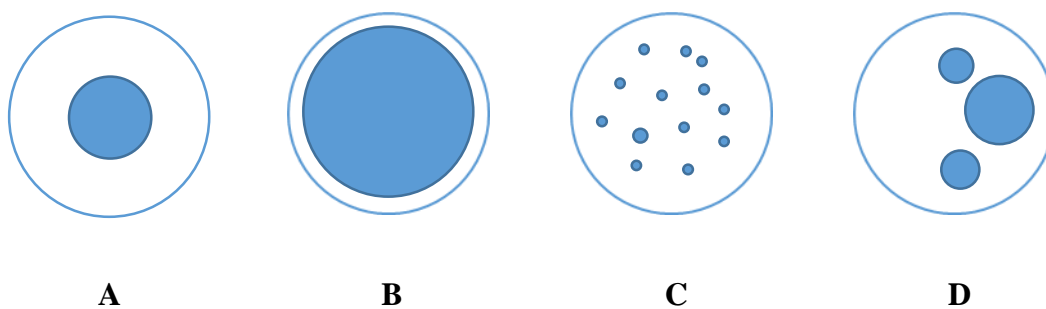
Ve studii Xie et al., pro polymerní roztoky při elektrostatickém rozprašování, se zvýšením paklitaxelu z 8 na 16 % zatížení, mírně snížila efektivita zapouzdření v PLGA mikročásticích z 82 na 78 % (Xie et al., 2006).

V práci od Kima se zabývají biologicky odbouratelnými kapslemi, jež se skládají ze dvou a více obalů, které jsou tvořeny koaxiálním elektrostatickým sprejováním. Jedná se o tzv. triaxiální elektrosprejovou metodu, kde je jedna vrstva složena z PLGA, druhá z PDLA, a až pod touto druhou vrstvou, je uložena aktivní látka. Kapsle vykazovaly poměrně monodisperzní velikosti, velikost a tloušťka každé vrstvy byla regulována průtokem a koncentrací polymeru. Výhodou bylo, že první uvolnění léku bylo podstatně sníženo a nedošlo tak k rychlému uvolnění léčiva hned na začátku procesu. Nabízí se zde i možnost uvolňování více léků současně, proto má tato technika celkem velký potenciál pro cílené dodávání léčiv (Kim, 2011).

V současné době zatím neexistují žádné standartní podmínky, které by mohly být použity pro všechny typy proteinů, jelikož každý je jiný, jsou rozdíly v terciální struktuře, molekulové hmotnosti nebo v náboji, a z tohoto hlediska je každý protein jedinečný. Proto je optimalizace přípravy mikročástic obtížný proces. Například, když dáme dva odlišné proteiny do stejných PLGA mikročástic, za stejných podmínek, tak budou velké rozdíly v efektivitě zapouzdření u obou proteinů (Ye, 2010).

## Typy kapslí

Díky těmto idealizovaným typům kapslí, dochází k uvolňování léčiva v námi zvolených časových intervalech. Například typ kapsle jádro/plášť uvolní léčivo najednou, zatímco vícejaderný typ kapsle anebo matricová kapsle budou uvolňovat léčivo postupně (Arshady, 1999).



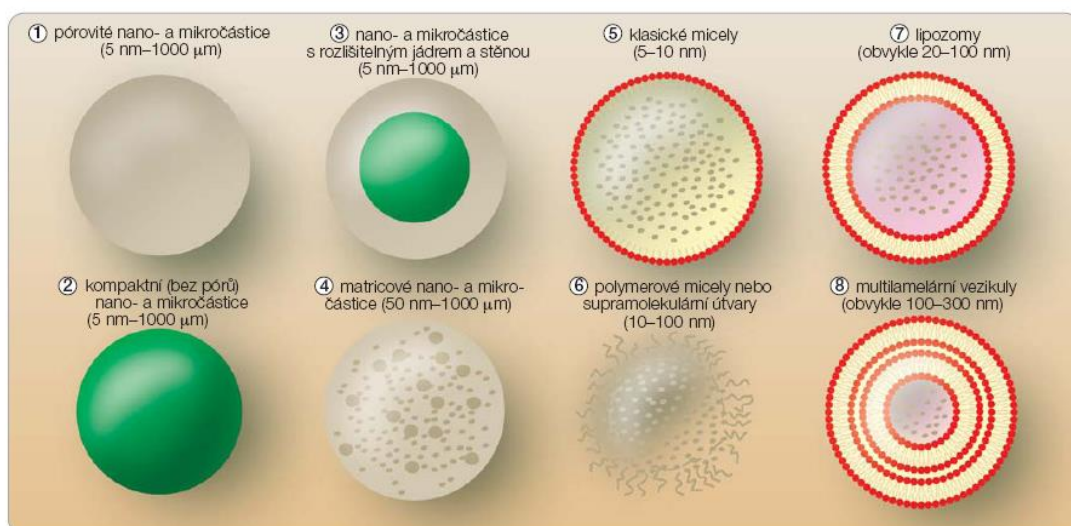
*Obr. 8 Morfologické typy kapslí. A), B) jádro/plášť, C) matricová kapsle, D) vícejaderná kapsle*

## 4. Cílený transport léčiv

Principem cíleného transportu léčiv, je dopravit léčivo pouze do nemocných buněk, například nádorových, a omezit tak nežádoucí účinky na zdravé tkáně. Je zde snaha vytvořit takový transportní systém, který by dokázal ukrýt léčivo tak, aby nedocházelo k jeho uvolňování a působení během transportu, a následně jej dopravit do vybrané tkáně, kde by se léčivo již uvolnilo (Králová, 2010). Tyto požadavky vedou ke studiu polymerních biologicky rozložitelných částic, které by měly být schopny degradovat požadovanou rychlostí a následně umožnit lokální uvolňování inkorporovaných látek uvnitř daného materiálu.

Z pohledu nanomedicíny je cílený transport založen na postupu, kdy v sobě nanočástice enkapsuluje léčivo, přičemž nanočástice sama, nebo pomocí rozpoznávacích elementů na jejím povrchu, nalezne pravé místo pro účinek. Pro vlastní realizaci je potřeba připravit samotnou nanočástici, dále zachycení léčiva a také připojení specifického receptoru, jako například protilátky. Celý transportní systém je poměrně složitý a musí tak splňovat řadu podmínek.

Nanočástice musí mít zejména vysokou kapacitu pro zvolené léčivo. Za fyziologických podmínek, obvykle v kardiiovaskulárním systému, musí zůstat stabilní. Cílem je kontrolované uvolňování léčiva, které je možné spustit například působením intracelulárních látek, nebo kolapsem liposomů, při snížení pH v cílové tkáni. Centrálním bodem je kontrolované uvolňování léčiv v chemoterapii, kde v řadě případů probíhá uvolňování nedostatečným způsobem. V současné době se začínají používat polymerní micely, ale jejich velkou nevýhodou je nedostatečný enkapsulační objem pro léčivo. A jako další možnost je používání pH senzitivních transportních nanočástic, či pomocí magnetických nanočástic (Král et al., 2005).



Obr. 9 Schematické znázornění morfologie různých typů nano- a mikročástic bez léčiva a s léčivou látkou. Převzato z (Rabišová, 2007).

Částice 1 a 2 reprezentují pórovité nebo kompaktní (bez pórů) nano- a mikročástice (5 nm-100 μm). Jsou to jediné dva typy částic, jejichž funkce se neodvozuje od jejich vnitřní chemické nebo strukturní stavby nebo funkčních zbytků, které mohou být kovalentně navázané k povrchu částice. Částice 3 s rozlišitelným jádrem a stěnou – nanotobolky a mikrotobolky, velikost 5 nm-1000 μm, 4 maticové nano- a mikročástice, velikost 50 nm-1000 μm, 5 klasické micely (5-10 nm), 6 polymerové micely nebo supramolekulární útvary (10-100 nm), 7 lipozomy (obvykle 20-100 nm) a 8 multilamelární vezikuly (obvykle 100-300 nm) reprezentují nano- a mikročástice, které nesou léčivou látku nejčastěji připoutanou fyzikálními vazbami.

Pro enkapsulaci léčiv se používají liposomy a polymery, které jsou použity jako nanočástice, což jsou systémy o velikosti 1-100 nm, kde se kolem léčiva vytvoří kapsle a díky její biodegradaci v organismu, dojde k uvolnění léčiva. Je snahou tento způsob léčby aplikovat v oblasti neurologických a očních poškození.

Při použití vhodných výrobních technologií, s ohledem na kritické rozměry, kompatibilitu rozpouštědla, propustnost a náklady na stroje, může být dosaženo levné, spolehlivé mikrovýroby, a mezi-úrovně DDS (Král et al., 2005).

## Volba molekul

Většina farmaceutických léků a proteinů je drahá, z toho důvodu je většina studií do-  
dávání léčiv nejprve provedena s modelem léku, či proteinu na umožnění optimalizace parametrů a charakteristik. Co se týká proteinů, tak mezi hojně využívaný „model“ patří

BSA, který je snadno k dispozici a nabízí vysokou stabilitu a nízké náklady. Je vhodný především v časných stádiích optimalizace. Molekulová hmotnost BSA je 66,4 kg/mol, která je podobná velikosti některých růstových faktorů (GF<sub>s</sub>) sloužících k regeneraci tkání. Sérové albuminy jsou také široce užívány jako nosiče, jelikož mají schopnost vázat širokou škálu biologických molekul, například kationtové, aniontové, hydrofilní, hydrofobní látky, nebo také mnoho léků jako například antikoagulanty a anestetika, které se naváží na sérový albumin a následně jsou přepravovány krví. Bylo prokázáno, že sérové albuminy nemají žádný nepříznivý vliv na většinu biochemických reakcí, a spíše naopak chrání biologickou aktivitu molekul v podmínkách enkapsulace (Pareta et al., 2005, Jaklenc et al., 2008). Zapouzdřením BSA pomocí elektrosprayingu se ve své práci zabýval například Xie et al., kde docházelo k uvolňování po dobu 30ti dnů (Xie et al., 2007).

Také Kumari se ve své práci zabývá biologicky rozložitelnými částicemi, které nazval jako dopravní prostředky sloužící k cílené dopravě léčiv. Rozsáhle se zde také věnuje enkapsulaci (Kumari, 2009). Polymerními nosiči a jejich biokompatibilitou se ve své práci rovněž zabývá Fournier (2013).

## 5. Kinetika uvolňování

S příchodem biokompatibilních a biologicky rozložitelných polymerů, se výzkum hodně zaměřuje na vývoj vhodných polymerních systémů podávání léků, a jejich design pro aplikace trvalého uvolňování. Systémy polymerních dodávání léčiv, mají mít potenciál ochrany před degradací léčiva a zároveň zajistit transport na cílové místo v předem navrženém způsobu dodání. Tím by měla být léčba účinnější a současně by měla zabránit případnému předávkování léčivem. Kromě toho nabízejí snadnou cestu podávání, včetně ústní, plicní nebo parentální injekce, a přitom po uvolnění léčiva nepotřebují chirurgické odstranění (Xu, 2013, s. 3902).

Nyní je důležitým cílem dosáhnout správné rychlosti uvolňování, a zabránit počátečnímu rychlému uvolnění případným roztržením nosící částice. Proto na řadu přišly dvoustěnné mikročástice, které jsou složeny z jádra obsahující aktivní látku a z obalu. Tyto dvoustěnné mikročástice poskytují prodloužené uvolňování léčiv ve srovnání s jednostěnnými mikročásticemi. Uvolňování je upravitelné buď použitým materiálem obalu, nebo jeho tloušťkou. Je zde možnost zapouzdření více léků najednou, kdy je možné uvolnění léků v různých fázích, čímž je dosaženo synergicky terapeutického účinku. Například paralelní nebo sekvenční uvolňování více léků, by bylo užitečné pro urychlení různých růstových faktorů v tkáňovém inženýrství, nebo k formování inhibiční strategie při léčbě rakoviny. V poslední době roste zájem o vývoj vícevrstevných systémů k podávání léků (Xu, 2013, s. 3903).

K uvolňování dochází prostřednictvím dvou různých mechanismů, a to pasivní difúzí a degradací polymeru. V ideálním případě by systém kontrolovaného uvolňování měl být schopen se přizpůsobit potřebě daného problému, a podle toho zvyšovat či snižovat dávku automaticky. Profily uvolňování mohou být ovlivňovány, jak fyzikálními, tak chemickými faktory, jako je molekulová hmotnost či krystalinita polymeru, distribuce a činnost vložené molekuly, morfologie mikrokuliček, jejich pórovitost a velikost distribuce (Bock, 2012, s. 1531).

V práci od Shah byly zkoumány účinky fyzikálně-chemických vlastností antibiotik na morfologii, účinnost loadingu, velikosti a kinetiky uvolňování u PLGA mikročástic v různých loadingových procentech. Výsledky studie ukázaly, že chemická povaha antibiotik,

a to především náboj a molekulová hmotnost, mají vliv na začlenění, a následné uvolňování z PLGA mikročastic. Antibiotika se záporným nábojem vykazovala sníženou účinnost ve srovnání s kladným nábojem. Časový průběh uvolňování byl proměnlivý, a to mezi 3 až 7 týdny, kde u částic s nízkou molekulovou hmotností menší než 600 Da, docházelo k dvoufázovému uvolnění, zatímco u částic s molekulovou hmotností větší než 1000 Da, docházelo k třífázové kinetice uvolňování. Z čehož vyplývá, že znalost chemické povahy léku, může umožnit predikci způsobu uvolňování a bude tak snazší nastavit výrobní parametry (Shah, 2014).

Bohr, A. se ve své práci zabývá aktivními látkami s velmi pomalou rychlostí rozpouštění, jako například celecoxib (CEL), kde jako atraktivní způsob pro urychlení rozpustnosti vidí v elektrostatickém rozprašování, kde je rychlost řízena různými poměry CEL:PLGA. Celecoxib je nesteroidní protizánětlivé léčivo, které je široce používáno pro léčbu osteoartritidy, revmatoidní artritidy a akutní bolesti (Bohr, 2011). V článku od Yang et al., vytvářejí bio-test pro měření dlouhodobé biologické aktivity uvolněných protizánětlivých látek, a také pro testování bioaktivity celecoxibu propuštěného z PLGA platformy. A výsledky jsou více než uspokojivé, jelikož vykazují efektivní protizánětlivé účinky v průběhu delšího časového úseku (Yang et al., 2014).

### **Elektrostatické rozprašování a uvolňování léku**

Konvenční léky přes ústní podání obvykle neposkytují prostorově nebo časově řízené uvolňování terapeutických molekul. Krátké poločasy v roztoku většiny těchto molekul, také znamenají, že ztratí svou biologickou aktivitu rychle po implantaci, nebo je rychle odstraněn metabolismem v těle. Tyto nedostatky vyžadují vysoké dávky terapeutických molekul, čímž se zvyšují náklady, a případné komplikace způsobené možnou toxicitou pro buňky a tkáň (Jaworek, 2007, Lukáš, 2008).

Úkol loadingu léčiv do biodegradovatelných polymerů se obvykle provádí pomocí následujících tří způsobů: 1) obklopení léku biologicky odbouratelnou polymerní skořápkou k vytvoření nosiče zapouzdřeného léku, 2) smíchání léčiva v biologicky odbouratelném polymerním roztoku k vytvoření homogenní směsi, a poté následná emulgace k vytvoření léku začleněném v nosiči a 3) namáčení prefabrikované biologicky odbouratelné polymerní částice v roztoku léku k vytvoření nosiče s adsorbovaným léčivem. Mechanismy uvolňování léčiva, se pro každý z těchto tří způsobů, mírně liší. Obecně jsou procesy

uvolňování léčiv ovlivněny molekulovou hmotností, funkční skupinou daného polymeru, tvarem nosičů a samozřejmě také objemem vložených léků (Cho et al. 2015, s. 10-11).

## **5.1 Měření absorbance**

Absorpční fotometrie je nedestruktivní metoda, pomocí níž je možné stanovit koncentraci jak barevných, tak bezbarvých analytických disperzí. Pro barevné disperze se používá UV a viditelná oblast světla (380 – 760 nm) a pro bezbarvé se používá monochromatické světlo z oblasti UV (200 – 380 nm).

Pedacchia a Adrover se ve své práci zabývají kinetikou uvolňování barevných látek v polymerním loadingu tenkých proužků, kde používají absorbanci pro měření míry koncentrace rozpuštěné látky, což ve výsledku poslouží jako kvantitativní měření kinetiky uvolňování (Pedacchia a Adrover, 2014).

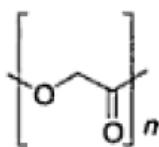


## 6. Alifatické polyestery, kopolyestery a jejich použití v tkáňovém inženýrství

Důležitou skupinu biodegradovatelných makromolekul s vynikající biokompatibilitou a degradabilitou, reprezentují alifatické polyestery, jako jsou hydrofobní poly(mléčná kyselina), poly(glykolová kyselina), polykaprolakton, a jejich kopolymery. Degradace těchto polymerů probíhá pomocí hydrolytických a enzymatických procesů a závisí na několika parametrech, mezi něž bezpochyby patří molekulová hmotnost, funkční skupiny nebo typy vazeb. Mají široké využití a to nejen v tkáňovém inženýrství, ortopedii a chirurgii, ale také při výrobě biologicky rozložitelných předmětů a při přípravě léčiv s postupným uvolňováním (Hermanová et al., 2011).

### 6.1 Poly(glykolová kyselina) PGA

Kyselina polyglykolová je vysoce krystalický, biodegradabilní polymer, jehož teplota tání se pohybuje okolo 225 °C a teplota skelného přechodu bývá 35°C. Má poměrně vysokou pevnost a také modul elasticity. Ve většině organických rozpouštědel je nerozpustný. Hydrolýzou nestabilních esterových vazeb nastává u tohoto polymeru proces degradace, jejíž doba závisí na molekulové hmotnosti, fyzikální geometrii, stupni krystalinity a také na vlastnostech okolního prostředí (Elias, 2007).

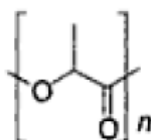


Obr. 10 Poly(glykolová) kyselina. Převzato z (Bronzino, 2006).

Polykondenzace glykolové kyseliny, HOCH<sub>2</sub>COOH, nevede k vysoké molekulové hmotnosti polymerů. Kyselina poly(glykolová) je proto vyráběna aniontovou polymerací cyklického dimeru glykolidu (Elias, 2007).

## 6.2 Kyselina polymléčná (PLA)

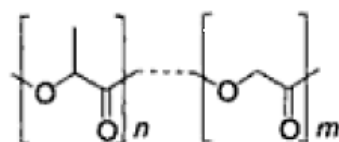
Jedná se o tvrdý materiál s teplotou tání v rozmezí 173-178 °C a teplotou skelného přechodu mezi 60-65 °C. Má zcela odlišné vlastnosti než kyselina polyglykolová, a to díky přítomnosti methylové skupiny na  $\alpha$ -uhlíku. Jsou tak možné L, D a D, L isomery PLA. Tento polyester je dobře rozpustný v halogenových uhlíkatých sloučeninách, dioxanu, ethylacetátu a spoustě dalších. Bývá používán jako šicí materiál, pro kostní šrouby či transplantáty a rovněž pro cílený transport léčiv (Elias, 2007).



Obr. 11 Kyselina poly(mléčná). Převzato z (Bronzino, 2006).

## 6.3 Poly(laktid-co-glykolid), PLGA

Vlastnosti toho kopolymeru jsou odvozeny podle toho, v jakém poměru jsou jednotlivé složky v této sloučenině obsaženy. Více hydrofobní než PGA je PLA, proto když bude kopolymer obsahovat více složky PLA, bude méně hydrofilní, bude absorbovat méně vody a s tím souvisí i pomalejší degradace, která může trvat až 5 let. Nejčastěji se však používá PLGA obsahující monomery v poměru 50:50. Mezi faktory, jež ovlivňují používání kopolymerů, jako nosičů, patří molekulová hmotnost, stupeň polydisperzity, a také rychlost biodegradace. Další podstatnou charakteristikou je teplota skelného přechodu, pro kterou platí, že s vyšším obsahem PLA v kopolymeru, a také s molekulovou hmotností roste její hodnota. Kopolymer PLGA se syntetizuje polykondenzací kyseliny mléčné a glykolové. Poly(mléčná-ko-glykolová) kyselina se široce používá jako nosný materiál v systémech pro dodávání léčiv, kvůli jeho biokompatibilitě a degradaci do kyseliny glykolové a mléčné v těle (Bohr, 2011). Cho et al., se ve svém článku rovněž zabývá využitím PLGA jako nosičů implantačních prostředků, kde se se následně zmiňuje i o ostatních biologicky rozložitelných polymerech (Cho et al., 2015).



Obr. 12 Poly(laktid-co-glykolid). Převzato z (Bronzino, 2006).

Kyselá povaha PLGA monomerů není vhodná pro léky nebo bioaktivní molekuly, nicméně některé nově vyvinuté přístupy dokázaly tyto problémy překonat. Pro tento polymer PLGA formulovala medicína mísení s alginátem, chitosanem, pektinem nebo také s polyvinylalkoholem (Hermanová et al., 2011).

### 6.3.1 Syntéza PLGA

Poly(lactid-co-glycolid) vzniká polymerizací monomerů kyseliny mléčné a glykolové. K syntéze dochází za sníženého tlaku vzduchu a při vyšší teplotě, kde monomery kyseliny mléčné a glykolové jsou spojeny esterovou vazbou, a vzniká tak lineární alifatický polyester. U lineárních kopolymerů může docházet k náhodnému štěpení esterových vazeb, což vede k vystavení léčiva kyselému prostředí, kdy v kombinaci se zvýšením teploty, může dojít k nežádoucí denaturaci proteinu. Tato nevýhoda je řešena vhodnými modifikacemi polymeru, jako například PLGA střídající se s PEO nebo PVA (Schnabel, 1981, Elias, 2007).

Článek od Almería et al. se zabýval procesem multiplexovaného elektrostatického rozprašování, ve kterém se podařilo vyvinout dobře řízenou metodu syntézy mikročástic elektrosprejovým sušením. Tato technika umožňuje povlaky s emulgátory nebo dalšími prostředky pro cílené podávání léčiv v jednokrokovém proudícím procesu, který je výhodný i pro výroby vysoké propustnosti. Cesta ES sušení umožňuje řízenou syntézu polymerních částic generovaných po odpaření rozpouštědla z prekursoru sprejovaných kapíček. Tato technika je jedinečná pro zajištění přísné kontroly velikosti částic a vysokou monodisperzitou mikrometrových velikostí částic, s relativní směrodatnou odchylkou menší než 15 %. Agregace částic ovlivňuje kinetiku uvolňování. Jedná se o přístup, který zahrnuje ukládání částic v lázni s vhodným složením, který umožňuje stabilizaci částic bez dalších změn ve velikosti nebo morfologii částic, a to s minimální ztrátou účinné látky

s efektivitou zapouzdření 94 %. Multiplexování ze zdrojů ES zvyšuje řádově propustnost, což vede k rychlému povlaku částic, a tím ke snížení ztráty léčiva v průběhu celého procesu potahování tablet, aniž by byla ohrožena jednotnost syntetizovaných částic. Vyvinutá technika překonává některá omezení, jež jsou předkládána u běžných způsobů odpařování rozpouštědla, zejména nízké účinnosti zapouzdření a nedostatkem reprodukovatelnosti. I přesto, že byl proces uveden v mikrometrickém měřítku, tak se očekává, že se vztahují také na měřítko nanometrů (Almerío et al., 2011).

## 7. Degradace

Degradace polymerů způsobena štěpnou reakcí chemické vazby v makromolekulách. Rozdělujeme několik typů degradací, a to termální, mechanickou, fotochemickou, radi- ační chemickou, biologickou a chemickou. Chemická degradace je působení chemikálií, jako jsou kyseliny, zásady, rozpouštědla, reaktivní plyny, při kontaktu s polymery. Teplotní degradace probíhá za zvýšené teploty, kdy začne docházet k chemickým změnám bez současného zapojení jiné sloučeniny. Iniciace biologické degradace úzce souvisí s chemickou degradací, co se týče mikrobiálního napadení. Mikroorganismy produkují velké množství enzymů, které jsou schopny reagovat s přírodními a syntetickými polymery. Mechanická souvisí se smykovými silami. Světlem vyvolaná polymerní degradace, nebo také fotodegradace se týká fyzikálních a chemických změn způsobené ozářením polymeru ultrafialovým nebo viditelným světlem. Nebo se může jednat i o elektromagnetickou radiaci (X-rays) (Schnabel, 1981).

### Hlavní požadavky na polymerní nosiče

- Stabilita v průběhu transportu
- Řízené uvolňování léčiva – enzymolýza, chemická hydrolýza
- Cílený transport k nádorovým buňkám, k nádoru
- Degradovatelný nosič, micelární nosič

Uvolnění léčiva z biologicky rozložitelných polymerních nosičů úzce souvisí s degradací polymerní matrice. Degradaci polymeru často předchází sled procesů, včetně absorpce vody, polymerní hydrolýzy a eroze matrice, které se vyskytují současně. Pro polyestery, vede proces degradace polymeru ke ztrátě hmotnosti matrice, která je charakteristická pro erozi. Biologicky degradovatelné polymery jsou klasifikovány jako hromadně a povrchově erodované materiály, u kterých je rychlost pronikání vody do matrice vyšší, než rychlost hydrolýzy. Voda tak difunduje do polymeru, což způsobí otok a následnou hromadnou degradaci celé částice. Pro povrchově erodované polymery, jako jsou polyanhydridy a poly(ortho estery), je naopak rychlost hydrolýzy vyšší, než míra penetrace vody, kde se hydrolýza omezí jenom na povrch polymeru, kde vnitřek matrice zůstává beze změny. Proto se také další studie zabývaly dvoustěnnými mikročásticemi, tvořenými jádrem s aktivní látkou a obalem bez aktivní látky (Xu, 2013, s. 3903).

## 7.1 Degradace alifatických polyesterů

Degradace alifatických polyesterů byla zkoumána mnoha autory. Je všeobecně známo, že PLGA a jejich homopolymery kyseliny polymléčná (PLA) a polyglykolová (PGA) se rozkládají hromadnou hydrolýzou esterové vazby. Bylo prokázáno, že rychlost degradace je ovlivněna několika fyzikálními a chemickými faktory, jako například počáteční pH, iontové síly, teplota vnějšího prostředí, poměr kopolymeru, molekulová hmotnost, krystalinita a také velikost vzorku (Schliecker, 2003, Elias, 2005).

Xu et al. se ve své studii zabývali vlivem molekulové hmotnosti pláště polymeru na uvolňování léčiva, a degradaci dvojstěnných mikročástic. Zde jsou mikročástice tvořeny doxorubicinem naložené v PLGA, kde jádro bylo obklopeno PDLLA. Doxorubicin měl úlohu modelového léčiva. Byly použity dvě různé molekulové hmotnosti PDLLA. Proces degradace byl monitorován pomocí rastrovací elektronové mikroskopie, laserové skenovací konfokální mikroskopie a gelové permeační chromatografie, kde shrnutí výsledků ze tří analytických nástrojů umožní objasnění mechanismu kontrolovaného uvolňování léků. Profily uvolňování doxorubicinu byly pro obě formulace podobné. Vykazovaly malou počáteční dávku (w 2% pro formulaci A a w 10% pro formulaci B) před vstupem do lag fáze, asi 25 dní. Lék se následně pomalu uvolňoval, téměř konstantní rychlostí, po dobu 100 dní. Zajímavostí je, že molekulová hmotnost neměla vliv na období lag fáze a následnou rychlost uvolňování léku. Jelikož se předpokládalo, že pomalejší eroze polymeru, a tím i pomalejší penetrace vody, jsou spojeny s vyšší molekulární hmotností obalu PDLLA, a v důsledku toho měla formulace B vykazovat delší lag fázi a pomalejší rychlost uvolňování léku. Ve skutečnosti souvisí podobné chování obou formulací s mechanismem rozkladu obalových mikročástic. Tudíž předpoklad, že vyšší molekulová hmotnost PDLLA pláště zabrání pronikání vody do jádra s léčivem, nebyl prokázán, jelikož změna molekulární hmotnosti neměla na pronikání vody vliv. Ovšem na povrchu plášťů docházelo k tvorbě pórů a dutin, voda tak pronikala do jádra, což mělo za následek jeho rychlou erozi, která proběhla během 40 - ti dní. Obě formulace, byly vystavovány hromadné erozi PDLLA, ale odlišná molekulární hmotnost neměla zásadní vliv na uvolňování léčiva. Jako kritické faktory, které ovlivňují uvolňování léčiva a degradaci dvojstěnných mikročástic, mohou být jak rychlost pronikání vody, tak vznik tvorby pórů, nebo také rychlost degradace polymerního jádra. (Xu et al., 2013, s. 3907-3910).

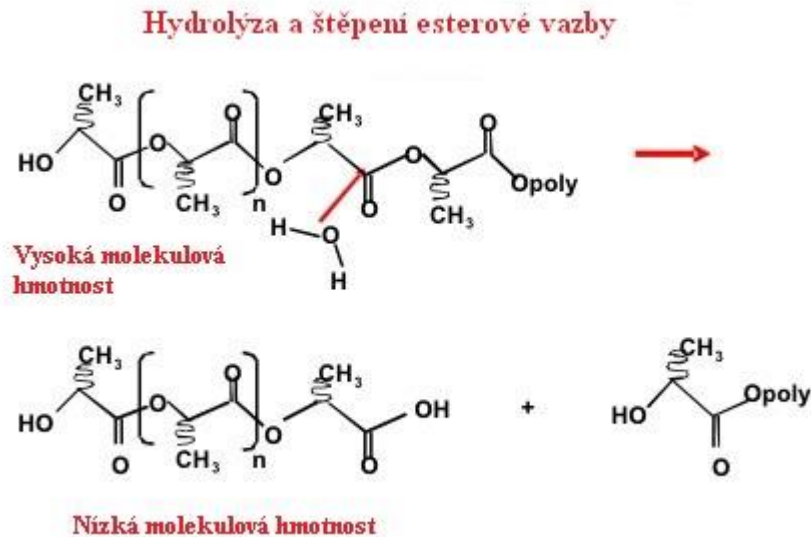
Xie et al. se zabývali výrobou biologicky rozložitelných polymerních částic elektrohydrodynamickou atomizací, pro aplikace trvalého poskytování léků proti rakovině, k léčbě C6 gliomu. V této studii byly použity pro výrobu mikročástic EHDA biologicky různě rozložitelné polymery, jako například PCL, PLGA, PDLA a PLLA, a rovněž i biologicky nerozložitelné polymery, jako je například EVAC. Za stejných provozních podmínek byly získány různé polymerní mikročástice s různou morfologií, a podobnými velikostmi částic. Bylo také zjištěno, že velikost mikročástic klesá s rostoucí vodivostí roztoku polymeru. Po elektrosprejingu roztoku jsou kapičky částečně neutralizovány a suší se za vzniku částic. Pro různé koncentrace lze získat různé morfologie částic, jejichž úpravou je možné regulovat velikost a morfologii částic. Účinnost zapouzdření všech vzorků byla kolem 80 %, a nakládání léku bylo asi 8 a 16 %. Paklitaxel naložený v PLGA mikročásticích se uvolňuje rychleji než z mikročástic PCL. Paklitaxel brání rakovinovým buňkám dostat se z dělicí metafáze do anafáze, čímž dochází k apoptóze, tedy odumření buněk (Xie et al., 2006).

Výsledkem této studie bylo úspěšné vyvinutí polymerních částic s kontrolovanou morfologií a jejich velikostí pro podávání léků aplikovaných modifikovaným EHDA za různých provozních podmínek. Bylo dosaženo více než 30-ti denního uvolňování in vitro s účinností kolem 80%. Výsledky také naznačují, že paclitaxel po zapouzdření podle EHDA udržel svou biologickou funkci a brzdil většinu C6 gliomových buněk v G2/M fázi (Xie et al., 2006).

Ghalanbor et al. se také zabývali využitím PLGA pro prodloužené uvolňování peptidu a proteinového terapeutika, kde byl řešen problém neúplného uvolnění proteinu z PLGA, což bývá často přičítáno nestabilitě proteinu v rámci PLGA, a to nejspíš díky kyselému mikroklimatu, které se vyvíjí v důsledku tvorby kyselých oligomerů během degradace PLGA. Neúplné uvolnění proteinu může být způsobeno také vlivem hydrofobní nebo iontové interakce mezi zachyceným proteinem a PLGA, což vede k adsorpci proteinu na polymer, což může vytvořit nerozpustnou vrstvu agregovaných proteinů. Výsledkem byla snaha zvýšení pórovitosti k úplnému uvolnění aktivní látky (Ghalanbor et al., 2013).

## 7.2 Enzymatická degradace

Poly(mléčná kyselina), poly(glykolová kyselina) a jejich kopolymery jsou lineární alifatické polyestery, které jsou odvozené od monomerů kyseliny mléčné.



Obr. 13 Hydrolyza a štěpení esterové vazby. Převzato z (UWEB, 2004).

Přítomnost esterových vazeb v hlavním řetězci polymeru umožňuje postupné hydrolytické degradace polymeru. Degradční produkty jsou endogenní sloučeniny, které jsou netoxické (UWEB, 2004).

PLGA kopolymery jsou biologicky odbouratelné uvnitř těla po jejich interakci s tělesnou tekutinou, enzymem a buňkami jednoduché hydrolyzy esterových vazeb do mléčné a glykolové kyseliny, které mohou být buď absorbovány tělem, nebo vyloučeny metabolickými drahami. V článku od Caie byl zkoumán vliv různých enzymů na rychlost degradace PLGA, mezi nimiž byl i enzym proteináza K, u kterého se prokázalo, že je schopen urychlit rozklad PLA. Výzkumy dále ukázaly, že k enzymatické degradaci došlo převážně na povrchu polymeru (Cai et al., 2003).



## Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory, díky kterým dochází prakticky ke všem chemickým reakcím v lidském organismu. Enzymy jsou bílkovinné povahy, pokud obsahuje pouze bílkovinnou složku, jedná se o jednosložkový enzym, a pokud je složen z bílkovinné a nebílkovinné části, tak se jedná o dvousložkový holoenzym, jenž je složen z apoenzymu (bílkovinná část) a kofaktoru (nebílkovinná část). Enzym se naváže na látky vstupující do reakce a vytvoří s nimi komplex enzym-substrát. Substrát se naváže na povrch enzymu a v aktivním centru pak probíhá biochemická reakce.



*Obr. 14 Navázání substrátu do aktivního centra enzymu a vznik komplexu. Převzato z (Břížďala, 2015).*

Rychlost enzymových reakcí je pokaždé jiná, závisí na množství substrátu a enzymu, také na teplotě, hodnotě pH a přítomnosti aktivátorů a inhibitorů.

# **PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9. Použité látky

V této části bych ráda nejprve popsala látky a chemikálie, jež jsem použila v experimentální části. Jedná se o látky, polymery a rozpouštědla, která byla využita pro elektrostatické rozprašování a zvlákňování. Dále jsou tu zařazeny inkorporované látky a fluorescenční barviva, která sloužila pro studium fluorescence použitého materiálu pod fluorescenčním mikroskopem.

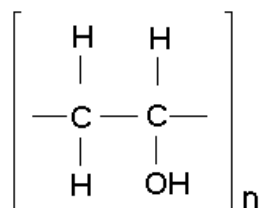
### 9.1 Polymery

#### Poly(laktid-ko glykolid) (PLGA)

Polymlečná-ko-glykolová kyselina se široce používá jako nosný materiál v systémech pro dodávání léčiv, kvůli jeho biokompatibilitě a degradaci do kyseliny glykolové a mléčné v těle, jak již bylo zmíněno v kapitole (6.1). A její vlastnosti jsou dány podle poměru jednotlivých složek. Použité polymery jsou dodány od společnosti Polysciotech.

#### Polyvinylalkohol (PVA)

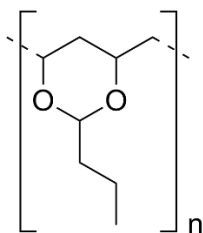
Polyvinylalkohol je ve vodě rozpustný syntetický polymer. Vzhledově se jedná o bílý prášek, zřetelně krystalického charakteru. Jeho odolnost proti rozpouštědlům závisí na střední molekulové hmotnosti, dále na obsahu nezhydrolyzovaného polyvinylacetátu a také na teplotě. S molekulovou hmotností jeho rozpustnost klesá. Také s rostoucím obsahem vinylacetátových jednotek, se jeho rozpustnost ve vodě snižuje a je třeba k tomu vyšších teplot. Zatímco v olejích není rozpustný ani při vyšších teplotách. V experimentu jsme používali 5 % koncentraci PVA s molekulovou hmotností 47 000 g/mol od společnosti Kuraray.



Obr. 15 Polyvinylalkohol. Převzato z (Prokopová, 2004).

## Polyvinylbutyral (PVB)

Polyvinylbutyral je pryskyřice, připravuje se z polyvinylalkoholu reakcí butyraldehydem a pro jeho houževnatost, pružnost, přilnavost k mnoha povrchům, optickou čírost se používá v aplikacích jako je vrstvené bezpečnostní sklo automobilů. Polyvinylbutyral s molekulovou hmotností 60 000 Da byl dodán společností Kuraray.

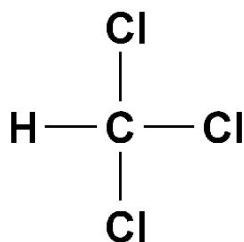


Obr. 16 Polyvinylbutyral. Převzato z (Prokopová, 2004).

## 9.2 Rozpouštědla

### Chloroform

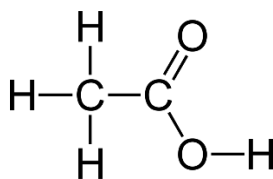
Chloroform je bezbarvá, nehořlavá, zato velmi těkává kapalina. Jeho využití nekončí pouze v chemickém průmyslu, kde funguje jako rozpouštědlo, používá se například ve farmaceutickém průmyslu nebo při výběru nátěrových hmot. Chloroform byl dodán společností Penta s.r.o. Praha.



Obr. 17 Chloroform. Převzato z (Cornell Bio/Chem Wiki, 2015).

## Kyselina octová

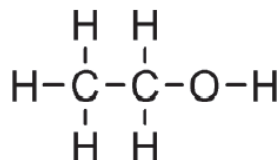
Kyselina octová je jednoduchá jednosytná karboxylová kyselina, která je za normálních podmínek bezbarvá, hořlavá a je charakterizovaná štiplavým zápachem. Je mísitelná, jak s polárními, tak i nepolárními tekutinami. Je používána jako rozpouštědlový systém pro syntézu chemikálií. Pro experiment byla použita kyselina octová o čistotě 99,0 % od společnosti Penta s.r.o. Praha.



Obr. 18 Kyselina octová. Převzato z (Schejbalová, Stibor, 2004).

## Etylalkohol

Etylalkohol nebo také etanol, je bezbarvá, vysoce hořlavá kapalina, jejíž zápach je lihového charakteru. Etanol se používá při výrobě organických sloučenin a také funguje jako rozpouštědlo. Má dobrou mísitelnost s polárními rozpouštědly, jako je například voda. V experimentu byl použit absolutní etylalkohol o čistotě 99,8 % od společnosti Penta s.r.o. Praha.



Obr. 19 Ethylalkohol převzato z (Andronov, 2015)

### **9.3 Fluorescenční barviva**

#### **Rhodamin – B**

Rhodamin – B je za normálních podmínek tmavě zelený prášek. Po přidání do kapaliny obarví látku na výrazně růžovou barvu. To vše v závislosti na koncentraci. Ideální vlnové délky pro měření se pohybují okolo 550 nm. Dodavatelem Rhodaminu – B je společnost Sigma-Aldrich.

#### **Fluorescein isothiocyanat (FITC)**

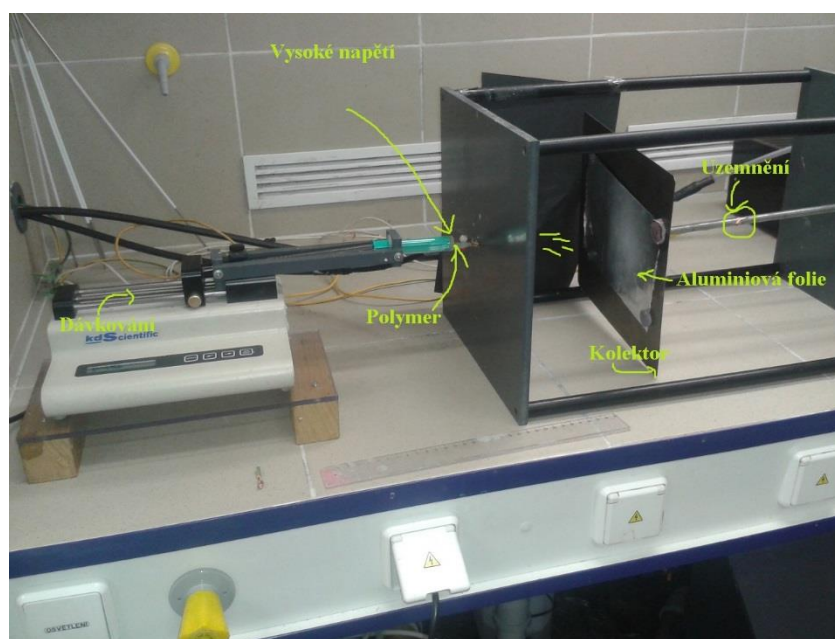
FITC je rovněž fluorescenční barvivo, ve formě žlutého prášku. Svou charakteristickou barvu si ponechává i po smíchání s kapalinou a látkami v ní. Nejlépe dochází k excitaci při vlnové délce 490 nm, a měření fluorescence probíhá při 525 nm. Fitc byl dodán společností Biotium.

## 10. Použité přístroje a laboratorní zařízení

V této části budou popsány zařízení použité k elektrostatickému rozprašování a zvlákňování, a analytické nástroje pro analýzu částic a vláken.

### 10.1 Zařízení pro elektrostatické rozprašování z jehly

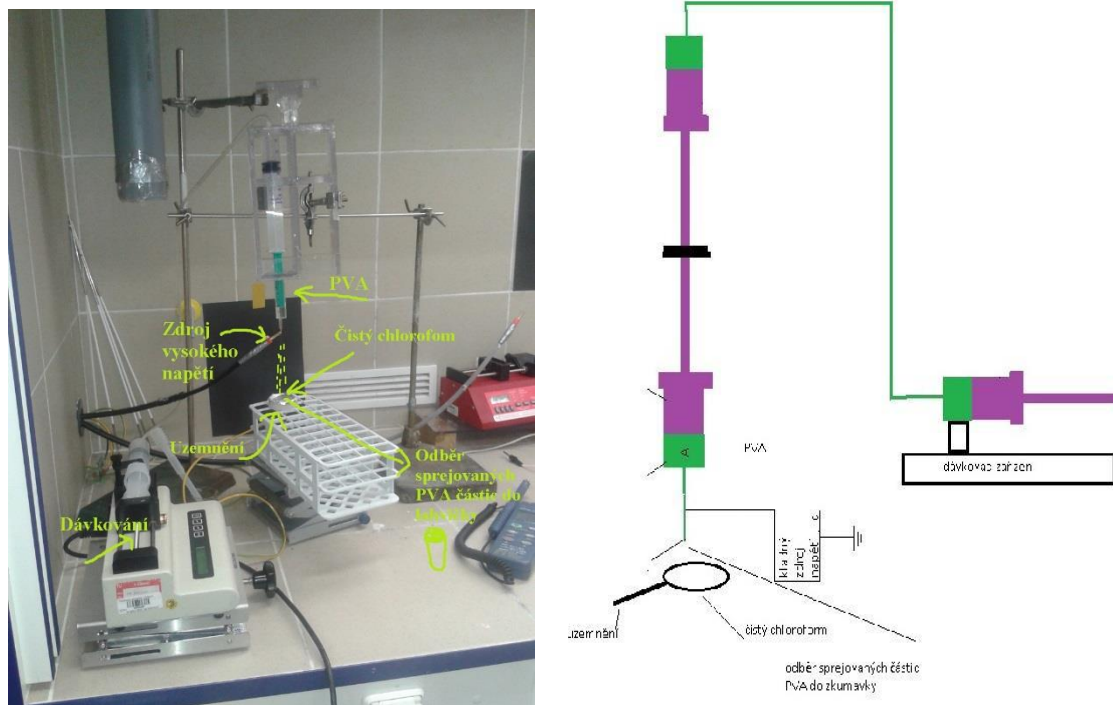
Na obrázku (22), je znázorněné zařízení použité pro elektrostatické rozprašování z jehly, jež může být použito i pro elektrostatické zvlákňování, které je složeno z dávkovací pumpy, do které je vložena injekční stříkačka s polymerním roztokem. Na pumpě KDS 100 od firmy Spellman, je možné si navolit podle potřeby vhodné dávkování a objem stříkačky, ve které je umístěn námi připravený polymerní roztok.



Obr. 20 Aparatura pro elektrostatické zvlákňování z injekční stříkačky

Na kovovém hrotu injekční stříkačky je přiveden kladný zdroj stejnosměrného vysoké napětí typu SL 150 od společnosti Spellman (New York, USA). Je důležité umístit jehlu v otvoru konstrukce pro její stabilizaci. Vzdálenost kolektoru a injekční jehly bylo možné také nastavovat dle potřeby. Na kolektor, který musel být uzemněný, se pomocí magnetů zachytil podkladový materiál, na něž se usazovaly elektrostatickým rozprašováním/zvlákňováním vyrobené částice. V mém případě byla použita aluminiová folie a laboratorní sklíčko.

## 10.2 Zařízení pro elektrostatické rozprašování na volnou hladinu

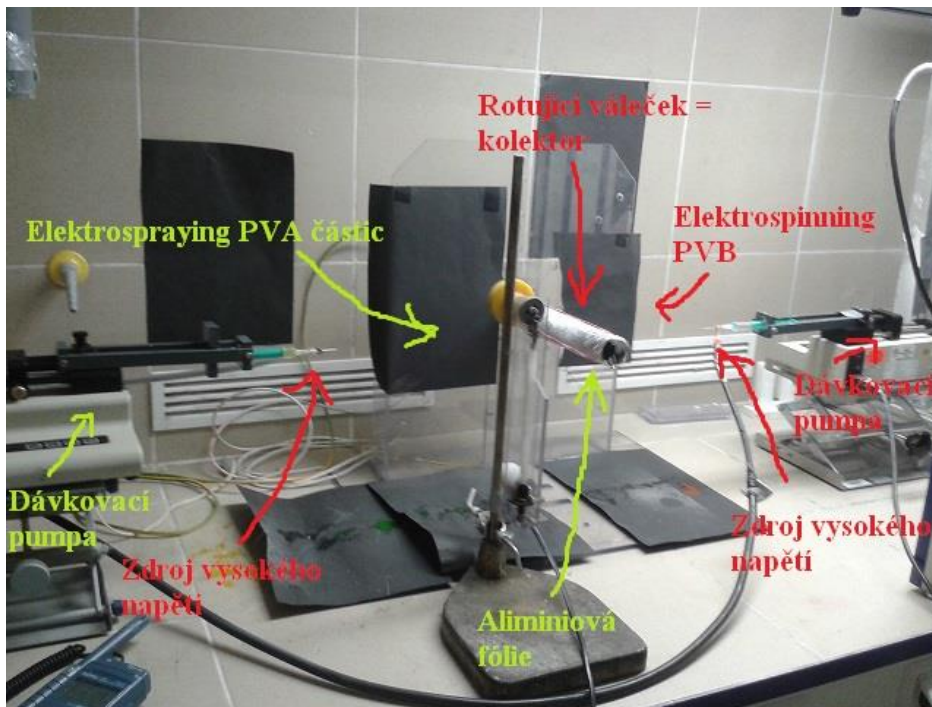


Obr. 21 Aparatura pro elektrostatické rozprašování na volnou hladinu její schéma

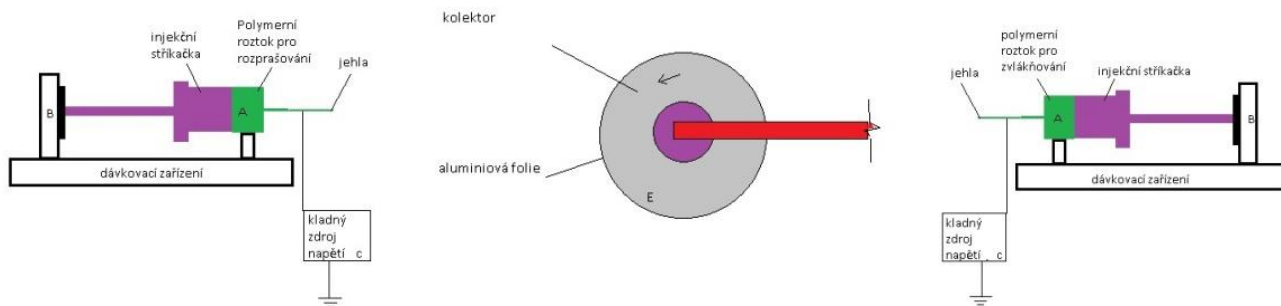
Injekční stříkačka s PVA částicemi je umístěna v plastové konstrukci, tak aby jehla byla ve vertikální poloze směrem k uzemněnému kolektoru, který je opatřen aluminiovou fólií, na kterou jsou rozprašovány PVA částice. Na konci kovové části injekční stříkačky je přiveden zdroj vysokého napětí typu SL 150 od společnosti Spellman. Na dávkovací pumpě KDS 100 od společnosti KD Scientific, Holliston (MA, USA), je nastaveno požadované dávkování. Postupně odebíráme PVA částice, jež na kolektoru vytváří jakýsi film, po odebrání PVA částic opět doplníme chloroform a proces opakujeme.



### 10.3 Zařízení pro kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu



Obr. 22 Aparatura pro kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu



Obr. 23 Schéma zařízení pro kombinaci elektrostatičkého zvlákňování a rozprašování

Zařízení pro kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu se skládá z uzemněného rotujícího válečku, který je opatřen aluminiovou fólií, na kterou se zachytávají částice a zvlákňovaná nanovlákna. Na levé straně je umístěna dávkovací pumpa, ve které je vložena injekční stříkačka s PVA částicemi. Na kovový hrot injekční stříkačky je přiveden zdroj vysokého napětí. Na levé straně tedy dochází k elektrosprayingu PVA částic. Na pravé straně je vše stejné, jen s tím rozdílem, že injekční stříkačka obsahuje PVB a dochází k elektrospinningu.

Dávkovací pumpy jsou KDS 100 od firmy KD Scientific, Holliston (MA, USA).

Zdroje vysokého napětí: první typ (typ SL 150) vyrobený společností Spellman (New York, USA) a druhý typ (typ ER50P6) je od společnosti Glassman High Voltage Inc.

## 10.4 Analytické nástroje

**Rastrovací elektronový mikroskop** - skenovací elektronový mikroskop VEGA 3 SB od společnosti TESCAN Brno, byl použit pro analýzu částic a vláken. Vzorky byly nejprve pokryty vodivou vrstvou kovu 7 mm.

**Fluorescenční mikroskop** - inverzní mikroskop Eclipse Ti-E od společnosti Nikon (Japonsko), je vybaven fluorescenčním osvětlením s filtry. Používá se k analýze vzorků, kdy díky schopnosti ozáření vzorků do hloubky potřebné k vybuzení molekul fluorescenční látky, poté dojde k vrácení do původní energetické hladiny, přičemž dojde současně k vyzaření fotonů světla.

**NIS – Elements obrazový analyzátor** - v tomto programu obrazové analýzy byly následně zpracovány veškeré vzorky vytvořené na skenovacím elektronovém mikroskopu. Pomocí NIS – Elements byly měřeny preparáty, především průměr částic.

**Spektrometr** – pro měření absorbance byl použit **UV VIS Spektrometr GBC Cintra 202**. Jedná se o plně automatický skenující spektrometr ovládaný prostřednictvím externího počítače pomocí software Cintral s operačním systémem Windows 7. Tento spektrometr má rozšířený spektrální rozsah do 1200 nm.

## 11. Popis experimentu

Cílem experimentální části bylo studium vlivu molekulové hmotnosti, případně poměru jednotlivých složek kopolymeru PLGA na degradaci a tvar částic, a následná inkorporace aktivních látek do roztoků PLGA a sledování kinetiky uvolňování.

### 11.1 Koncentrační řady

K experimentální části jsem měla k dispozici čtyři různé poměry kopolymeru PLGA od společnosti Polysciotech.

- PLGA 75:25 (AP 61) s  $M_n = 35\,000 - 45\,000$  Da
- PLGA 85:15 (AP 24) s  $M_n = 30\,000 - 45\,000$  Da
- PLGA 60:40 (AP 76) s  $M_n = 35\,000 - 45\,000$  Da
- PLGA 50:50 (AP 39) s  $M_n = 50\,000$  Da

S těmito poměry kopolymeru jsem si připravila koncentrační řady pro 2, 5, 10, 15, 20 a 25 hm. %, pomocí dvou typů rozpouštědlových systémů. A postupně jsme je blíže specifikovali dalšími koncentračními řadami a to pro 4, 7, 16 a 18 hm. %. Jedním typem byl čistý chloroform, který by měl být ideální pro tvorbu sférických částic, a druhým rozpouštědlovým systémem byl chloroform/kyselina octová/etylalkohol v poměru 8:1:1 (CHEKO), který by měl být vhodný pro tvorbu jemných vláken.

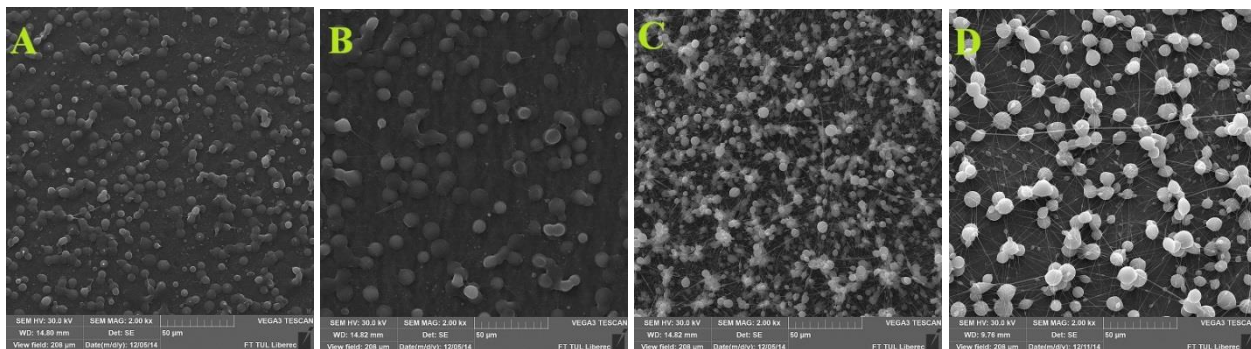
U obou typů rozpouštědlových systémů jsem připravovala 2g daného roztoku, který byl společně s injekční stříkačkou upevněn do dávkovací pumpy, kde jsem nastavila žádanou parametry dávkování a objem injekční stříkačky. Po přivedení kladného zdroje vysokého napětí a připevnění aluminiové folie k uzemněnému kolektoru, mohl začít samotný proces elektrostatického rozprašování, jehož proces je popsán v kapitole (2). Po vyčerpání veškerého roztoku z injekční stříkačky jsem sejmula aluminiovou folii a z té si připravila vzorek, jež jsem následně zpracovala ve skenovacím elektronovém mikroskopu pro detailní analýzu vyrobených částic.

### 11.1.1 Procesní parametry elektrosprayingu

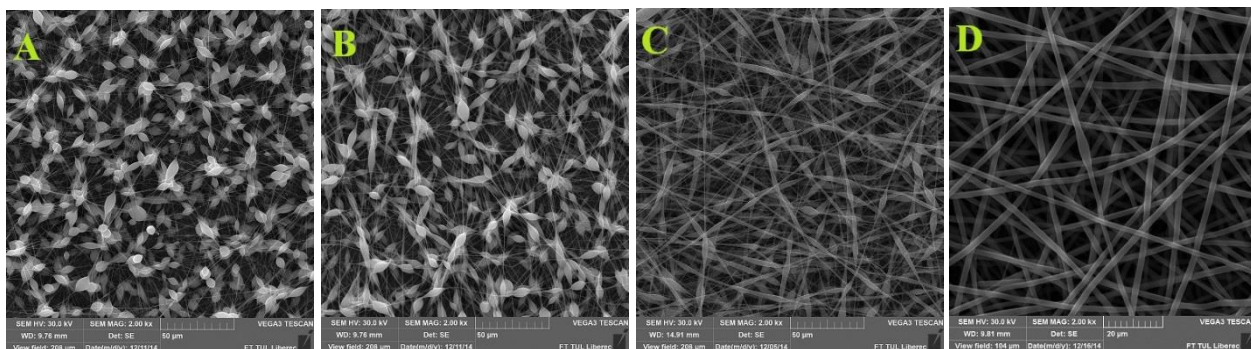
Rychlost dávkování pumpy byla nastavena na 2 ml/h pro objem 2-5 ml. Vzdálenost kolektoru od jehly se pohybovala od 17 do 30 cm, kdy větší vzdálenost byla zvolena pro dostatečné odpaření rozpouštědla. Napětí se pohybovalo v rozmezí 15 – 20 kV. Vždy bylo zapotřebí všechny tyto parametry nejprve optimalizovat vzhledem ke koncentraci roztoku a okolním podmínkám, kde hlavní roli hrála vlhkost a teplota. Relativní vlhkost se pohybovala v rozmezí 22 – 35 % a teplota byla 20 – 25 °C.

### 11.1.2 Modelová analýza vyrobených částic kopolymeru PLGA v poměru 75:25

Analýza vyrobených částic probíhala na elektronovém mikroskopu VEGA 3 SB od společnosti TESCAN Brno, poté byly vytvořené snímky, pro každou koncentraci a rozpouštědlový systém, vyhodnocovány pomocí softwaru obrazové analýzy NIS – Elements, kde jsem měřila průměry vytvořených částic.



*Obr. 24 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace PLGA v poměru 75:25 (AP 61) na tvar produktu při elektrostatičném rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla. 2 hm. % (A), 5 hm. % (B), 10 hm. % (C), 15 hm. % (D). Při zvětšení (1000x).*

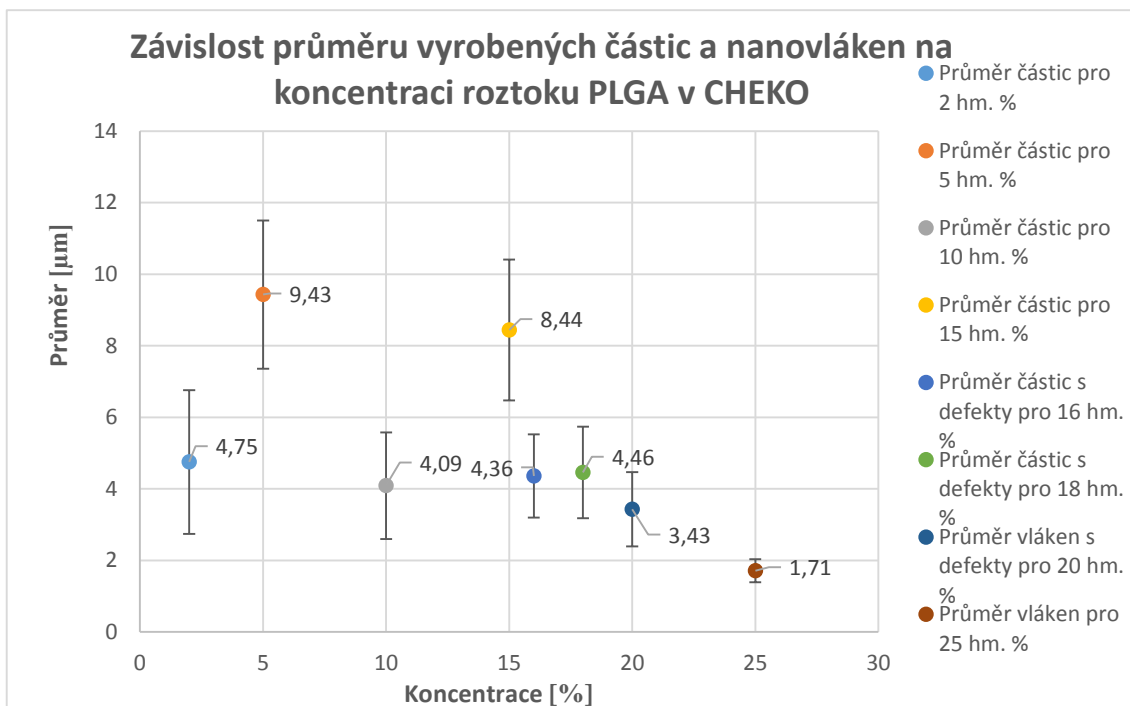


Obr. 25 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace PLGA v poměru 75:25 (AP 61) na tvar produktu při elektrostatickém rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla. 16 hm. % (A), 18 hm. % (B), 20 hm. % (C), 25 hm. % (D). Při zvětšení (1000x a 2000x).

Na obrázku (26) je vidět, že při koncentracích 2, 5, 10 a 15 hm. % docházelo k tvorbě elektrosprejovaných částic pouze s drobnými defekty, zatímco na obrázku (27) při koncentraci 16 a 18 % jsou defekty častější a více viditelné, a při 25 hm. % můžeme pozorovat vytvořená vlákna. V tabulce (2) jsou uvedeny průměry pro jednotlivé koncentrace kopolymeru PLGA v poměru 75:25 (AP 61) za použití rozpouštědlového systému CHEKO, které jsou následně vyneseny do grafu (1).

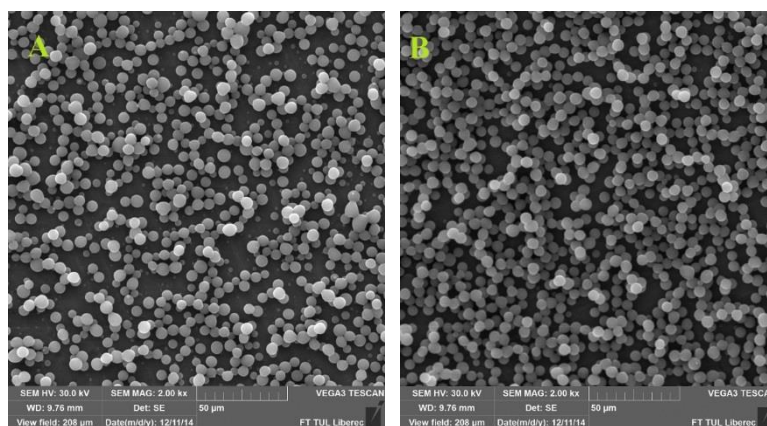
Tabulka 2.: Statistické parametry různých koncentrací vyrobených částic a nanovláken PLGA 75:25 (AP 61) při použití CHEKO jako rozpouštědla

Koncentrace [hm. %]	Aritmetický průměr [μm]	Směrodatná odchylka	Minimum [μm]	Maximum [μm]	Počet měření [-]
2	4,75	2,01	0,98	8,43	100
5	9,43	2,07	1,68	13,26	100
10	4,09	1,49	1,16	7,78	100
15	8,44	1,97	2,54	12,36	100
16	4,36	1,16	2,07	8,44	100
18	4,46	1,28	1,36	7,89	100
20	3,43	1,04	1,2	6,2	100
25	1,71	0,32	1,03	2,42	60



Graf 1: Závislost průměru vyrobených částic a nanovláken na koncentraci roztoku PLGA v poměru 75:25 (AP 61) při použití CHEKO jako rozpouštědla

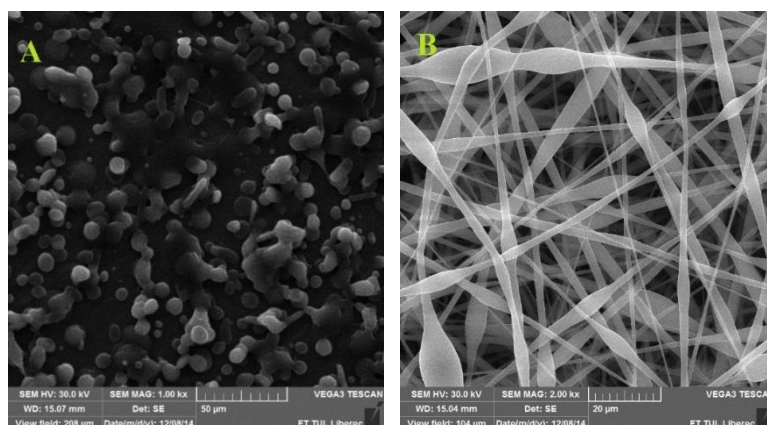
Za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla, pro stejný poměr kopolymeru PLGA, se rozvinula koncentrační řada o 4 a 7 hm. %, kde se právě tyto dvě koncentrace zdají být nevhodnější pro tvorbu elektrosprejovaných částic, jak je možné vidět na obrázku (28) a rovněž i z tabulky (3), která signalizuje poměrně malou odchylku průměru vyrobených částic, jejichž velikost je poměrně konstantní s průměrem přibližně 5 µm.



Obr. 26 Snímky z elektronového mikroskopu. Závislost koncentrace PLGA v poměru 75:25 (AP 61) na tvar produktu při elektrostatičném rozprašování za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla. 4 hm. % (A), 7 hm. % (B). Při zvětšení (1000x).



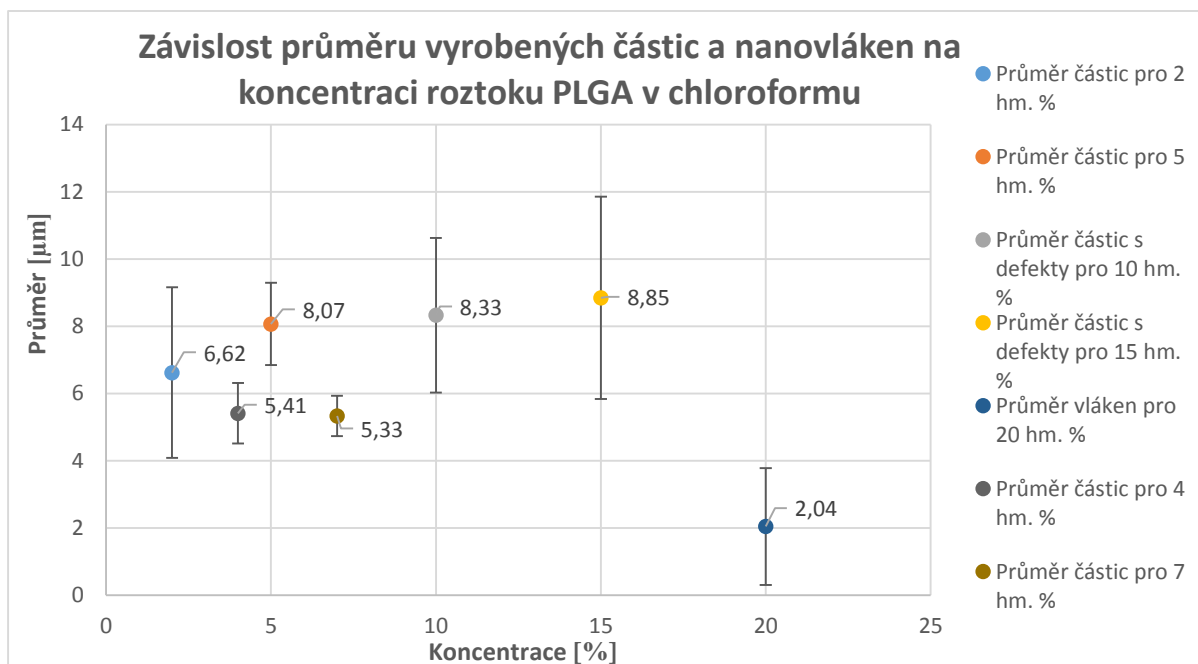
Na následujícím obrázku (29) můžeme porovnat snímky z elektronového mikroskopu pro dvě mezní koncentrace za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla. Jedná se o 2 % a 20 % roztok polymeru AP 61 v poměru 75:25, kde je možné vidět, že při nízkých koncentracích docházelo ke slévání, a při vysokých k tvorbě vláken, která by se dala použít pro přípravu scaffoldů. Z tohoto důvodu jsme pro další 3 poměry kopolymeru PLGA (tedy pro 85:15; 60:40; 50:50), vytvářeli již námi vybrané koncentrace. Pro rozpouštědlový systém CHEKO jsme vždy připravili 2, 5 a 20 hm. % a pro čistý chloroform 4 a 7 hm. %.



*Obr. 27 Snímky z elektronového mikroskopu, mezních koncentrací pro kopolymer PLGA v poměru 75:25 (AP 61) při elektrostatickém rozprašování za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla. 2 hm. % (A), 20 hm. % (B). Při zvětšení (1000x a 3000x).*

*Tabulka 3: Statistické parametry různých koncentrací vyrobených částic a nanovláken PLGA 75:25 (AP 61) při použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.*

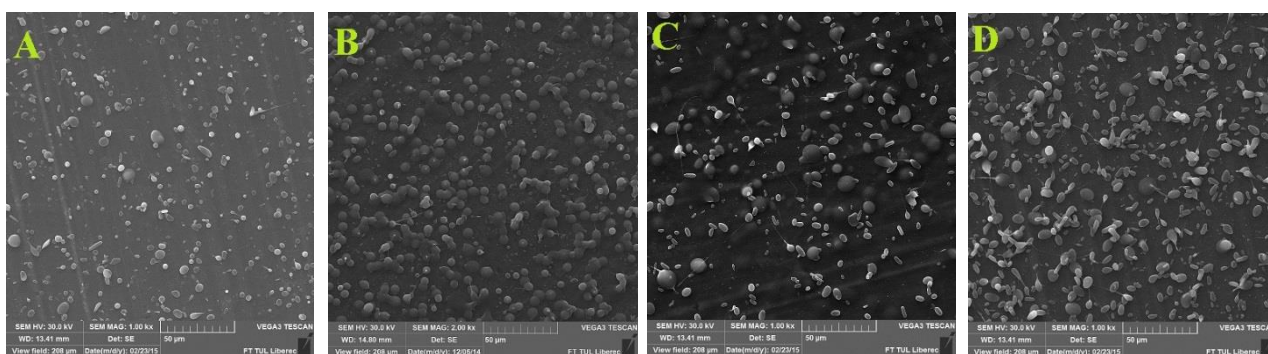
Koncentrace [hm. %]	Aritmetický průměr [μm]	Směrodatná odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]	Počet měření [-]
2	6,62	2,54	2,09	16,3	100
4	5,41	0,9	2,96	7,61	150
5	8,07	1,22	5,74	12,18	80
7	5,33	0,6	3,1	6,74	150
10	8,33	2,3	1,47	11,86	50
15	8,85	3,01	1,8	23,5	55
20	2,04	1,74	0,52	10,17	50



Graf 2: Závislost průměru vyrobených částic a nanovláken na koncentraci roztoku PLGA v poměru 72:25 (AP 61) při použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.

### 11.1.3 Analýza vyrobených PLGA částic pro poměry 75:25; 60:40; 85:15; 50:50

Následuje tedy sada snímků z elektronového mikroskopu různých poměrů kopolymeru PLGA pro porovnání vybraných koncentrací, jež jsou doplněny tabulkami a grafy s průměry vyrobených částic a nanovláken.



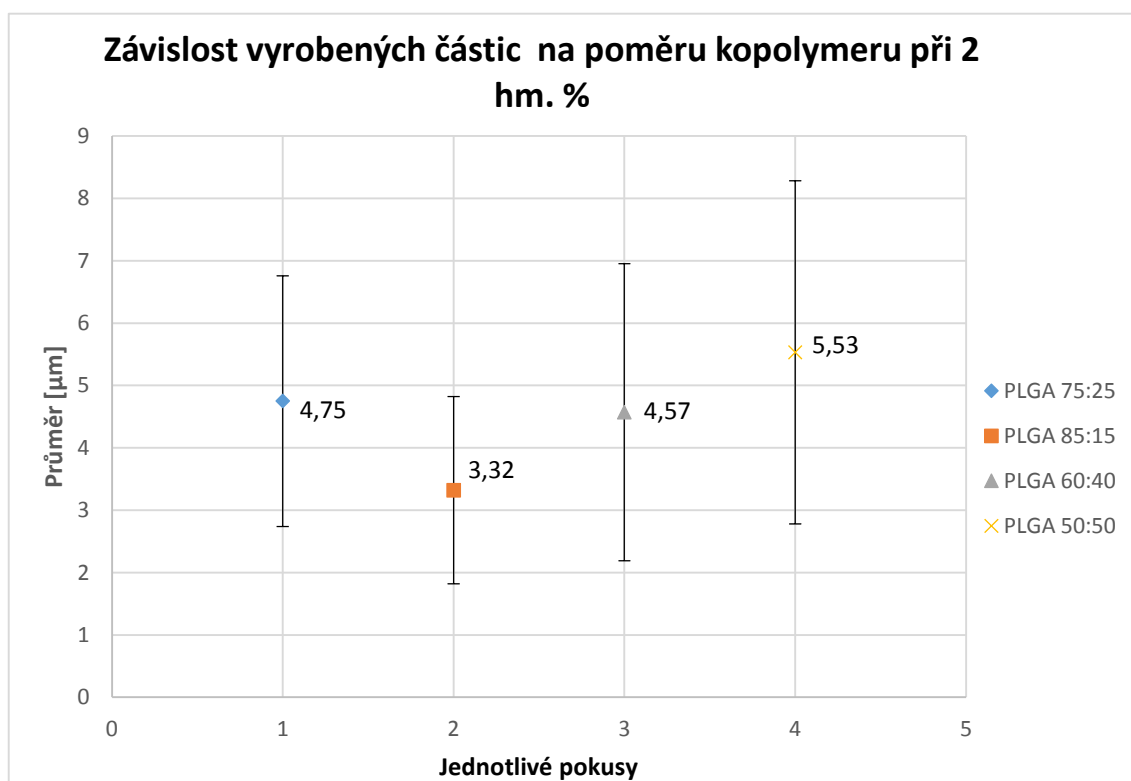
Obr. 28 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla pro 2 hm. % PLGA v poměrech 85:15 (A), 75:25 (B), 60:40 (C), 50:50 (D). Při zvětšení (1000x).



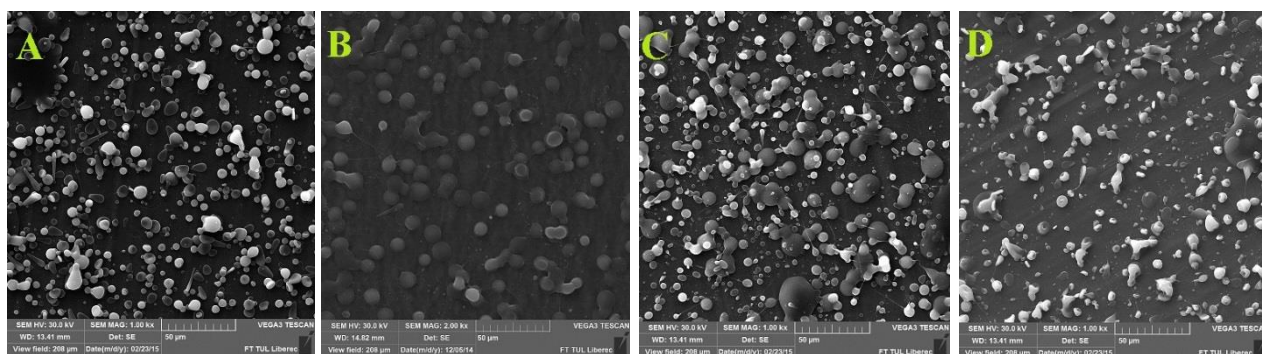
Tabulka 4. : Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 2 hm. %, za použití CHEKO jako rozpouštědla.

Poměr ko-polymeru	Koncentrace [hm. %]	Aritmetický průměr [μm]	Směrodatná odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]	Počet měření [-]
72:25	2	4,75	2,01	0,98	8,43	100
85:15	2	3,32	1,5	1,29	8,81	100
60:40	2	4,57	2,38	1,25	12,34	100
50:50	2	5,53	2,75	1,08	11,58	100

Ze snímků z elektronového mikroskopu a z tabulky je vidět, že při 2 hm. % se průměry částic pohybovaly v rozmezí 3 - 5,5 μm pro všechny poměry kopolymeru, ojediněle docházelo ke slévání částic.



Graf 3: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA pro 2 hm. % při použití CHEKO jako rozpouštědla.

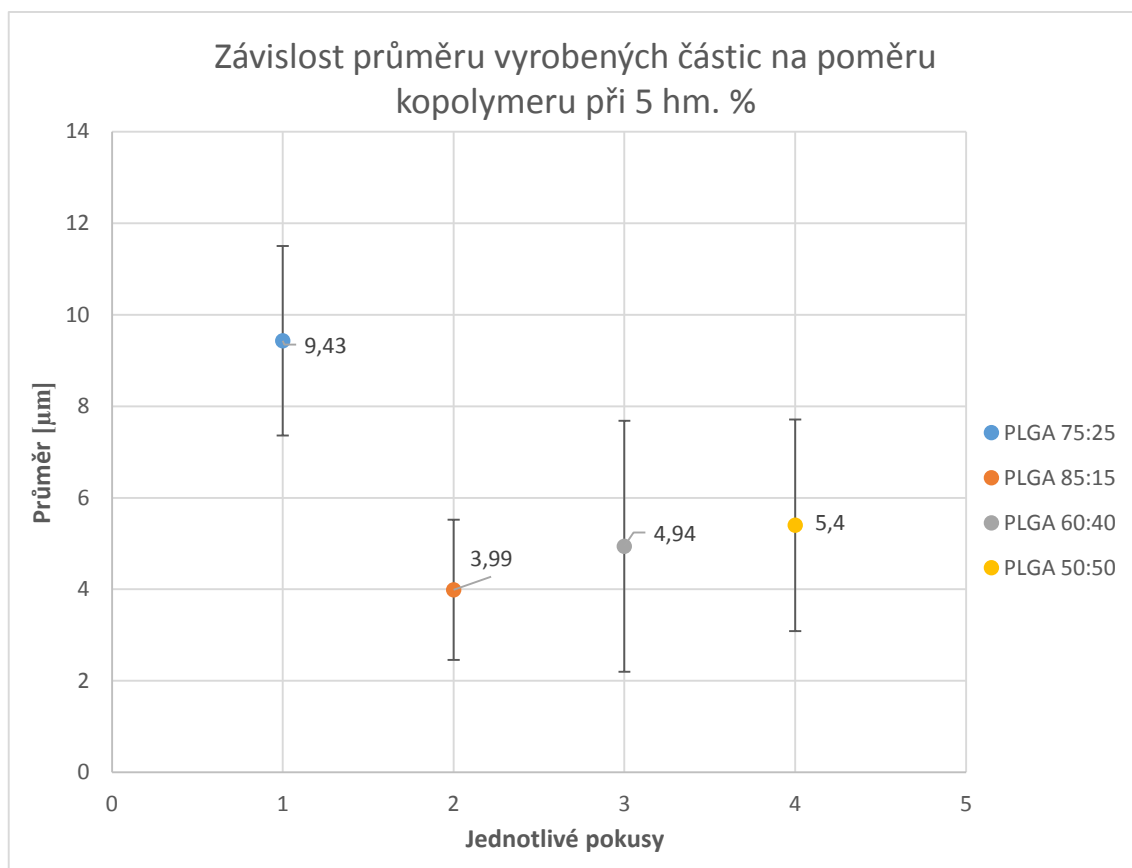


Obr. 29 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití CHEKO jako rozpouštědla pro 5 hm. % PLGA v poměrech 85:15 (A), 75:25 (B), 60:40 (C), 50:50 (D). Při zvětšení (1000x).

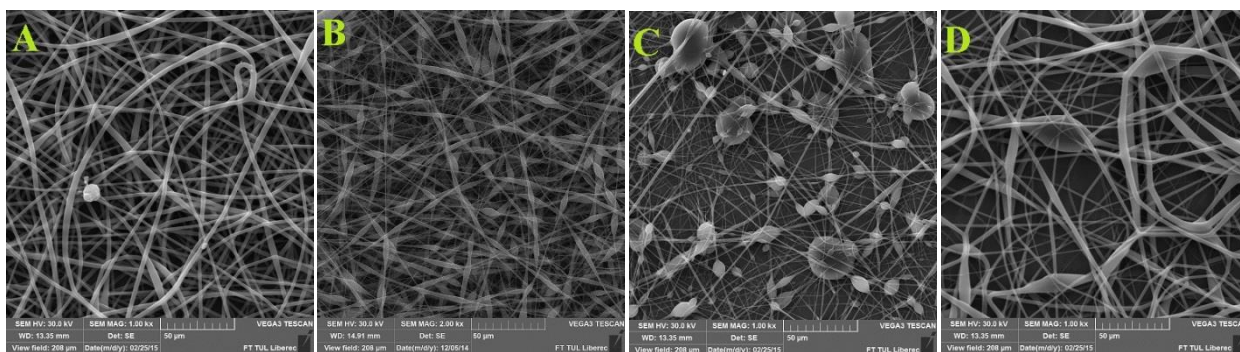
Tabulka 5: Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 5 hm. %, za použití CHEKO jako rozpouštědla.

Poměr kopolymeru	Koncentrace [hm. %]	Aritmetický průměr [µm]	Směrodatná odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]	Počet měření [-]
75:25	5	9,43	2,07	1,68	13,26	100
85:15	5	3,99	1,53	0,64	9,74	100
60:40	5	4,94	2,74	1,54	15,69	100
50:50	5	5,4	2,31	0,85	12,23	100

Při 5 hm. % se průměr částic u většiny poměrů pohyboval v rozmezí 3- 5,4 µm, s výjimkou poměru 75:25 kdy byl průměr s 9 µm jednou tak vyšší.



*Graf 4: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA při 5 hm. % za použití CHEKO jako rozpouštědla.*

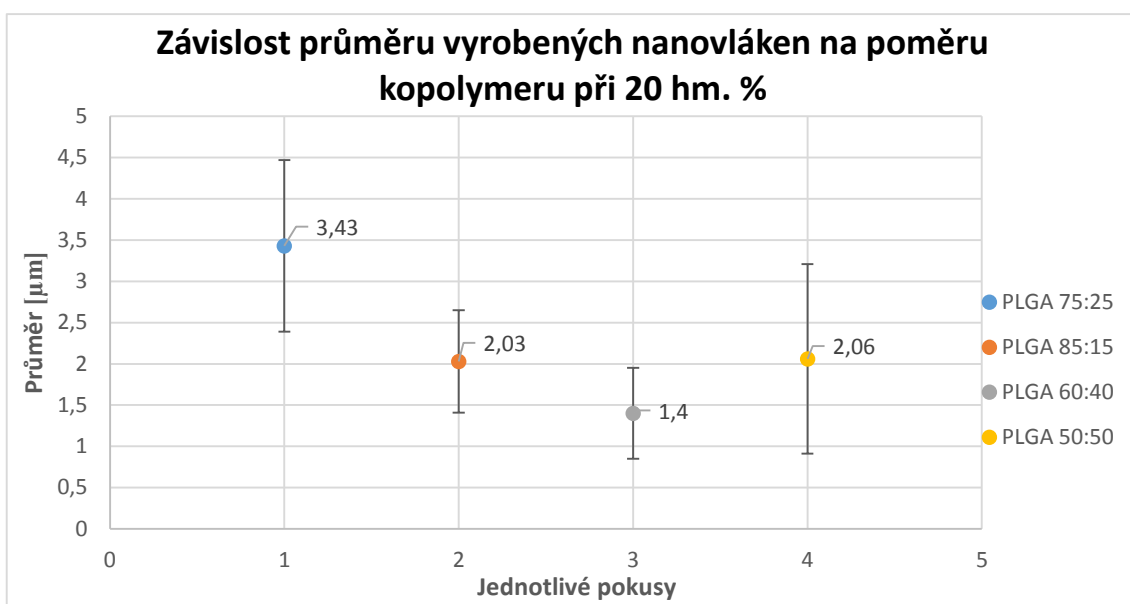


Obr. 30 Snímky z elektronového mikroskopu za použití CHEKO jako rozpouštědla pro 20 hm. % PLGA v poměrech 85:15 (A), 75:25 (B), 60:40 (C), 50:50 (D). Při zvětšení (1000x).

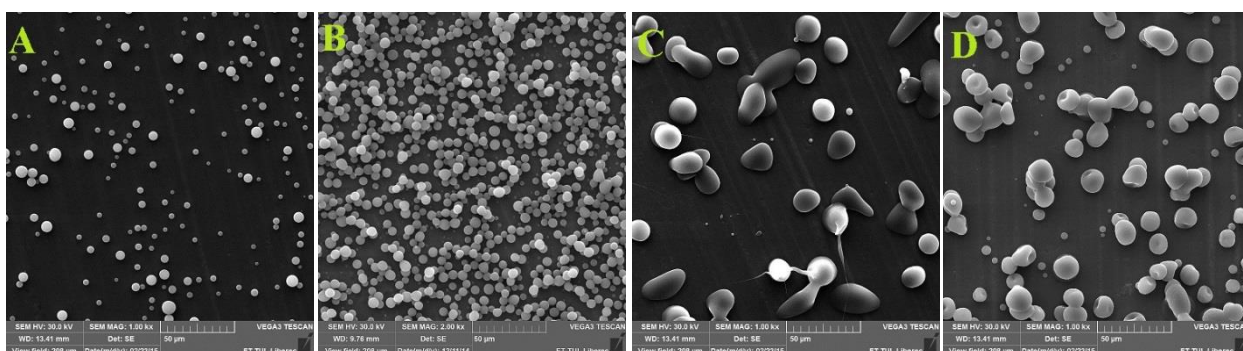
Tabulka 6: Statistické parametry pro různé poměry kopolymeru PLGA při 20 hm. %, za použití CHEKO jako rozpouštědla.

Poměr kopolymeru	Koncentrace [hm. %]	Aritmetický průměr [ $\mu\text{m}$ ]	Směrodatná odchylka [ $\mu\text{m}$ ]	Minimum [ $\mu\text{m}$ ]	Maximum [ $\mu\text{m}$ ]	Počet měření [-]
75:25	20	3,43	1,04	1,2	6,2	100
85:15	20	2,03	0,62	1,14	4,18	100
60:40	20	1,4	0,55	0,54	4,1	100
50:50	20	2,06	1,15	0,68	7,85	100

Při 20 hm. % téměř u všech poměrů kopolymeru docházelo ke vzniku vláken s průměrem v rozmezí 2-3,5  $\mu\text{m}$ , pouze u poměru 60:40 byly defekty značnější.



*Graf 5: Závislost průměru vyrobených nanovláken na poměru kopolymeru PLGA při 20 hm. % za použití CHEKO jako rozpouštědla.*

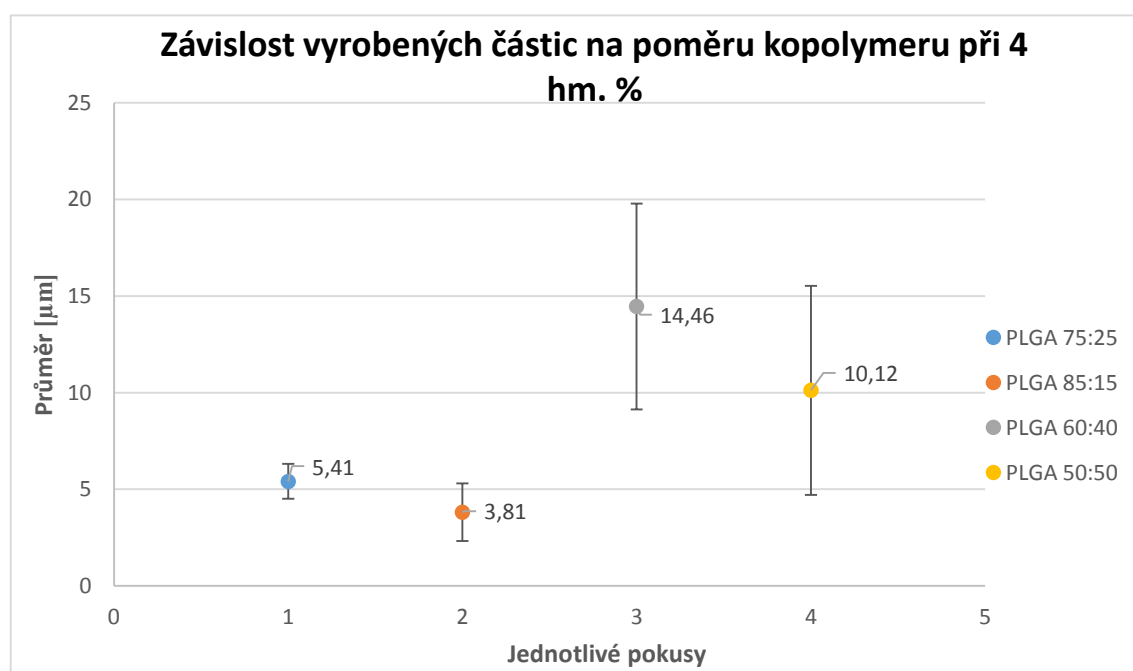


*Obr. 31 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití chloroformu jako rozpouštědla pro 4 hm. % PLGA v poměrech 85:15 (A), 75:25 (B), 60:40 (C), 50:50 (D). Při zvětšení (1000x).*

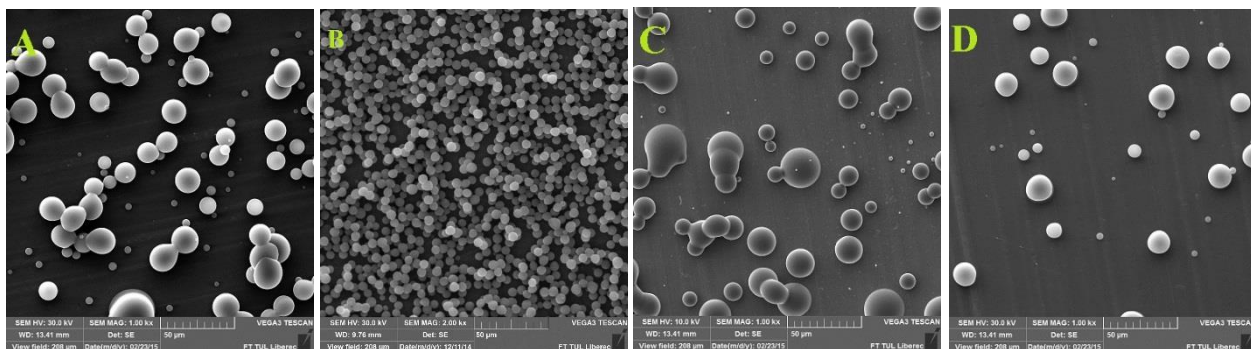
Tabulka 7: Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 4 hm. %, za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.

Poměr ko-polymeru	Koncentrace [hm. %]	Aritmetický průměr [μm]	Směrodatná odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]	Počet měření [-]
75:25	4	5,41	0,9	2,96	7,61	150
85:15	4	3,81	1,49	1,49	8,63	100
60:40	4	14,46	5,32	1,32	27,16	100
50:50	4	10,12	5,41	1,11	22,2	100

Při 4 hm. % docházelo ke vzniku částic, kdy pro poměr 85:15 docházelo ke vzniku homogenních částic s průměrem 3,81 μm. Pro poměry 60:40 a 50:50 se průměry značně liší, pohybují se až na hranici 15 μm.



Graf 6: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA při 4 hm. % za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.

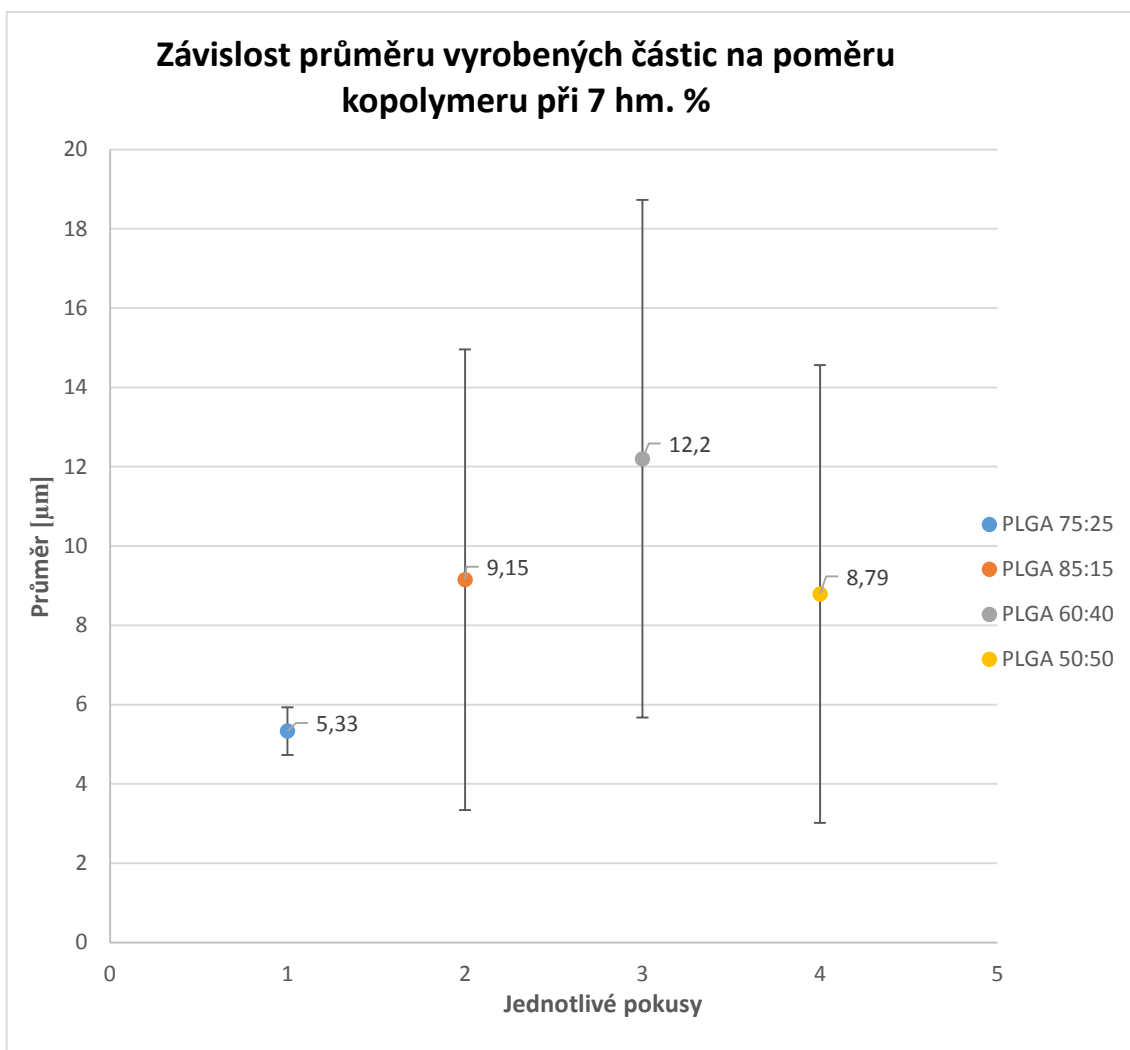


Obr. 32 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování za použití chloroformu jako rozpouštědla pro 7 hm. % PLGA v poměrech 85:15 (A), 75:25(B), 60:40 (C), 50:50 (D). Při zvětšení (1000x).

Tabulka 8: Statistické parametry vyrobených částic pro různé poměry kopolymeru PLGA při 7 hm. %, za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.

Poměr ko-polymeru	Koncentrace [hm. %]	Aritmetický průměr [µm]	Směrodatná odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]	Počet měření [-]
72:25	7	5,33	0,6	3,1	6,74	150
85:15	7	9,15	5,81	1,24	21,39	100
60:40	7	12,2	6,53	1,57	28,07	100
50:50	7	8,79	5,77	1,4	17,77	100

Pro 7 hm. % docházelo ke vzniku částic, poměr 85:15 vykazuje téměř homogenní částice s průměrem 9 µm, nejmenších průměrů pohybujících se okolo 5 µm dosahují částice poměru 75:25.

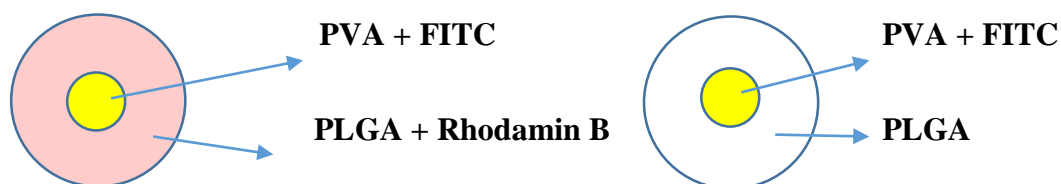


*Graf 7: Závislost průměru vyrobených částic na poměru kopolymeru PLGA při 7 hm. % za použití čistého chloroformu jako rozpouštědla.*



## 11.2 Inkorporace aktivních látek

V další části experimentu jsme se zabývali inkorporací aktivních látek do roztoků PLGA. Kde byla snaha vytvořit „kapsle v kapsli“, abychom ubránili aktivní látku před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. K tomu jsme využili PVA, jako vnitřní kapsli a PLGA jako vnější kapsli, jak je znázorněno na následujícím obrázku (33).



Obr. 33 Schéma pro kapsle v kapsli.

### 11.2.1 Popis experimentu

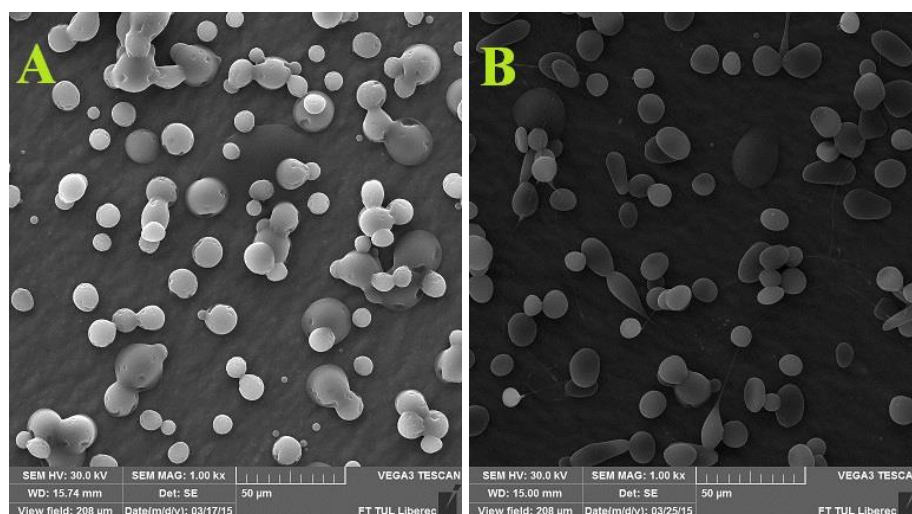
Použili jsme novou metodu, při které byly PVA částice sprejovány na volnou hladinu, jak je znázorněno na obrázku (21). PVA částice byly smíchány s fluorescenčním barvivem FITC a společně s injekční stříkačkou upevněny v horní části aparatury tak, aby jehla byla ve vertikální poloze vzhledem ke kolektoru. Kolektor byl opět uzemněn a opatřen aluminiovou fólií, která ještě obsahovala jisté množství chloroformu, které se vždy po vyčerpání muselo doplnit. Samotný proces elektrosprayingu obarvených PVA částic musel být vždy zastaven, pro odebrání částic PVA z kolektoru, které byly po nasátí injekční stříkačkou uschovány do připravené lahvičky. Tento postup byl opakován, až do získání potřebného množství PVA částic, jež byly následně smíchány s vybraným typem polymeru, který byl v poměru 75:25 pro 4 hm. %. Následovala metoda elektrosprayingu z jehly, kdy byl kolektor opatřen jak aluminiovou fólií, tak také podložním skličkem, pro získání snímků z fluorescenčního mikroskopu.

Tento experiment jsme prováděli dvěma způsoby, postup i princip byl stejný, jenom s tím rozdílem, že v jednom případě jsme obal, tvořený kopolymerem PLGA, obarvovali fluorescenčním barvivem Rhodamin B.

### 11.2.2 Procesní parametry

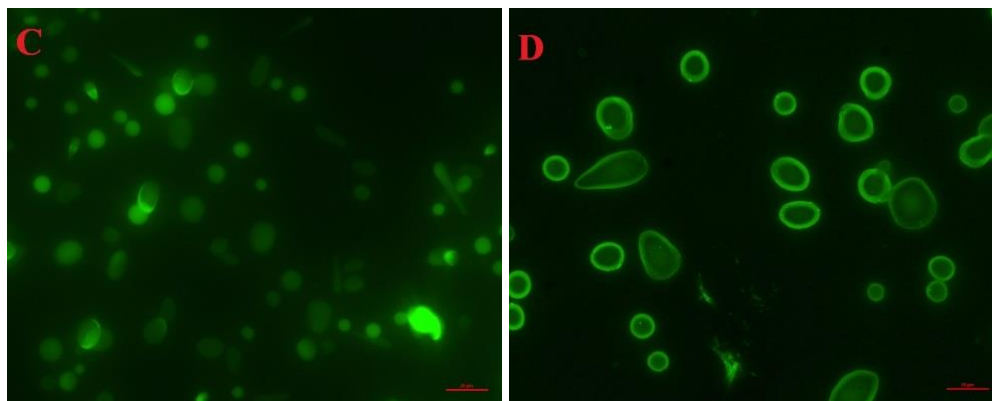
Rychlost dávkování pumpy byla 0,5 ml/h, s objemem injekční stříkačky 5 ml. Vzdálenost kolektoru od jehly 27 cm, napětí bylo od 25 do 30 kV. Těmto zmíněným parametrům opět předcházela jistá optimalizace vzhledem ke koncentraci roztoku a okolním podmínkám, kdy se relativní vlhkost pohybovala v rozmezí 26 – 35 % a teplota byla 23 °C.

### 11.2.3 Analýza vyrobených částic

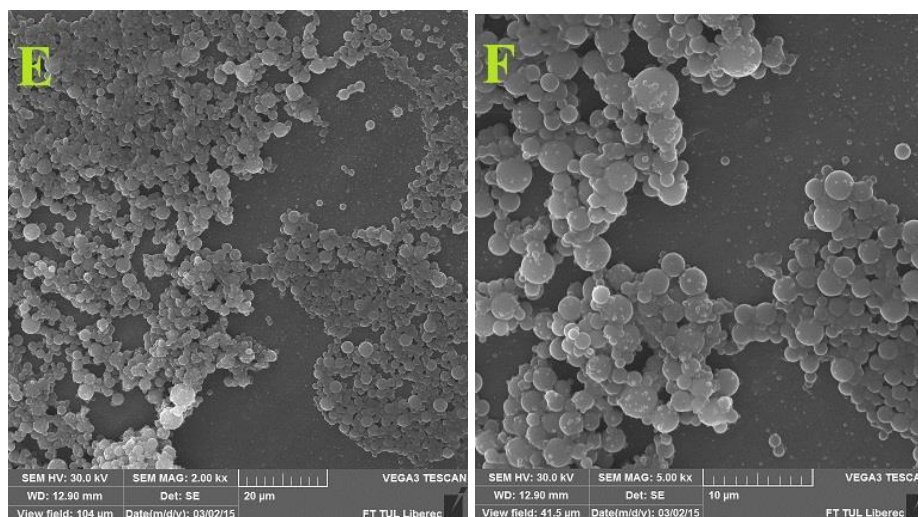


*Obr. 34 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování v kombinaci s elektrostatickým rozprašováním na volnou hladinu pro 4 hm. % PLGA v poměru 75:25 (AP 61), pro PVA částice obarvené Fitcem (A), pro PVA částice obarvené Fitcem + Rhodamin (B). Při zvětšení (1000x).*

Při elektro sprayingu na volnou hladinu v kombinaci s elektro sprayingem z injekční stříkačky byl průměr vyrobených částic 10 µm se směrodatnou odchylkou 4,01. Výsledky experimentu jsou prvotní záležitostí a do budoucna bude zapotřebí tento experiment optimalizovat.



Obr. 35 Snímky z fluorescenčního mikroskopu při elektrostatickém rozprašování v kombinaci s elektrostatickým rozprašováním na volnou hladinu pro 4 hm. % PLGA v poměru 75:25 (AP 61), pro PVA částice obarvené Fitcem (C), pro PVA částice obarvené Fitcem + Rhodamin (D). Při zvětšení (400x).



Obr. 36 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování na volnou hladinu pro 4 hm. % PLGA v poměru 75:25 (AP 61), pro PVA částice obarvené Fitcem při zvětšení 2000x (E), pro PVA částice obarvené Fitcem při zvětšení 5000x (F).

Na obrázku (36) jsou snímky z elektronového mikroskopu pro volnou hladinu, kde jsou vidět nasprejované PVA částice jejichž průměr částic se pohyboval okolo 2 µm se směrodatnou odchylkou 0,75.

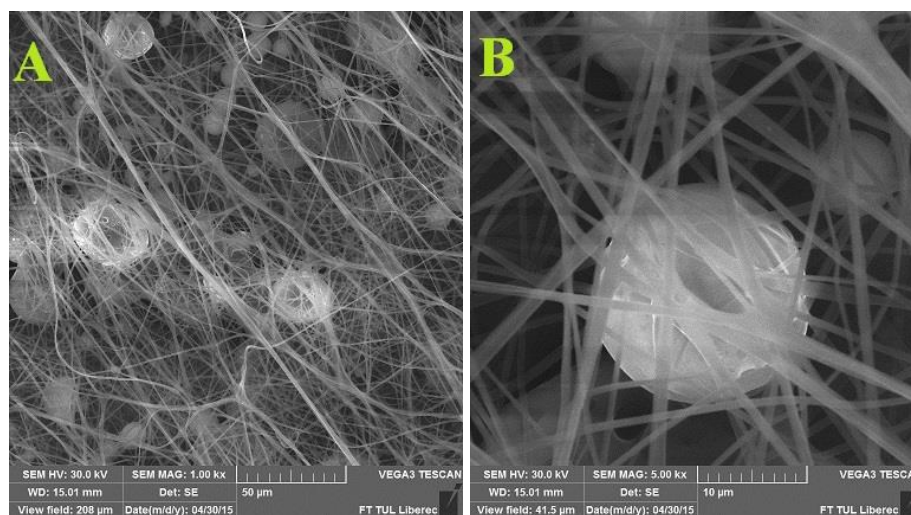
## 11.3 Kinetika uvolňování aktivních látek

Pro výrobu částic na sledování kinetiky uvolňování jsme opět použili volnou hladinu, jejíž proces je popsán v předcházející kapitole, na kterou jsme sprejovali PVA částice obarvené fluorescenčním barvivem FITC, které jsme následně smíchali s kopolymerem PLGA o poměru 85:15 (AP 24). Opět jsme pracovali s dvěma možnostmi, jednou za použití Rhodaminu B a podruhé bez Rhodaminu B. Po důkladném rozmíchání a následném působení ultrazvuku pod amplitudou 30 %, jsme zařadili kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu, která je znázorněna na obrázku (22). Z jedné strany jsme sprejovali již zmíněný roztok obarvených PVA částic s kopolymerem 85:15, a z druhé strany byl zvlákněn polyvinylbutyral (PVB).

### 11.3.1 Procesní parametry vánočního stromku

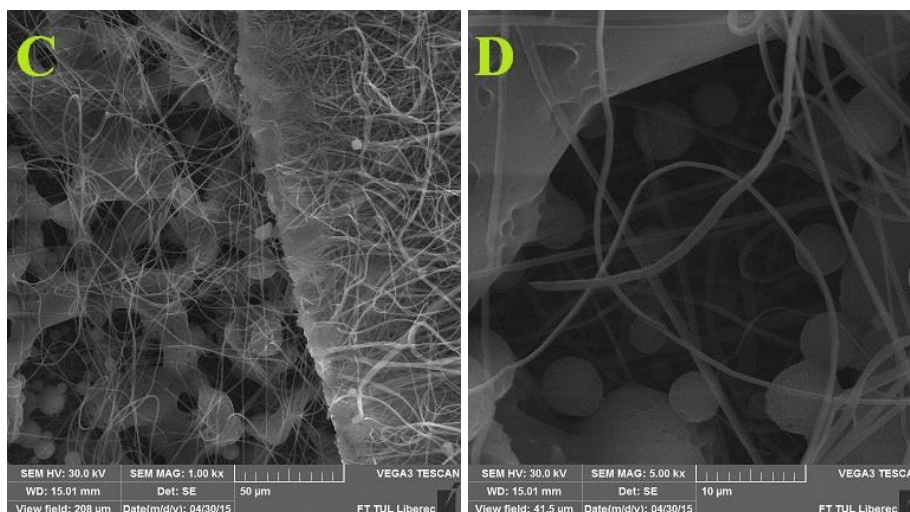
Rychlost dávkovací pumpy pro PVA částice byla 1 ml/h a pro PVB 1,5 ml/h, s objemem injekčních stříkaček 5 ml. Vzdálenost od kolektoru byla 20 cm a napětí se pohybovalo v rozmezí 18 – 20 kV. Relativní vlhkost byla 35 % s teplotou 25 °C.

### 11.3.2 Analýza vyrobených částic



Obr. 37 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování na volnou hladinu a kombinace elektrosprayingu a elektrospinningu pro 4 hm. % PLGA v poměru 85:15

(AP 24), pro PVA částice obarvené Fitcem při zvětšení 1000x (A), pro PVA částice obarvené Fitcem při zvětšení 5000x (B).



Obr. 38 Snímky z elektronového mikroskopu při elektrostatickém rozprašování na volnou hladinu a kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu pro 4 hm. % PLGA v poměru 85:15 (AP 24), pro PVA částice obarvené Fitcem + Rhodamin při zvětšení 1000x (C), pro PVA částice obarvené Fitcem + Rhodamin při zvětšení 5000x (D).

Průměr vyrobených částic při kombinaci elektrosprayingu a elektrospinningu byl přibližně 13  $\mu\text{m}$  se směrodatnou odchylkou 7,14 a průměr vyrobených vláken byl 2  $\mu\text{m}$  se směrodatnou odchylkou 0,82.

Pro takto vyrobené částice jsme zahájili kinetiku uvolňování, kterou jsme provedli dvěma způsoby. První měření probíhalo v jednom dni, kdy jsme výměnu prováděli po 60ti minutách. A druhé měření bylo rozloženo na 3 denní kinetiku, kdy výměna probíhala po 24 hodinách. Pro oba způsoby byl použit enzym Proteinasa K, a pufr 0,1 molární Tris s pH 8. Pro hodinovou kinetiku bylo použito 0,5 U Poteinasy K, pro 3 denní kinetiku bylo použito 5 U Proteinasy K.

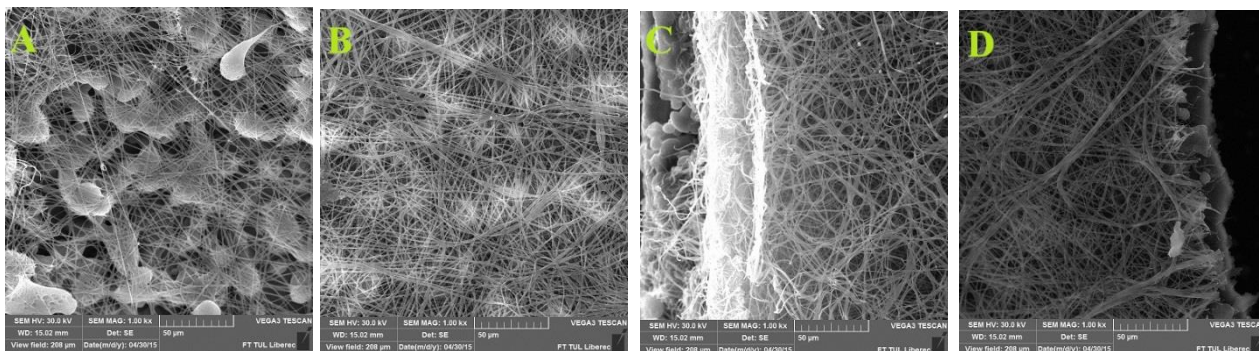


### 11.3.3 Postup měření kinetiky uvolňování

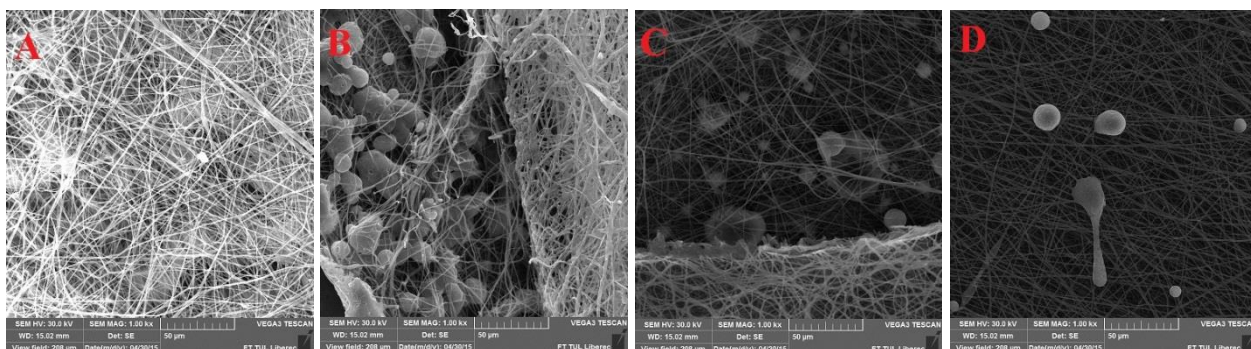
Nejprve jsme si připravili vzorky nastříháním a zvážením jejich hmotností, a poté je vložili do příslušných zkumavek. Vzorků bylo dohromady 12 a k tomu 4 negativní kontroly. Po výpočtu potřebného množství Proteinázy K a 0,1 molárního Trisu, a jejich důkladném promíchání, jsme do každé zkumavky odpipetovali 5 ml. A následně mohli začít oba typy měření kinetiky. Při každé výměně, jak pro hodinovou, tak pro 3 denní kinetiku jsme daný roztok uschovali do připravené lahvičky, kterou jsme opatřili aluminiovou fólií, aby byl obsah chráněn proti přístupu světla. Po řádném propláchnutí vzorků destilovanou vodou, aby nedocházelo k dalšímu působení Proteinázy K jsme vzorky vložili do termostatu s teplotou 37 °C.

### 11.3.4 Analýza vzorků průběhu kinetiky uvolňování

#### Hodinová kinetika uvolňování

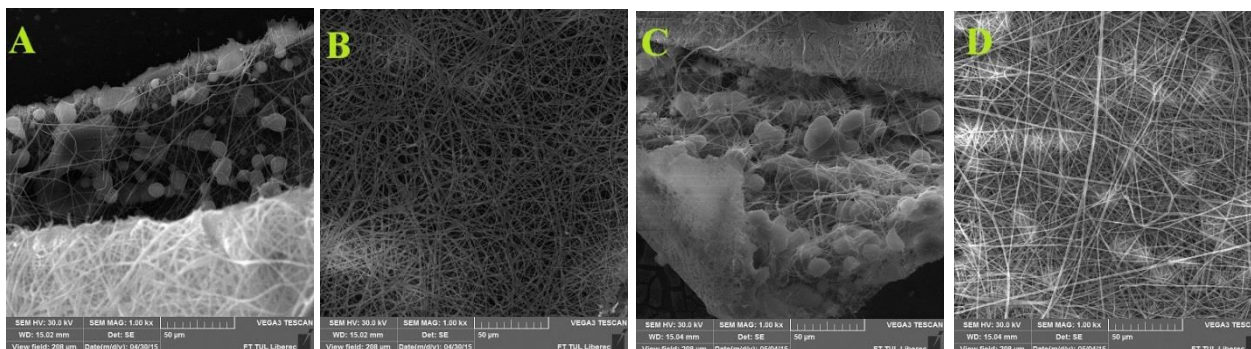


Obr. 39 Snímky z elektronového mikroskopu průběhu hodinové kinetiky uvolňování pro 4 hm. % kopolymeru PLGA v poměru 85:15 (AP 24) při obarvení PVA částic Fitcem + Rhodamin, za použití metody vánočního stromku při elektrospinningu PVB. První hodina (A), druhá hodina (B), třetí hodina (C), negativní kontrola (D). Při zvětšení 1000x.

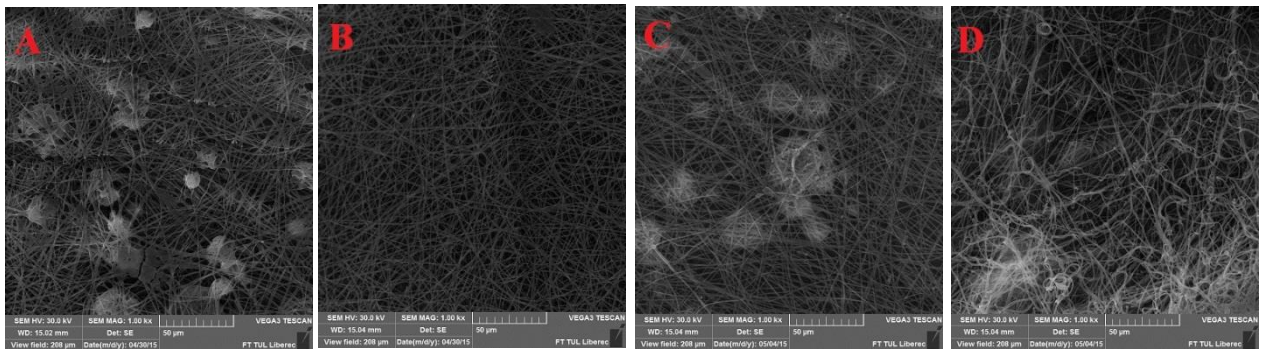


Obr. 40 Snímky z elektronového mikroskopu průběhu hodinové kinetiky uvolňování pro 4 hm. % kopolymeru PLGA v poměru 85:15 (AP 24) při obarvení částic PVA Fitcem, za použití metody vánočního stromku při elektrospinningu PVB. První hodina (A), druhá hodina (B), třetí hodina (C), negativní kontrola (D). Při zvětšení 1000x.

### Kinetika uvolňování rozložená do 3 dnů



Obr. 41 Snímky z elektronového mikroskopu 3denní kinetiky uvolňování pro 4 hm. % kopolymeru PLGA v poměru 85:15 (AP 24) při obarvení PVA částic Fitcem + Rhodamin, za použití metody vánočního stromku při elektrospinningu PVB. První den (A), druhý den (B), třetí den (C), negativní kontrola (D). Při zvětšení 1000x.



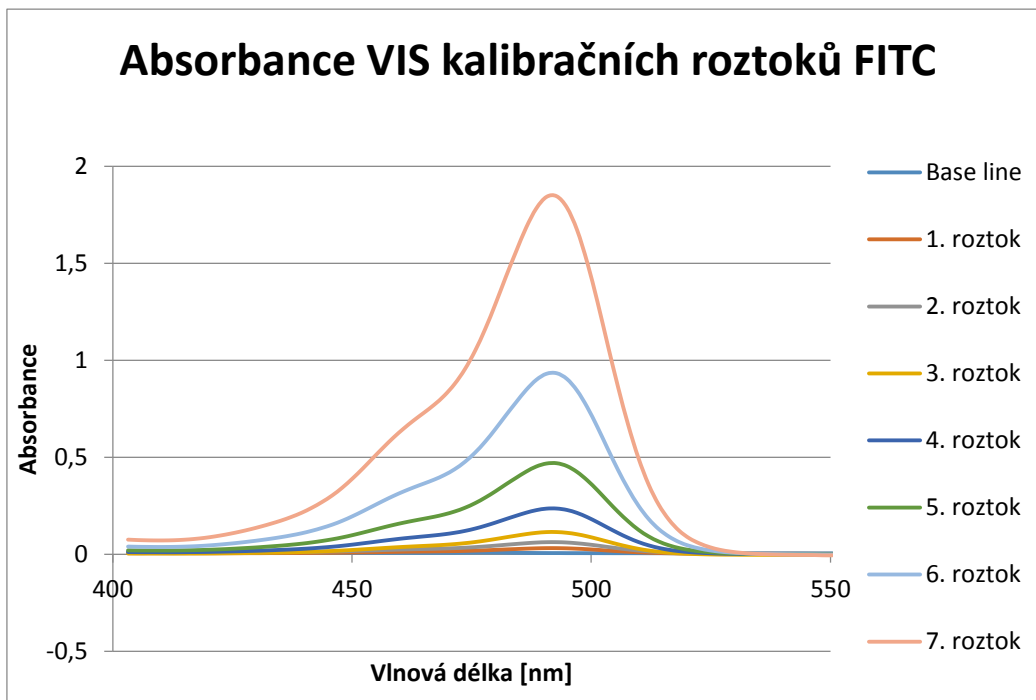
*Obr. 42 Snímky z elektronového mikroskopu 3denní kinetiky uvolňování pro 4 hm. % kopolymeru PLGA v poměru 85:15 (AP 24) při obarvení PVA částic Fitcem za použití metody vánočního stromku při elektrosponingu PVB. První den (A), druhý den (B), třetí den (C), negativní kontrola (D). Při zvětšení 1000x.*

Kinetika uvolňování je zjišťována metodou měření absorbance, která je popsána v kapitole 5.1. Nejprve jsme si připravili kalibrační křivky pro různé koncentrace fluorescenčního barviva FITC a Rhodamin B, jimiž jsme proložili absorbance námi vyrobených a změřených vzorků, které jsou znázorněny v příloze A. Došlo pouze k nepatrnému uvolnění, což bylo zapříčiněno zvolením příliš nízkých jednotek proteinázy.

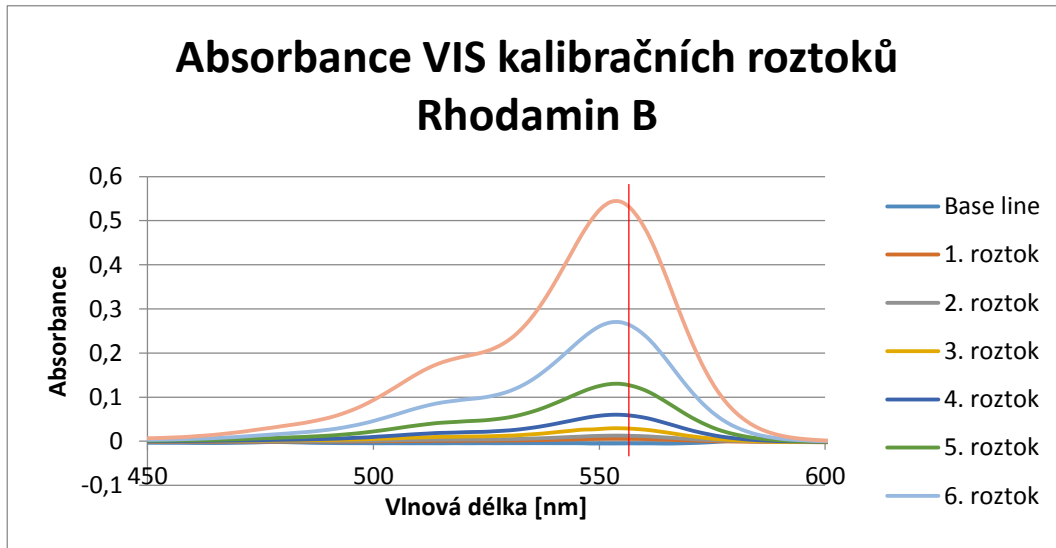
### 11.3.4 Postup měření absorbance

Na spektrometru jsme nastavili vlnovou délku 400 – 800 nm. Po stabilizaci jsme do měřící části vložili kyvetu s pufrem sloužící jako slepý vzorek. Po jeho vyjmutí jsme začali postupně vkládat námi připravené vzorky se zvyšující se množstvím fluorescenčních barviv FITC a Rhodamin B. V grafech (8) a (9) jsou znázorněny absorbance kalibračních roztoků pro FITC a Rhodamin B.





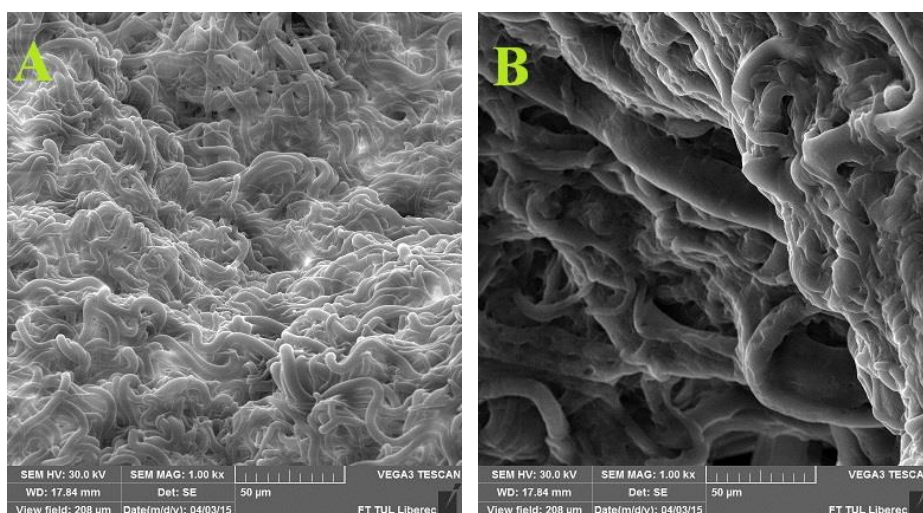
Graf 8: Absorbance VIS kalibračních roztoků FITC.



Graf 9: Absorbance VIS kalibračních roztoků Rhodamin B.

## 11.4 Degradace PLGA 85:15

Součástí experimentu bylo i zjišťování vlivu poměru jednotlivých složek kopolymeru PLGA na degradaci, pro tento experiment byl zvolen kopolymer PLGA s poměrem 85:15 (AP 24), který byl zvlákněn na zařízení Nanospider v Liberci. Nejprve jsme zvolili zkušební 3 denní degradaci za použití dvou různých enzymů, Lipázy a Proteinázy K. U Lipázy byl použit jako pufr PBS s pH 7,4 a u Proteinázy K byl použit jako pufr 0,1 M Tris s pH 8. Pro oba typy jsme nastavili 20 U/ml. Porovnání těchto dvou enzymů je možné vidět na obrázku (38), na jehož základě jsme se rozhodli nadále pracovat s Proteinázou K.



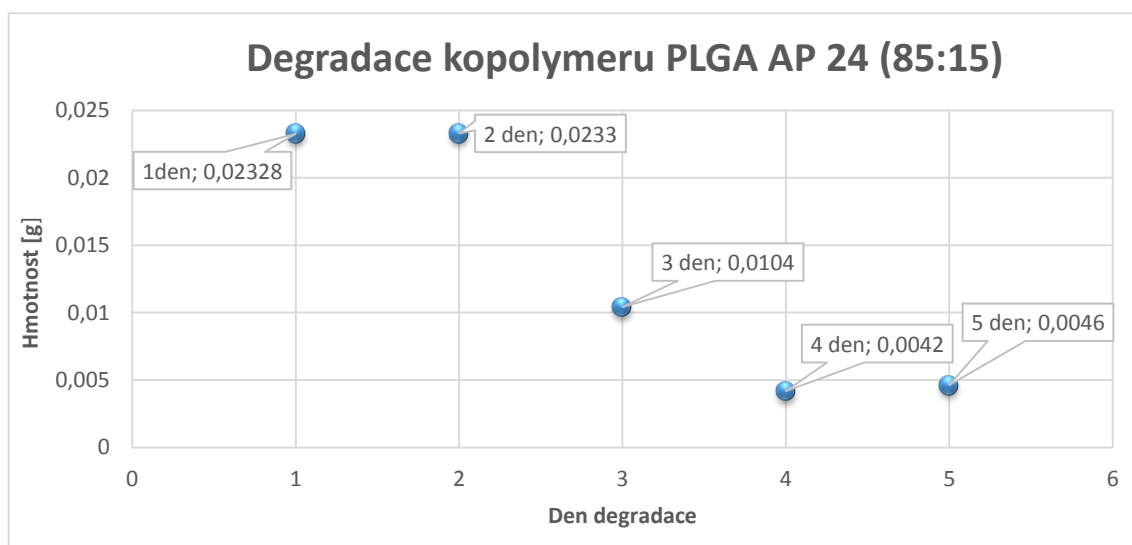
*Obr. 38 Snímky z elektronového mikroskopu průběhu degradace kopolymeru PLGA o poměru 85:15 (AP 24) 20 hm. % při použití lipázy (A), proteinázy K (B). Při zvětšení (1000x).*

### 11.4.1 Postup degradace PLGA 85:15 (AP 24)

Nejprve bylo potřeba vyrobený kopolymer nastříhat a navážit jeho potřebné množství. Poté byl vložen do připravených zkumavek. Prováděli jsme 5ti denní degradaci, tudíž bylo zapotřebí mít 5 vzorků o přibližné hmotnosti 50 mg (čím přesněji, tím lépe), doplněné o 1 negativní kontrolu. Pro tento experiment bylo zvoleno 5 U/ml. Postup je podobný jako u kinetiky uvolňování, s tím rozdílem, že při degradaci se zaměřujeme na hmotnostní úbytky daných vzorků, které postupně každý den odebíráme. Pokaždé odebraný vzorek propláchneme destilovanou vodou, abychom opět zabránili případnému pokračování degradace. Je nutné vždy filtrační papír zvážit, a to ještě před začátkem proplachování vzorku, jelikož vzorek uschováváme spolu s filtračním papírkem, kdy velmi často dochází k přilepení vzorku na papírek, tudíž většinou vážíme vzorek i s papírkem, jehož hmotnost následně odečteme. Je dobré připravenou krabičku ještě opatřit parafilmem, který má zamezit případnému přilepení ke krabičce, kterou opět spolu se vzorkem ukládáme do termostatu o teplotě 37 °C. Vzorky vážíme nejdříve po 3 dnech, kdy by mělo dojít k dostatečnému proschnutí. Hmotnostní úbytky jsou uvedeny v tabulce (9), která je doplněna následující řadou obrázků, jež signalizují průběh celé degradace.

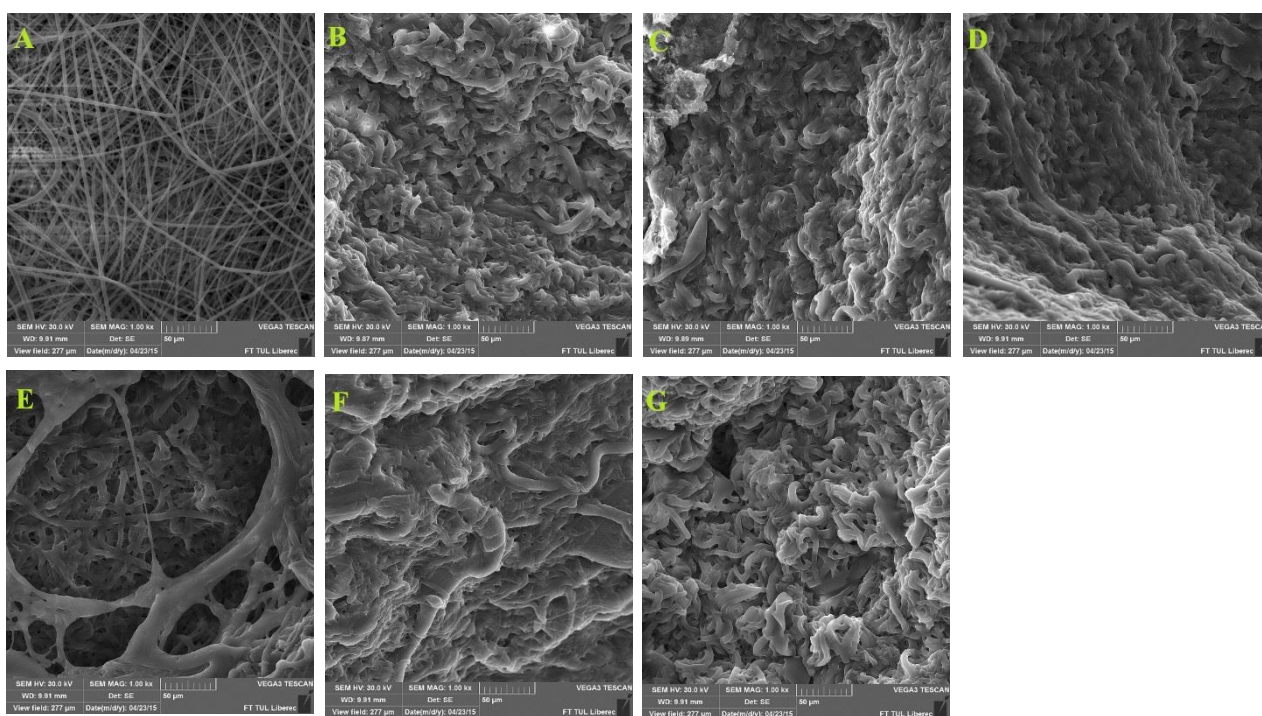
Tabulka 9: Hmotnostní úbytky v průběhu degradace kopolymeru PLGA v poměru 85:15

Den degradace	Hmotnost papírku	1. vážení	2. vážení	3. vážení
1.	0,2043 g	0,0421 g	0,0335 g	0,0328 g
2.	0,2025 g	0,1111 g	0,0242 g	0,0233 g
3.	0,1909 g	0,1918 g	0,0109 g	0,0104 g
4.	0,1901 g	0,5745 g	0,0048 g	0,0042 g
5.	0,1803 g	0,4742 g	0,0052 g	0,0046 g
Kontrola	0,1915 g	0,5756 g	0,0549 g	0,0546 g



Graf 10: Degradace kopolymeru PLGA (AP 24) pro 5 dní, za použití enzymu proteinázy K.

### Průběh degradace



Obr. 39 Snímky z elektronového mikroskopu průběhu degradace kopolymeru PLGA o poměru 85:15 (AP 24) 20 hm. % při použití proteinázy K. Původní vzorek (A), 1. den degradace (B), 2. den degradace (C), 3. den degradace (D), 4. den degradace (E), 5. den degradace (F), negativní kontrola (G). Při zvětšení (1000x).

Na obrázku (39) můžeme vidět porovnání původního vzorku a jeho postupné degradace v 5ti dnech, kdy 5. den je vidět, že už dochází k narušování struktury. Je zde přidána i negativní kontrola, která však taky signalizuje známky degradace, která je způsobena působením 37 °C teploty v termostatu.

## Závěr

Diplomová práce se zabývala vývojem PLGA mikročástic metodou elektrosprayingu pro cílenou dopravu léčiv, známé také pod anglickým termínem „drug delivery system“. Nespornou výhodou tohoto systému je minimalizování vedlejších účinků a dodání aktivní látky přímo na cílové místo, aniž by došlo k předčasnému uvolnění léčiva a tím tak ke snížení léčivého efektu.

Práce byla strukturována do dvou hlavních částí, teoretické a praktické. Teoretická část popisuje základní principy metod, kterými byly vyráběny PLGA mikročástice a nanovlákná, tedy elektrosprayingu a elektrospinningu, u kterých byly následně popsány základní materiálové a procesní parametry. Dále zde byly vysvětleny pojmy související s cílenou dopravou léčiv, jako enkapsulace, kinetika uvolňování či degradace, a vše bylo doplněno rešeršemi souvisejících článků. Teoretická část tak posloužila jako opěrný bod pro část praktickou, která byla dále rozdělena do čtyř dílčích experimentálních částí.

V první části byly vytvořeny koncentrační řady pro vybraný modelový polymer, konkrétně PLGA v poměru 75:25 (AP 61), kde byly pro dva rozpouštědlové systémy stanoveny nejvhodnější koncentrace. Pro rozpouštědlový systém CHEKO byly zvoleny koncentrace 2, 5 a 20 hm. %, zatímco pro použití čistého chloroformu jako rozpouštědla byly stanoveny dvě koncentrace, a to 4 a 7 hm. %. Tyto koncentrace byly dále použity pro všechny typy poměrů kopolymeru PLGA. Ze snímků z elektronového mikroskopu, jež jsou uvedeny v analýze vyrobených částic, je možné vidět, že vysoké koncentrace vedly k výrobě nanovláken vhodných pro výrobu scaffoldů, zatímco při koncentracích 4 a 7 hm. % docházelo ke vzniku poměrně homogenních PLGA mikročástic, vhodných jako polymerní kapsle pro cílený transport léčiv, jejichž průměr se pohyboval v rozmezí 5 - 10  $\mu\text{m}$ . V druhé části se práce zaměřila na inkorporaci aktivních látek za použití elektrosprayingu na volnou hladinu, která byla tvořena kolektorem opatřeným aluminiovou fólií a jisté dávky chloroformu, jež musel být neustále doplňován. Na snímku z elektronového mikroskopu je možné vidět hladinu sprejovaných PVA částic obarvených fluorescenčním barvivem FITC s průměrem 1,67 mikrometrů. A po následném smíchání nasprejovaných částic s PLGA v poměru 75:25 (AP 61) a vytvoření 4% roztoku vystaveného vlivu ultrazvuku pod amplitudou 30 % a jeho následném elektrosprayingu z injekční stříkačky, se průměr mikročástic pohyboval v rozmezí 10 – 11  $\mu\text{m}$ . Třetí část se zabývala kinetikou

uvolňování aktivních látek, kdy byla použita opět metoda elektrosprayingu na volnou hladinu, která byla následně doplněna metodou při, které se kombinuje elektrospraying a elektrospinnig. Sprejovány byly částice PVA a z druhé strany docházelo ke zvlákňování PVB za vzniku souvislé vrstvy pro sledování kinetiky uvolňování, která byla rozdělena na kinetiku hodinovou a kinetiku 3denní. Ke sledování kinetiky byla použita metoda měření absorbance, kdy jsme vytvořili kalibrační křivky pro fluorescenční barviva FITC a Rhodamin, jimiž jsme proložili křivky námi připravených a změřených vzorků. Došlo pouze k nepatrnému uvolnění, které bylo zapříčiněno zvolením příliš nízkých jednotek použitého enzymu. Což však naskýtá možnost dalším zájemcům se tomuto velice zajímavému tématu věnovat, a optimalizovat tak vhodné parametry. Poslední, čtvrtá část je jakýmsi doplněním a ucelením celé experimentální části, kde je řešena degradace PLGA v poměru 85:15 (AP 24) za použití 5 U proteinázy, kdy ze snímků z elektronového mikroskopu, jež kopírují celý průběh degradace je vidět, že již 5. den dochází k narušování struktury polymeru.

Tato práce je konstruována pro vývoj a optimalizaci PLGA mikročástic pro cílený transport léčiv, což je velmi slibnou záležitostí budoucnosti, díky které bude lidem usnadněn boj s překážkami, jež si pro ně život připraví.





## Použitá literatura

ALMERÍA, B. et al., 2009. *Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery*. [online] 2009 [vid. 2015-02-26]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979709012855>

AIMERÍA, B., FAHMY, TM., GOMEZ, A., 2011. *A multiplexed electrospray process for single-step synthesis of stabilized polymer particles for drug delivery*. *J Control Release* 2011;154:203–10.

ANDRONOV, L., 2015 *Etylalkohol strukturformel och molekylmodeller*. [online]. 2015 [vid. 2015-05-12]. Dostupné z: [http://se.123rf.com/photo\\_12416301\\_etylalkohol-strukturformel-och-molekylmodeller.html](http://se.123rf.com/photo_12416301_etylalkohol-strukturformel-och-molekylmodeller.html)

ARSHADY, R., 1999. *Microspheres, Microcapsules and Liposomes: Medical and Biotechnology Applications*. London: Citus Books, cop. 680 s. ISBN 0953218724.

BĚŤÁK, J., 2012. *Inovace Ph.D. Studia pro biotechnologické aplikace* [online]. 2012 [vid. 2014-11-10]. Dostupné z: [http://www.bionanotech.cz/files/2012\\_modul\\_3/3\\_fina-lni\\_text\\_v1 .pdf](http://www.bionanotech.cz/files/2012_modul_3/3_fina-lni_text_v1.pdf)

BOCK, N. et al., 2011. *Electrospraying, a Reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications*. *Polymers*. Vol. 3, no. 1 s. 131- 149.

BOCK, N. et al., 2012. *Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art*. *Progress in Polymer Science*. Vol. 37, no. 11. s. 1510-1551.

BOHR, A. et al., 2011. *Preparation of microspheres containing low solubility drug compound by electrohydrodynamic spraying*. [online]. 2011 [vid. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311003097>

BRONZINO J. D., 2006. *Tissue engineering and Artificial organs* [online]. 2006 [vid. 2015-01-22]. Dostupné z: <http://www.google.cz/bo-oks?hl=cs&lr=&id=N4IrBgAAQBAJ&oi=fnd &pg=PP1&dq=tissue+enginee->

ring+and+artificial+organs&ots=GNx4pE-  
irTz&sig=HBNF83dovE86dSA\_VXFP2Ac4vck&redir\_esc=y#v=onepage&q=tis-  
sue%20engineering%20and%20artificial%20organs&f=false

BŘÍŽDALA, J., 2015. *E-ChemBook.eu* [online]. 2015 [vid. 2015-04-16]. Dostupné z:  
<http://www.e-chembook.eu/cs/enzymy>

CAI, Q. et al., 2003. *Enzymatic degradation behavior and mechanism of Poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin*. [online]. 2003 [vid. 2015-05-07]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961202003770>

CORNELL BIO/CHEM WIKI, 2015. *Chloroform*. [online]. 2015 [vid.2015-05-12]. Do-  
stupné z: <http://cornellbiochem.wikispaces.com/Chloroform>

DUCHÁČEK, V., 2011. *Polymery, výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. ISBN -978-  
7080-788-0 (3. vydání)

ELIAS, H., G., 2005. *Macromolecules Volume 1, chemical Structure and syntheses*.  
ISBN-10: 3527311726, ed. 1, 2005, 698 s.

ELIAS, H., G., 2006. *Macromolecules Volume 2, Industrial polymers and syntheses*.  
ISBN: 978-3-527-31173-6, ed. 1, 2006, 664 s.

FECZKÓ, T. et al., 2006. *Influence of process conditions on the mean size of PLGA na-  
noparticles*. [online] 2010 [vid. 2015-03-27]. Dostupné z: *Influence of process condi-  
tions on the mean size of PLGA nanoparticles*.

FEYNMAN, R. P. et al., 2006. *Feynmanovy přednášky z fyziky 2*. Praha: Fragment. 808  
s. ISBN 8072004204.

FOURNIER, E. et al., 2003. *Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug  
carriers: focus on brain biokompatibility*. [online] 2003 [vid. 2015-03-27]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203001613>

GHAYEMPOUR, S., MORTAZAVI, M. S., 2012. *Fabrication of micro-nanocapsules  
by a new electrospraying method using coaxial jets and examination of effective para-  
meters on their production*. [online] 2012 [vid. 2015-03-27]. Dostupné z:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304388613000673>

GRIGOR ´EV, A. I. et al., 1991. Ball Lightning and St. Elmo's Fire as Forms of  
Thunderstorm Activity. *Journal of Scientific Exploration*. Vol. 5, no. 2, s. 163-190.

CHAKRABORTY, S., et al., 2009. *Electrohydrodynamics: A facile technique to*

- fabricate drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews.* [online] 2009 [vid. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09002269>
- CHO, D. D. et al., 2015. *Microfabrication Methods for Biodegradable Polymeric Carriers for Drug Delivery System Applications: A Review.* [online] 2015 [vid. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/xpl/articleDetails.jsp?arnumber=6971081>
- CHVOJKA, J., 2012. *Speciální kolektory pro elektrostatické zvláknování* [online]. 2012 [vid. 2015-03-25]. Dostupné z: [http://www.ft.tul.cz/bulletin/statni\\_doktorske\\_zkousky\\_a\\_obhajoby/2013/teze-Chvojka\\_2013.pdf](http://www.ft.tul.cz/bulletin/statni_doktorske_zkousky_a_obhajoby/2013/teze-Chvojka_2013.pdf)
- JAKLENEC, A. et al., 2008. *Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta(1) from PLGA microsphere-based scaffolds. Biomaterials.* [online]. 2008 [vid. 2015-04-02]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207009878>
- JAWOREK, A., 2007. *Micro- and Nanoparticle Production by Electrospraying. Powder-Technology.* [online] 2007 [vid. 2015-02-10]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591007000666>
- JAWOREK, A. et al., 2009. *Nanocomposite Fabric Formation by Electrospinning and Electrospaying Technologies. Journal of Electrostatics.* [online] 2009 [vid. 2015-02-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304388609000096>
- JIANG, H., WANG, Z., ZHU, K., 2014. *Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents.* [online] 2014 [vid. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914002430>
- KIM, W., KIM, S. S., 2011. *Synthesis of biodegradable triple-layered capsules using a triaxial electropray method.* [online] 2011 [vid. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386111004320>
- KÖRBER, M. BODMEIER, R., 2013. *Development of an in situ forming PLGA drug delivery system I. Characterization of a non-aqueous protein precipitation.* [online] 2013 [vid. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098708003394>
- KRÁLOVÁ, J. et al., 2010. *Legosystém pro cílený transport léčiv.* [online] 2010 [vid. 2015-01-04]. Dostupné z: <http://www.chemagazin.cz/Vyzkum-a-vyvoj-C804/Legosystem-pro-cileny-transport-leciv-CL31/>
- KRÁL, V. et al., 2005. *Nanomedicína – současný stav a perspektivy.* [online] 2005 [vid. 2015-01-04]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_01\\_4-9.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_01_4-9.pdf)

- KUMARI, A. et al., 2009. *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. [online] 2009 [vid. 2015-03-23]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509004111>
- LUKAŠ, D. et al., 2009. Physical Principles of Electrospinning (Electrospinning as a Nano-Scale Technology of the Twenty-First Century). *Textile Progress*.
- LUKAŠ, D. et al., 2013. *Fyzika polymerů*. Liberec: TUL.
- MA, G., 2014. *Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: Strategy, preparation, and applications*. [online] 2014 [vid. 2015-03-04]. Dostupné z: *Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: Strategy, preparation, and applications*
- MARTÍN-SABROSO, C., 2014. *Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles*. [online]. 2014 [vid. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315000101>
- Pareta, R. et al., 2005. *Electrohydrodynamic atomization of protein (bovine serum albumin)*. [online] 2005 [vid. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10856-005-4426-z>
- PEDACCHIA, A., ADROVER, A., 2014. *Study of release kinetics and diffusion coefficients in swellable cellulosic thin films by means of a simple spectrophotometric technique* [online]. 2014 [vid. 2015-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876214001488>
- PROKOPOVÁ, I., 2007. *Makromolekulární chemie*. Praha: VŠCHT. 207 s. ISBN 8070805544.
- RABIŠOVÁ, M., 2007. *Nanočástice pro léčivé formy* [online]. 2007 [vid. 2015-04-04]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Nanocastice-pro-lekove-formy/6-H-ix.magarticle.aspx>
- SHAH, R. S. et al., 2014. *Effects of Antibiotic Physicochemical Properties on Their Release Kinetics from Biodegradable Polymer Microparticles*. [online]. 2014 [vid. 2015-03-11]. Dostupné z:
- SCHLIECKER, G. et al., 2003. *Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity* [online]. 2003 [vid. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851730300379X>
- SCHNABEL, W., 1981. *Polymer Degradation Principles and Practical Applications*, ISBN: 3-446-13264-3, 1981, 227
- ULBRICH, K., 2004. *Možnosti použití syntetických polymerů při vývoji léčiv: od protinádorové ke genové terapii*. [online] 2004 [vid. 2015-01-04]. Dostupné z: [http://www.learned.cz/userfiles/pdf/verejne-prednasky/karel.ulbrich\\_1107.pdf](http://www.learned.cz/userfiles/pdf/verejne-prednasky/karel.ulbrich_1107.pdf)

- UWEB, 2004. *Biomaterials Tutorial*. [online]. 2004 [vid. 2015-05-07]. Dostupné z: <http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/plagla.html>
- VYROUBALOVÁ, Z., 2011. *Netoxické „green“ katalyzátory pro biomedicínské polyestery* [online]. 2011 [vid. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/netoxicke>
- VYSLOUŽIL, J. et al., 2014. *Influence of different formulations and process parameters during the preparation of drug-loaded PLGA microspheres evaluated by multivariate data analysis*. [online] 2014 [vid. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/acph.2014.64.issue-4/acph-2014-0032/acph-2014-0032.xml>
- WAN, F. et al., 2013. *Impact of PLGA molecular behavior in the feed solution on the drug release kinetics of spray dried microparticles* [online]. 2013 [vid. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386113008276>
- WEN, G. T. et al., 2013. *Preparation of fiber-microsphere scaffolds for loading bioactive substances in gradient amounts*. [online] 2013 [vid. 2015-02-26]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11434-013-5974-0>
- XIE, JW. et al., 2008. *Encapsulation of protein drugs in biodegradable microparticles by co-axial electrospray*. *J Colloid Interface Sci* 2008;317:469–76
- XIE, JW., et al., 2007. *Encapsulation of proteins in biodegradable polymeric microparticles using electrospray in the Taylor Cone-Jet mode*. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:1278–90.
- XIE, JW. Et al., 2008. *Biodegradable films developed by electrospray deposition for sustained drug delivery*. *J Pharm Sci* 2008;97:3109–22.
- XIE, Y., CASTRANE, J., 2009. *High-Voltage, Electric Field-Driven Micro/ Nanofabrication for Polymeric Drug Delivery Systems*. [online] 2009 [vid. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/xpl/articleDetails.jsp?arnumber=4747720>
- XU, Q. et al., 2013. *Mechanism of drug release from double-walled PDLA(PLGA) microspheres*. [online]. 2013 [vid. 2015- 03-17]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213001841>
- YANG, H. et al., 2014. *Applicability of a Newly Developed Bioassay for Determining Bioactivity of Anti-Inflammatory Compounds in Release Studies – Celecoxib and Triamcinolone Acetonide Released from Novel PLGA-Based Microspheres*. [online] 2014 [vid. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-014-1495-z>
- YAO, J. et al., 2008. *Characterization of electrospraying process for polymeric particle fabrication*. [online]. 2008 [vid. 2015-03-12]. Dostupné z: *Characterization of electrospraying process for polymeric particle fabrication*.
- YE, M. et al., 2010. *Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles*. [online] 2010 [vid. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910003603>

ZAMANI, M., 2014. *Protein encapsulated core–shell structured particles prepared by coaxial electrospraying: Investigation on material and processing variables*. [online] 2014 [vid. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314004955>

## **Seznam příloh**

**Příloha A** – Statistické vyhodnocení kinetiky uvolňování

**Příloha B** – Statistické vyhodnocení průměru částic kopolymeru PLGA v poměru 3:1

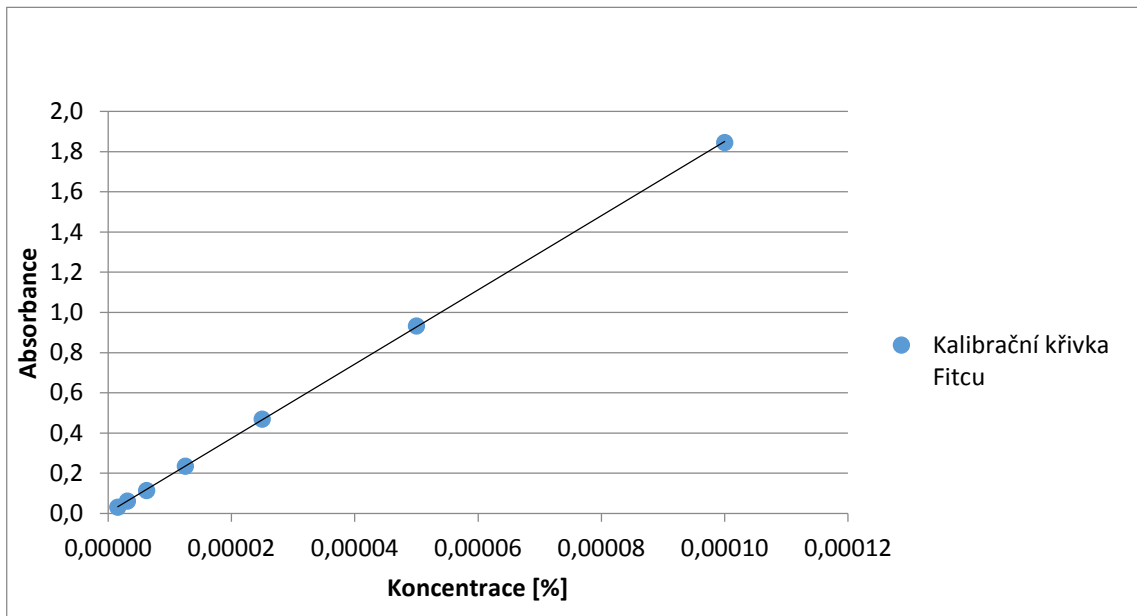
**Příloha C** – Statistické vyhodnocení průměru částic kopolymeru PLGA pro AP 24, AP 39, AP 76 v CHEKU

**Příloha D** – Statistické vyhodnocení částic kopolymeru PLGA pro AP 61, AP 24, AP 39, AP 76 v chloroformu

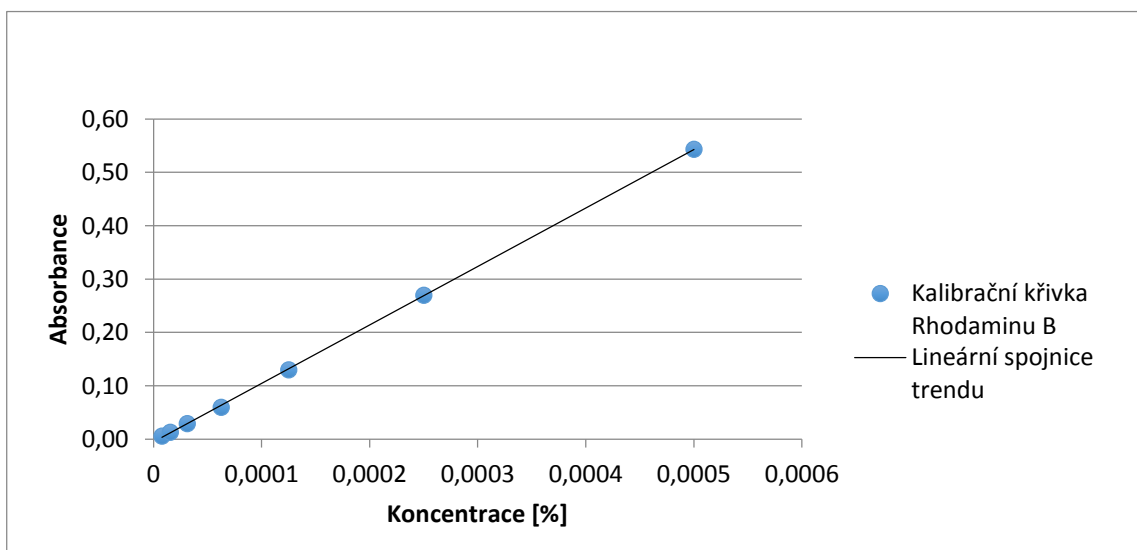
**Příloha E** – Statistické vyhodnocení průměru vyrobených částic pomocí elektrosprayingu na volnou hladinu

## Příloha A

### A1 – Kalibrační křivka Fitcu

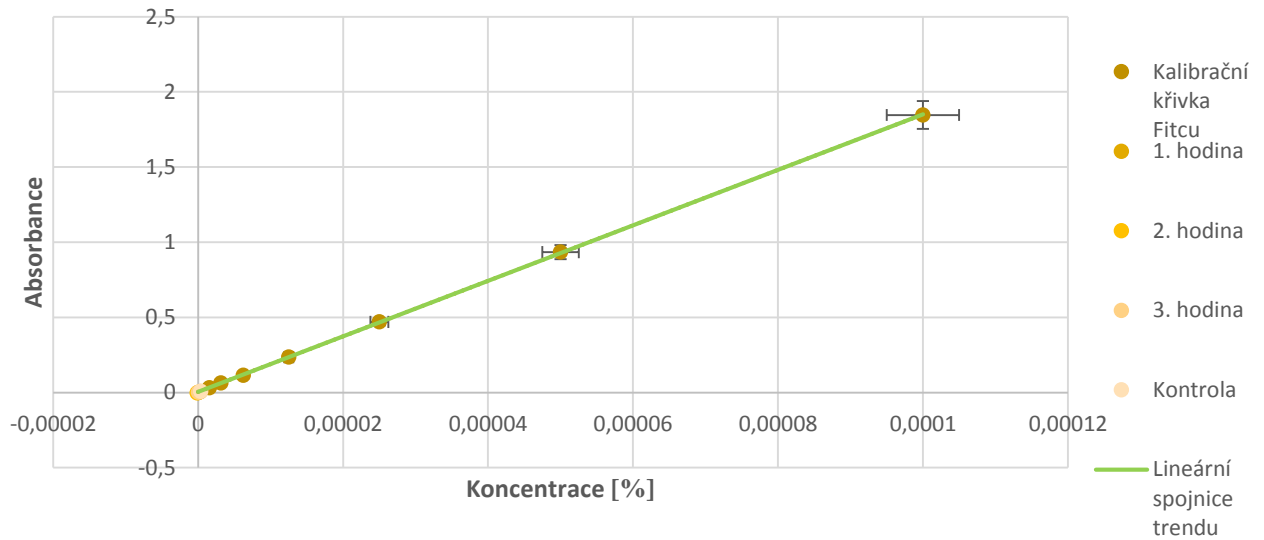


### A2 – Kalibrační křivka Rhodaminu B

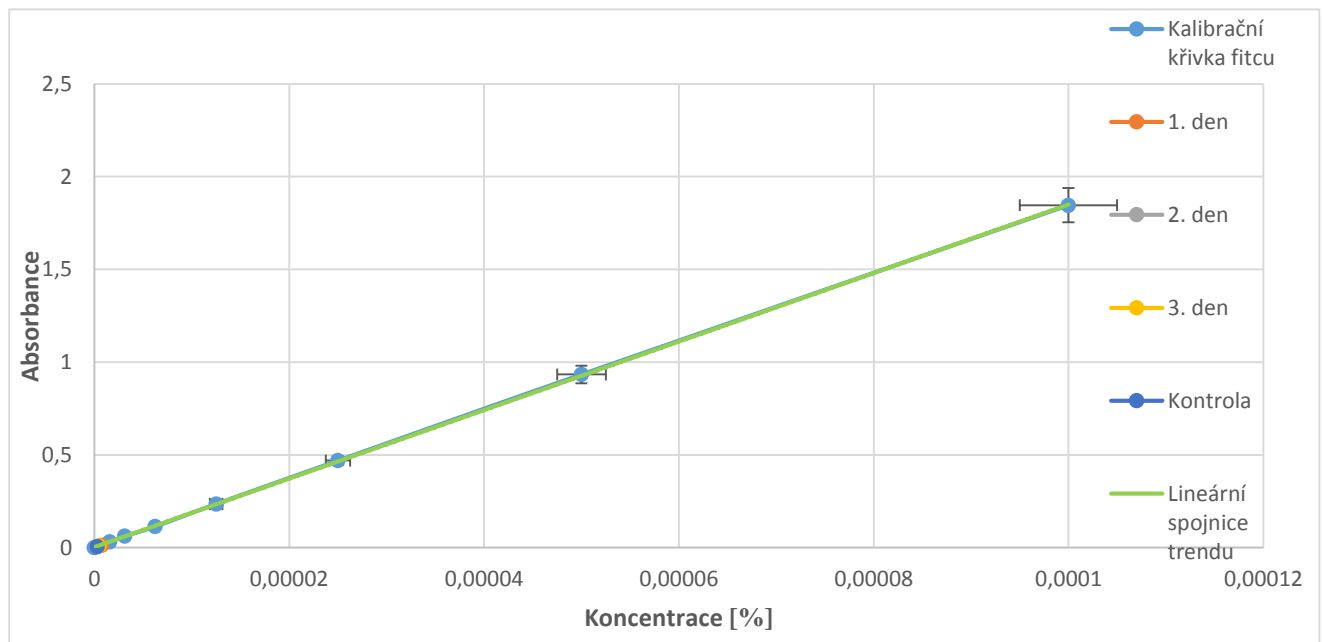




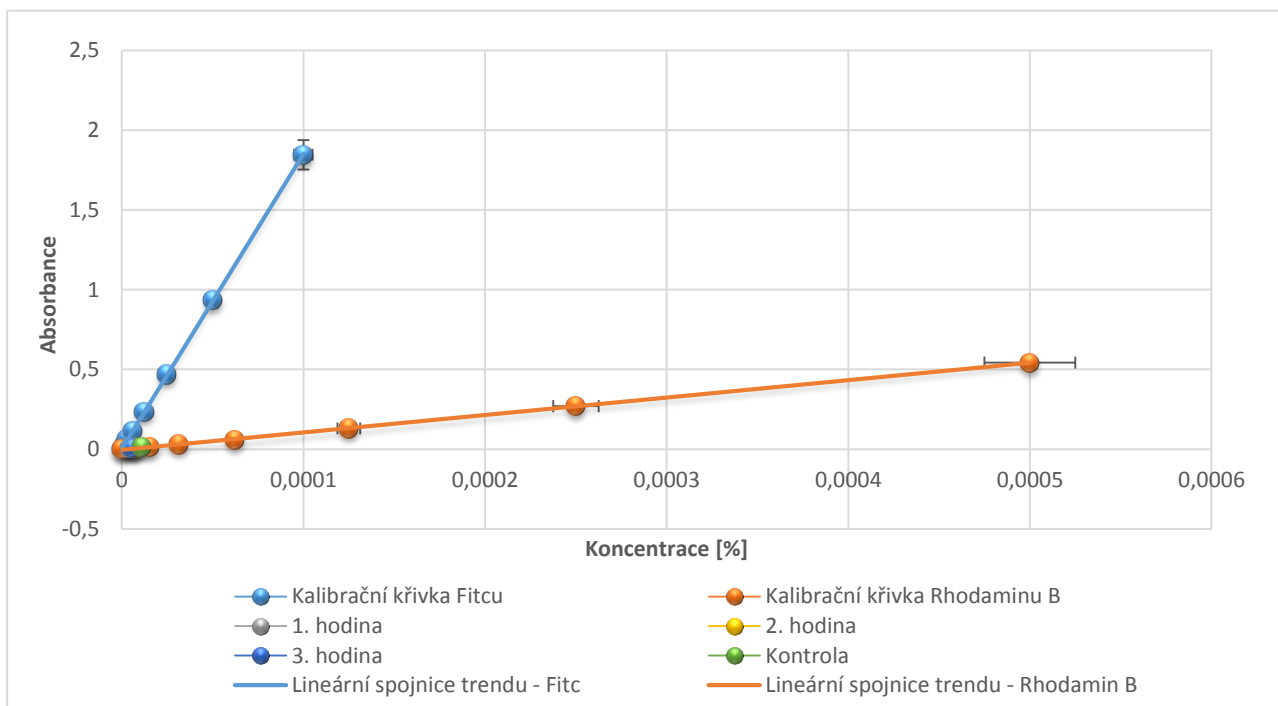
A3 – Kalibrační křivka Fitcu, proložená lineární spojnicí trendu a námi naměřenými hodnotami hodinové kinetiky pro Fitc, doplněné o kontrolu a 5% chybové úsečky



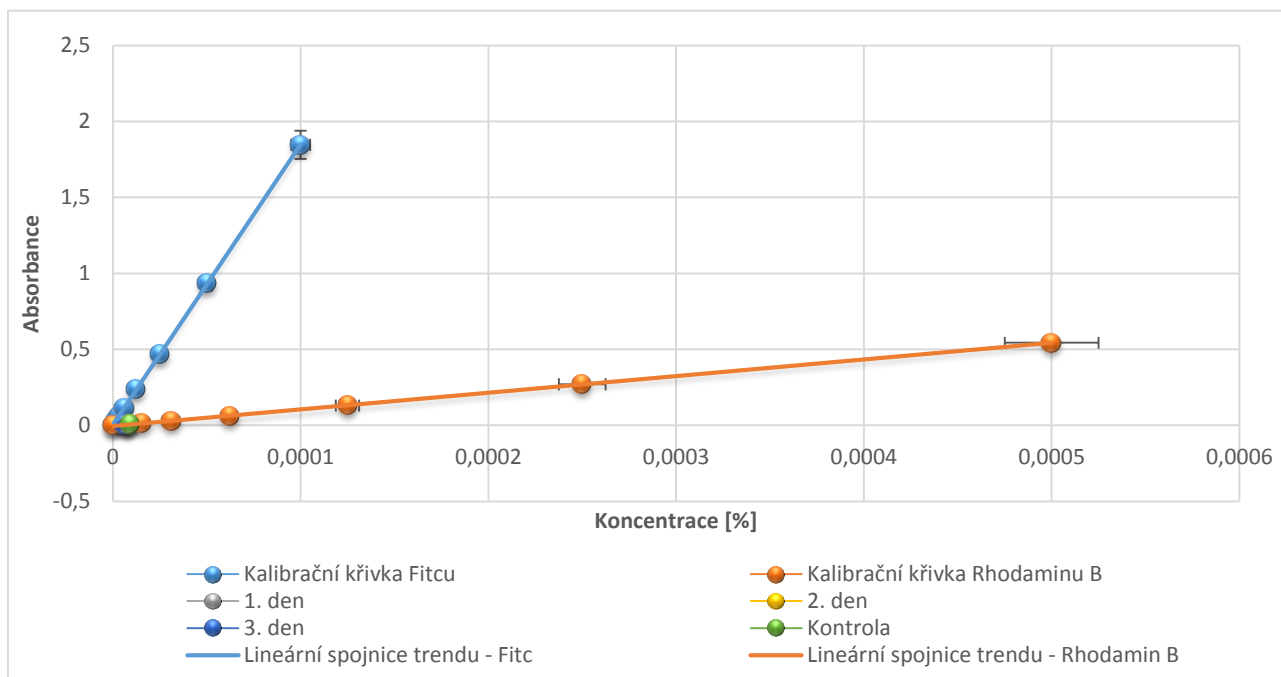
A4 – Kalibrační křivka Fitcu, proložená spojnicí trendu a námi naměřenými hodnotami 3denní kinetiky pro Fitc, doplněné o kontrolu a 5% chybové úsečky



A5 - Kalibrační křivky Fitcu a Rhodaminu B, proložené lineární spojnicí trendu a námi naměřenými hodnotami hodinové kinetiky pro Rhodamin a Fitc, doplněné o kontrolu a 5% chybové úsečky

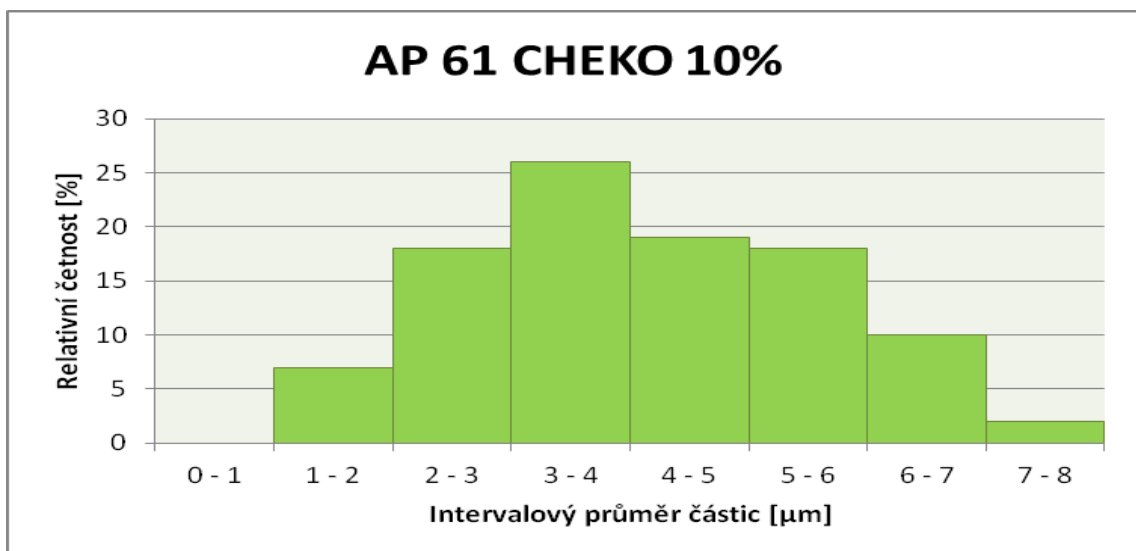
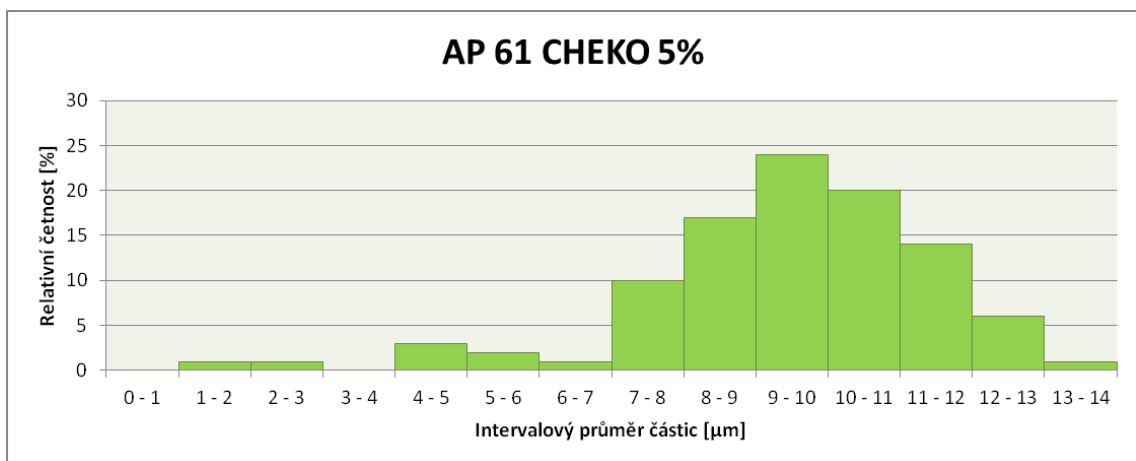
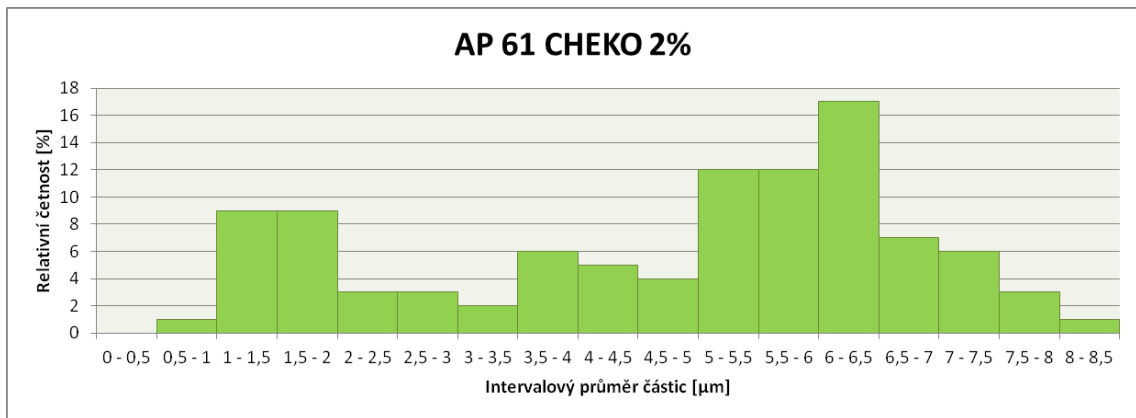


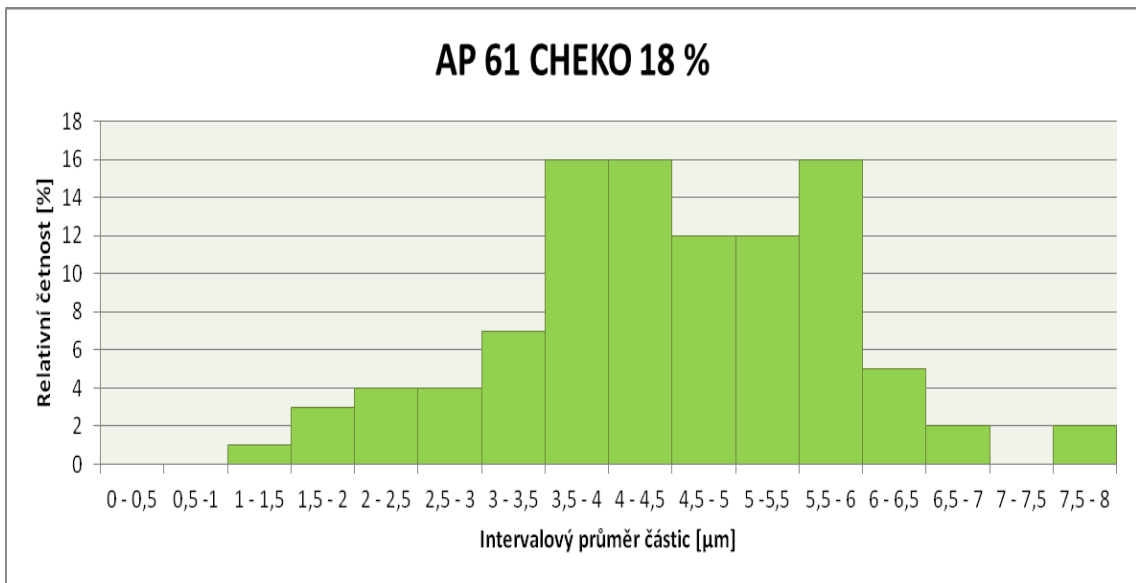
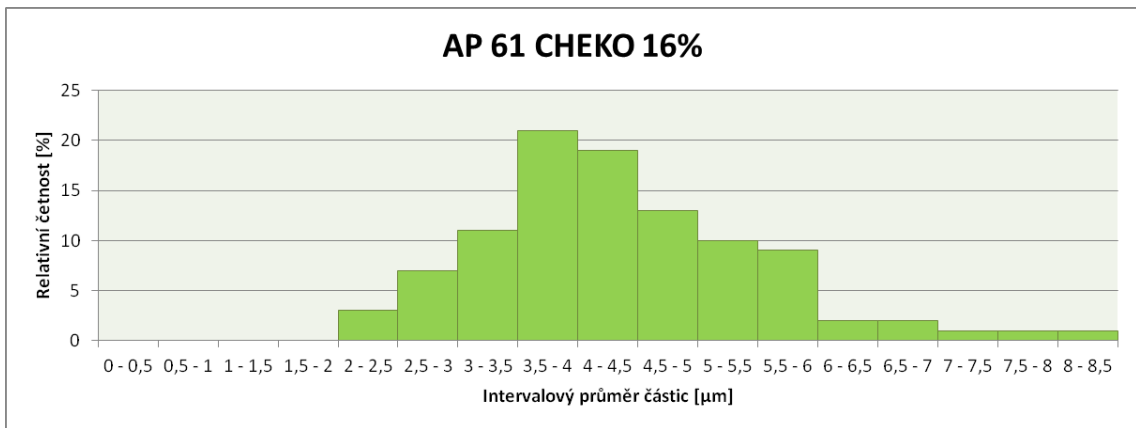
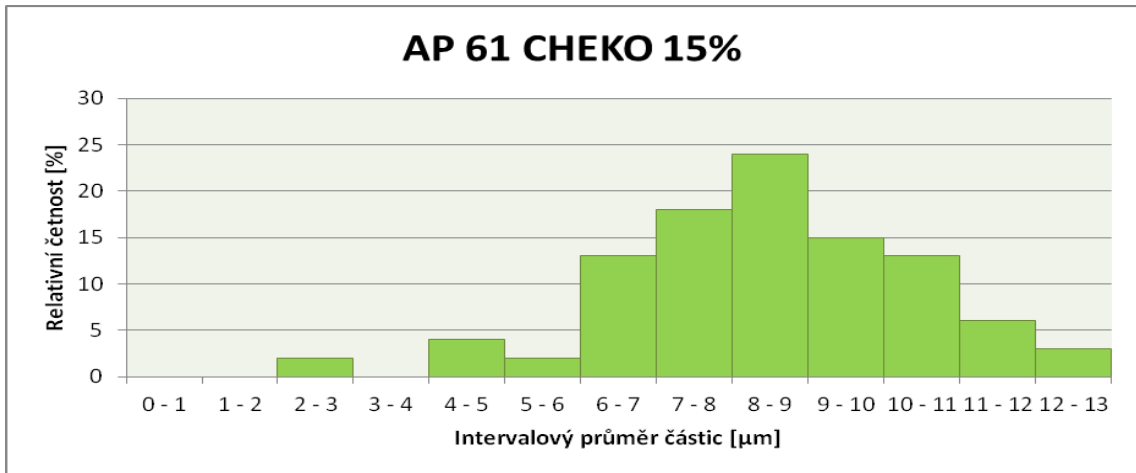
A6 – Kalibrační křivky Fitcu a Rhodaminu B, proložené lineární spojnicí trendu a námi naměřenými hodnotami 3denní kinetiky pro Rhodamin a Fitc, doplněné o kontrolu a 5% chybové úsečky

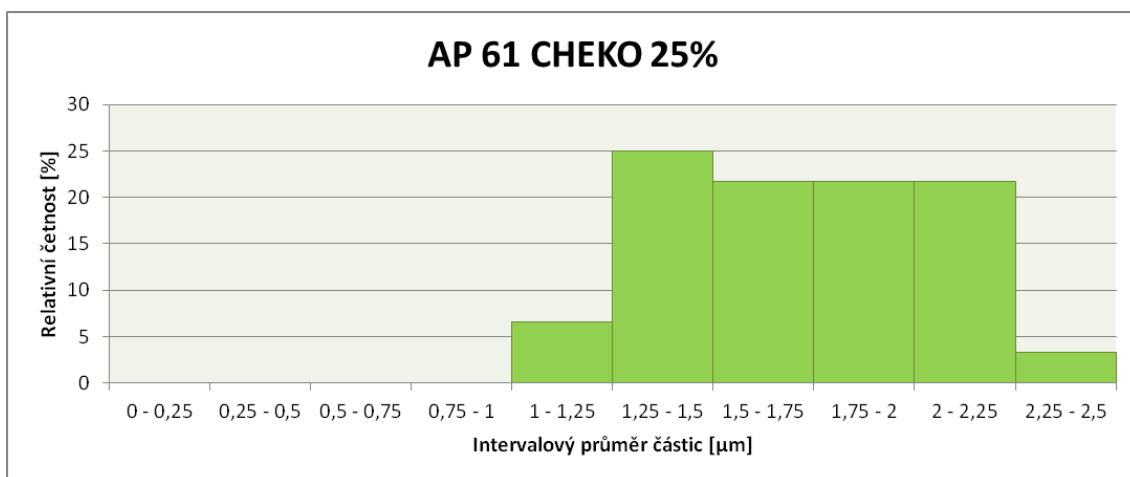
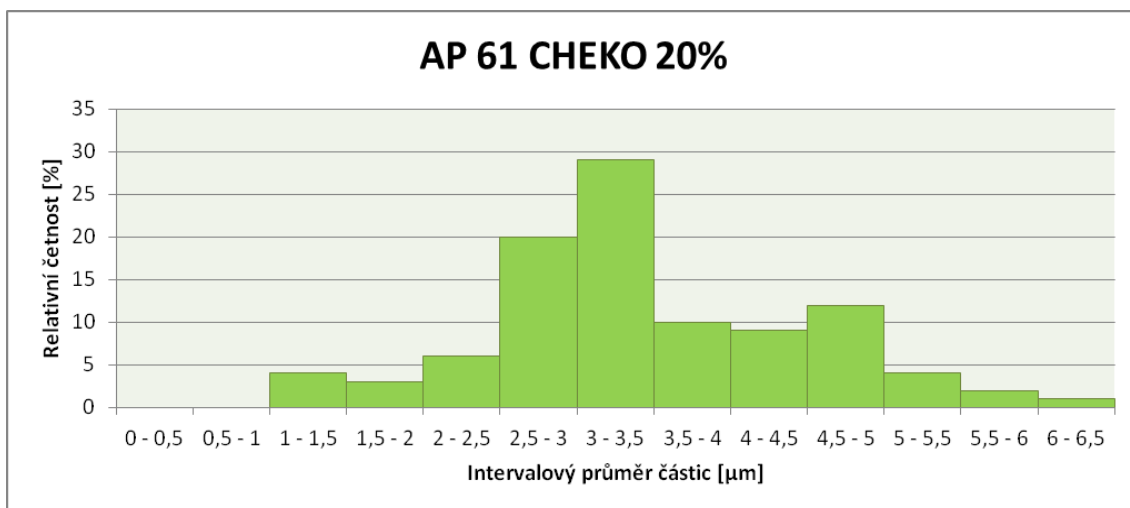


## Příloha B

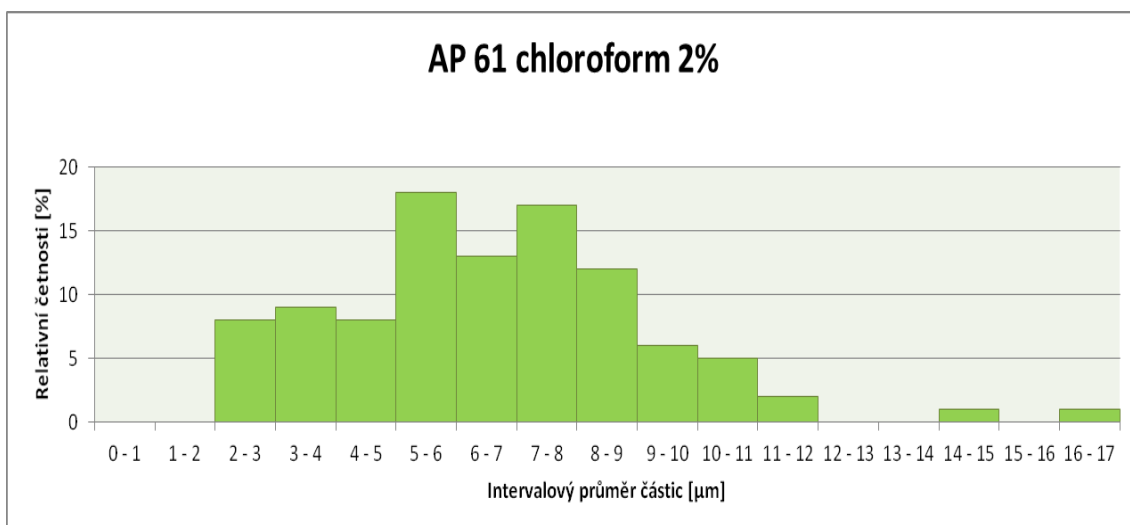
### B1 – Histogramy průměru částic pro AP 61 v CHEKU



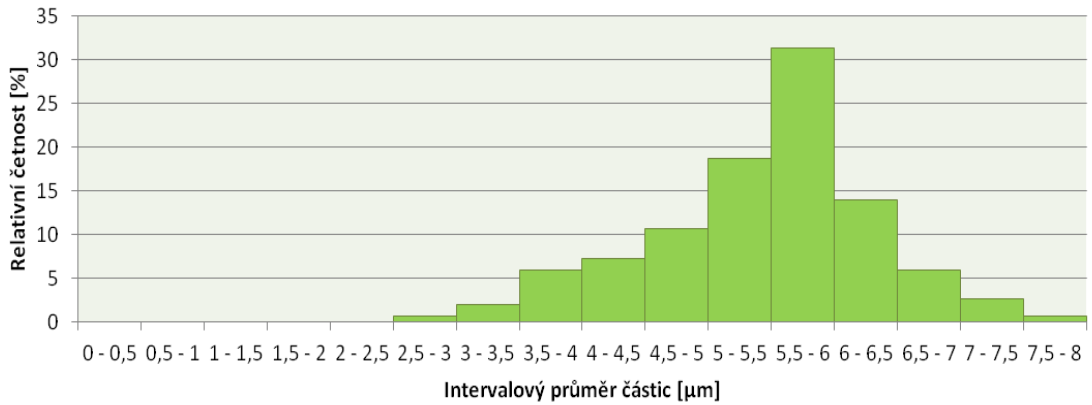




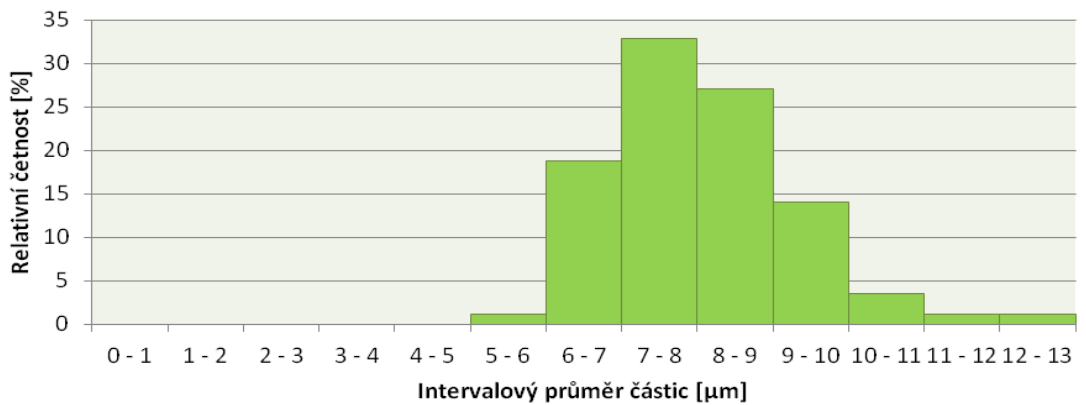
B2 – Histogramy průměru částic pro AP 61 v chloroformu



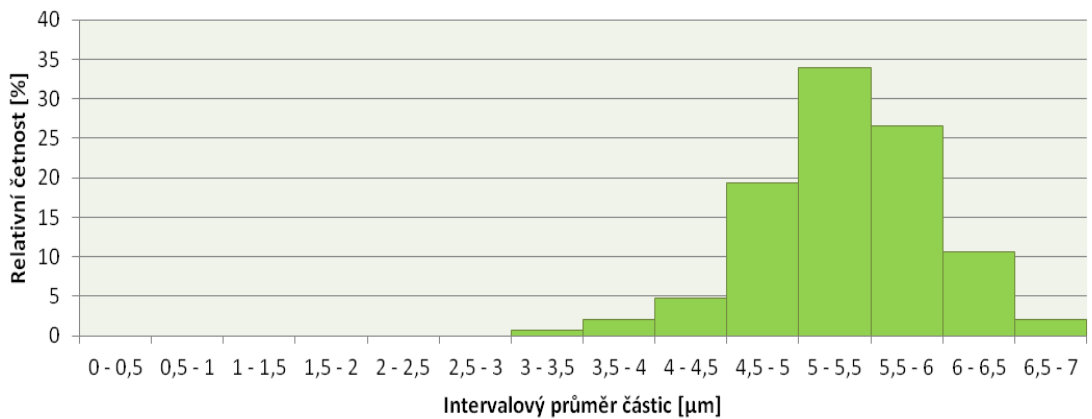
### AP 61 chloroform 4%

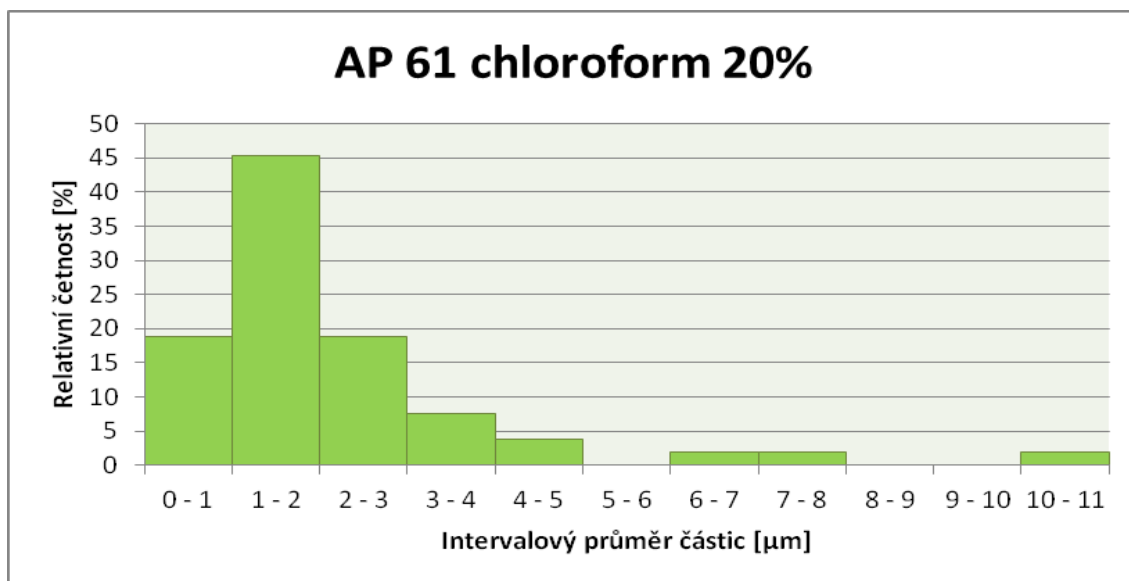
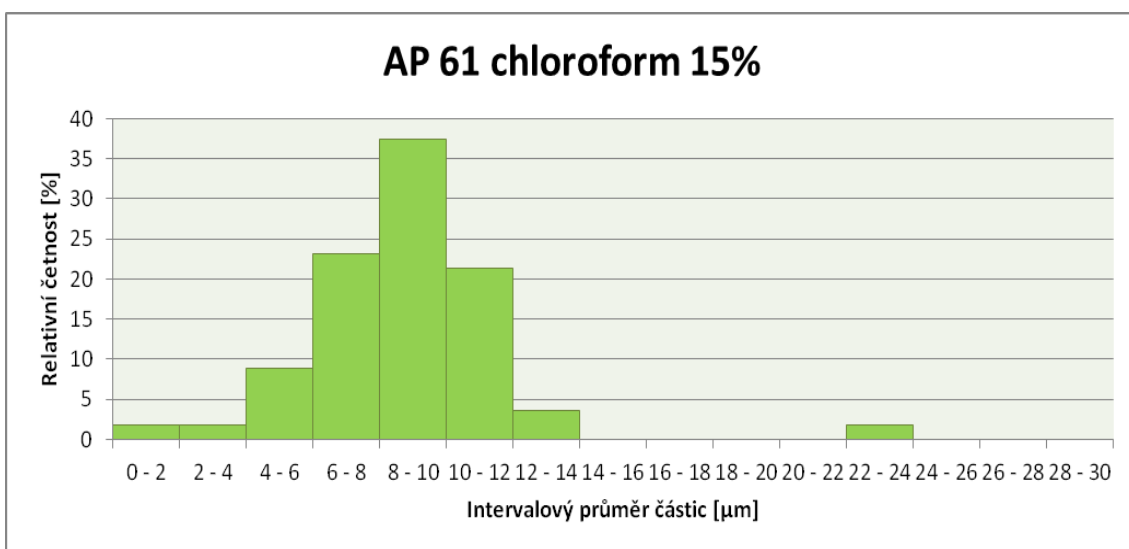
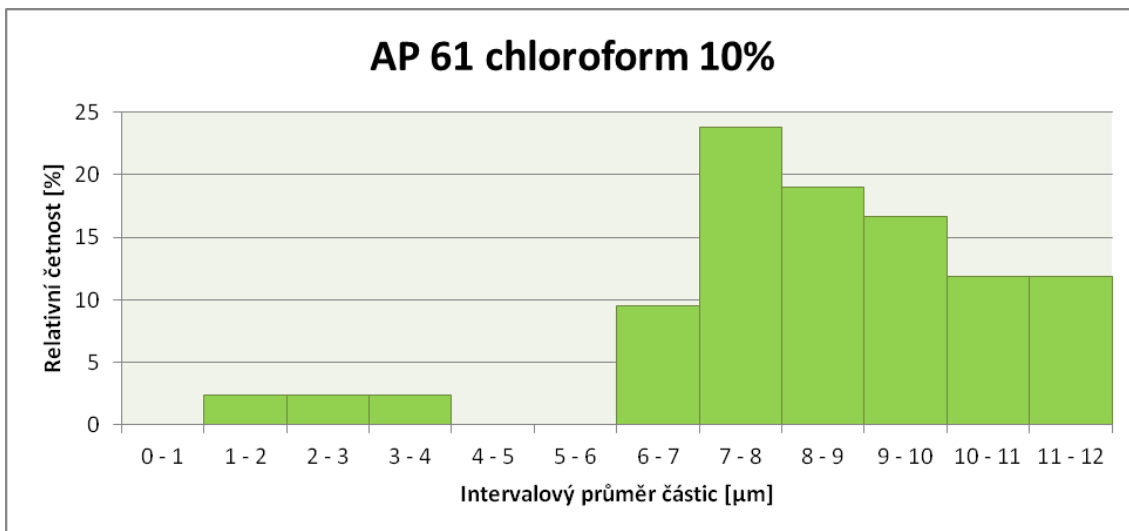


### AP 61 chloroform 5%



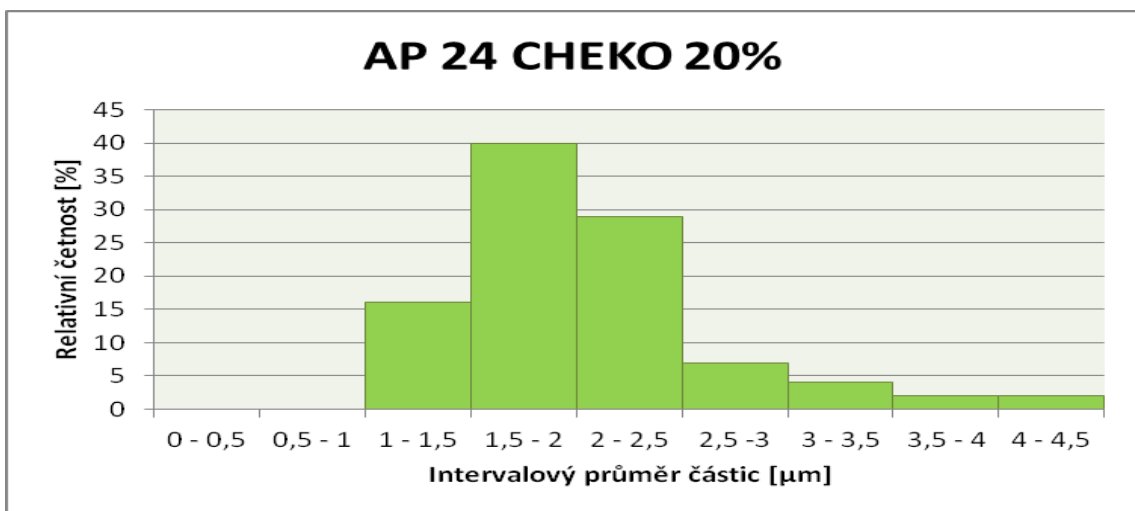
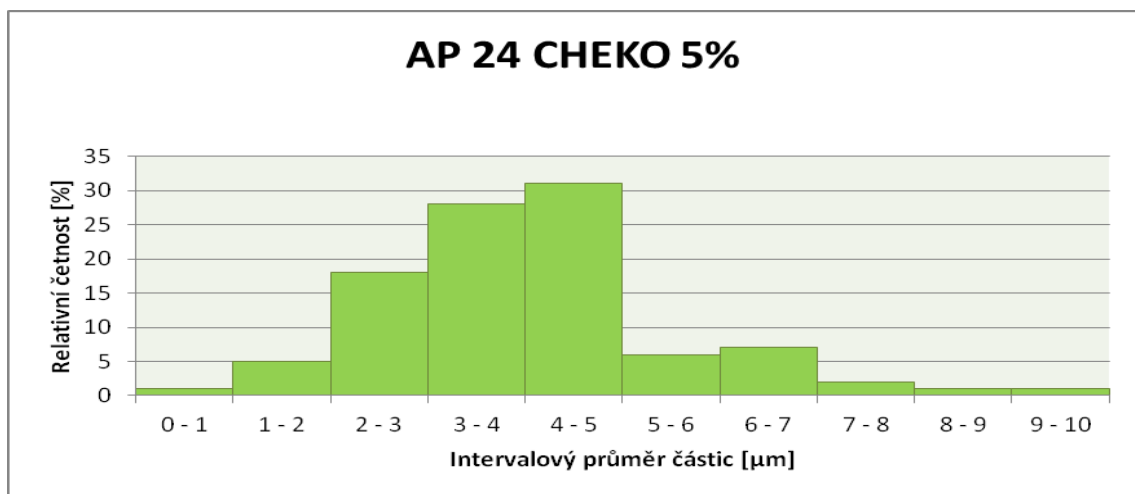
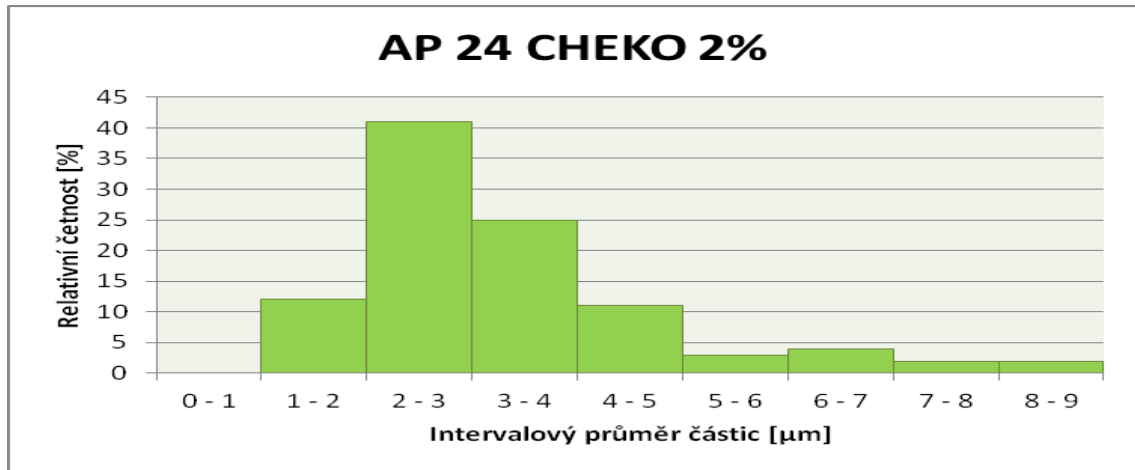
### AP 61 chloroform 7%





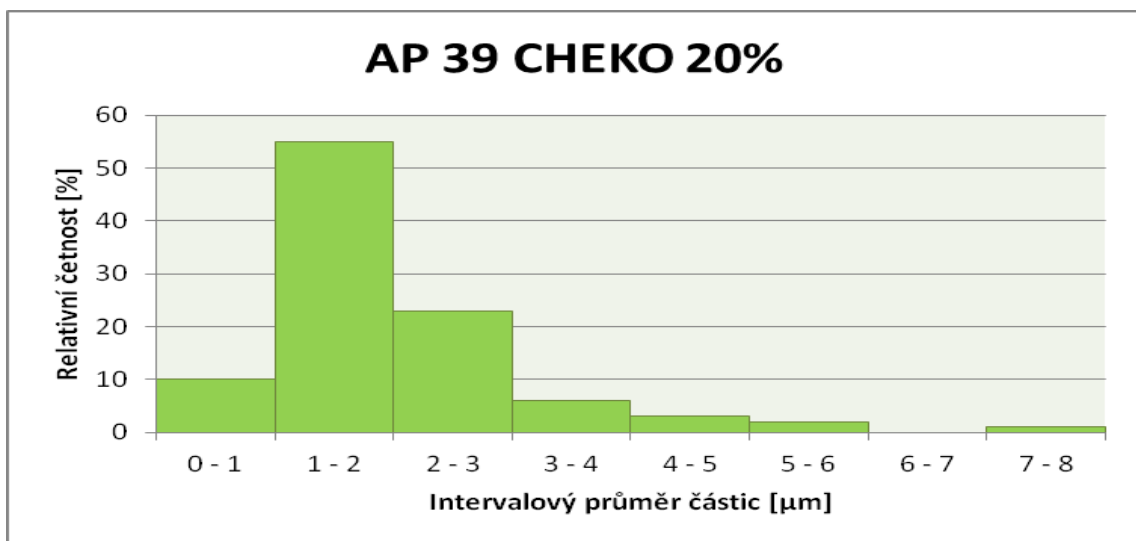
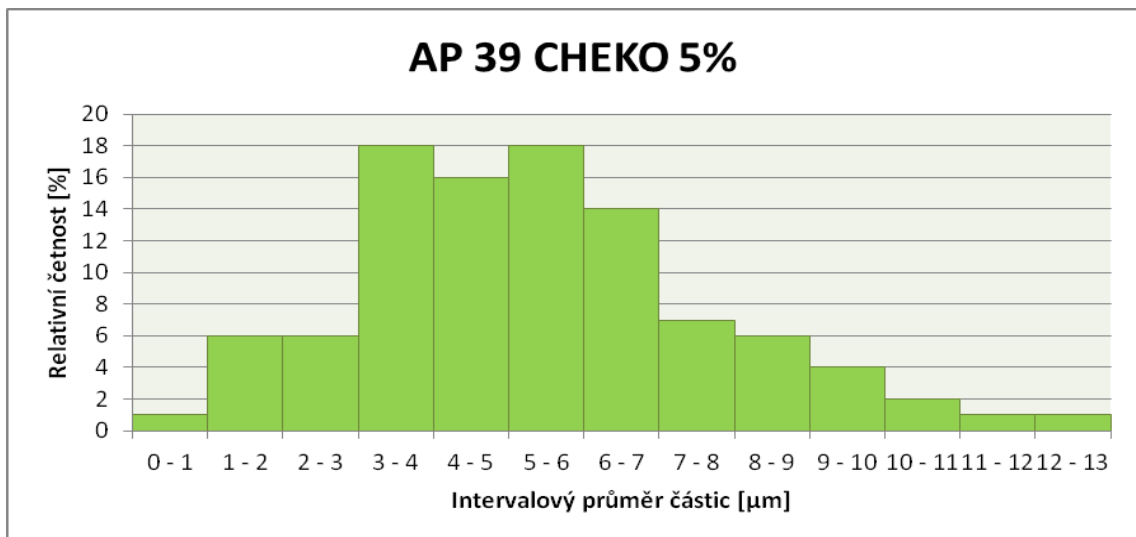
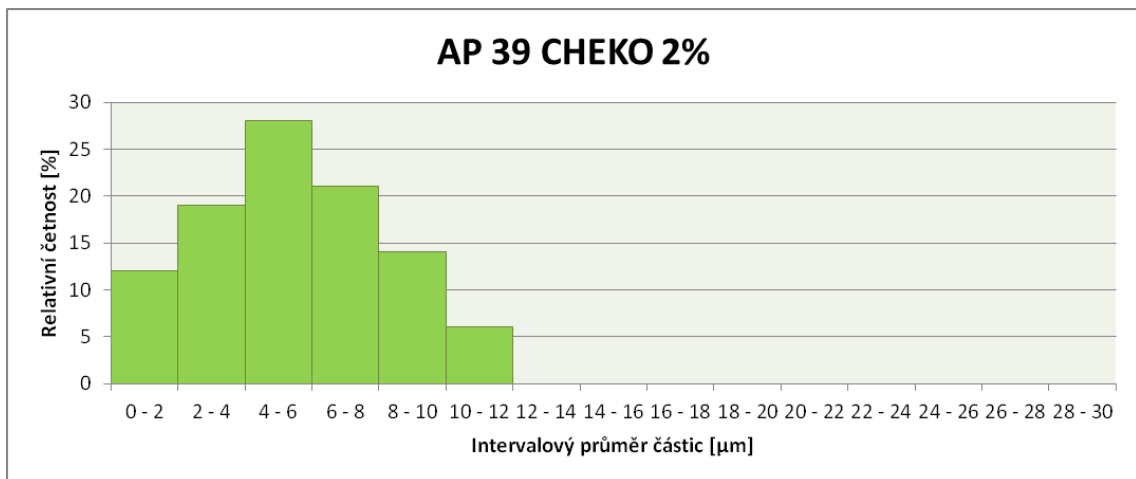
## Příloha C

C1 – Histogramy průměru částic pro AP 24 v CHEKU

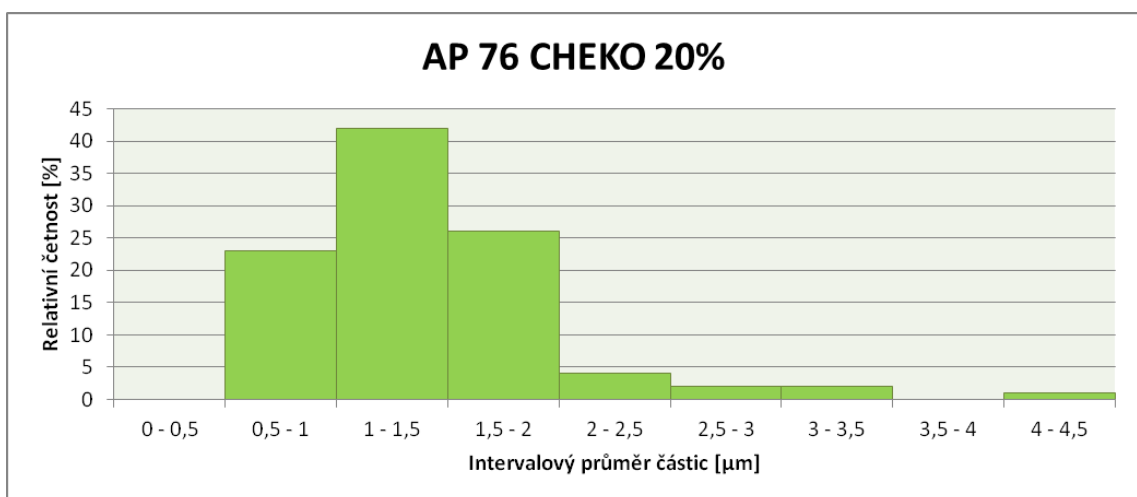
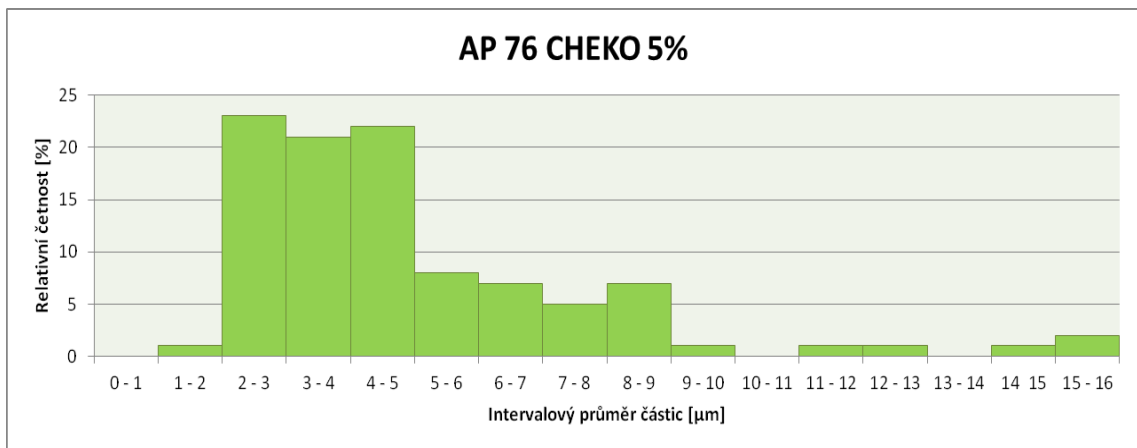
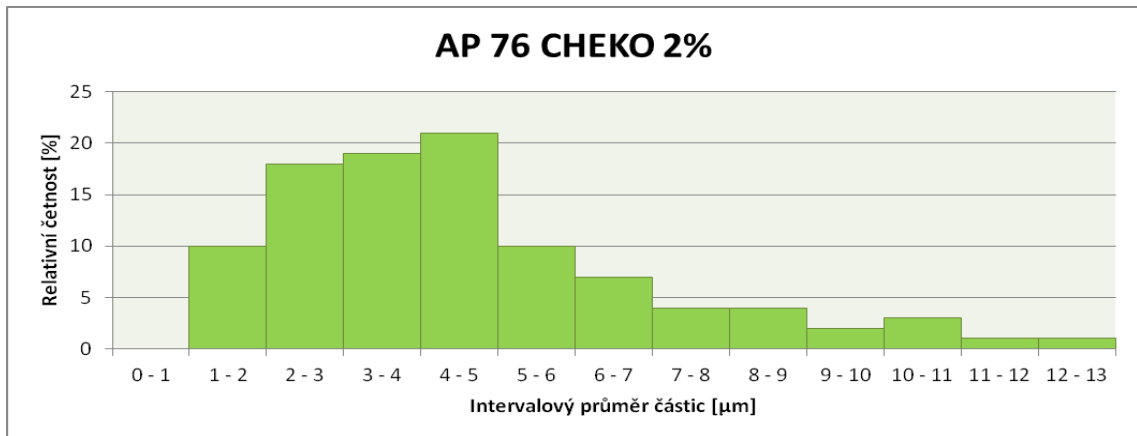




## C2 – Histogramy průměru částic pro AP 39 v CHEKU

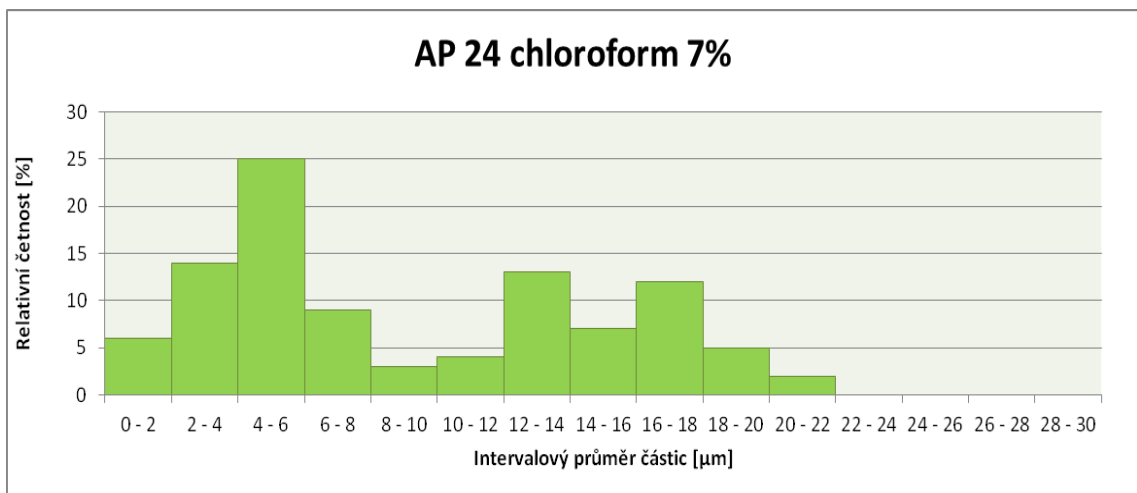
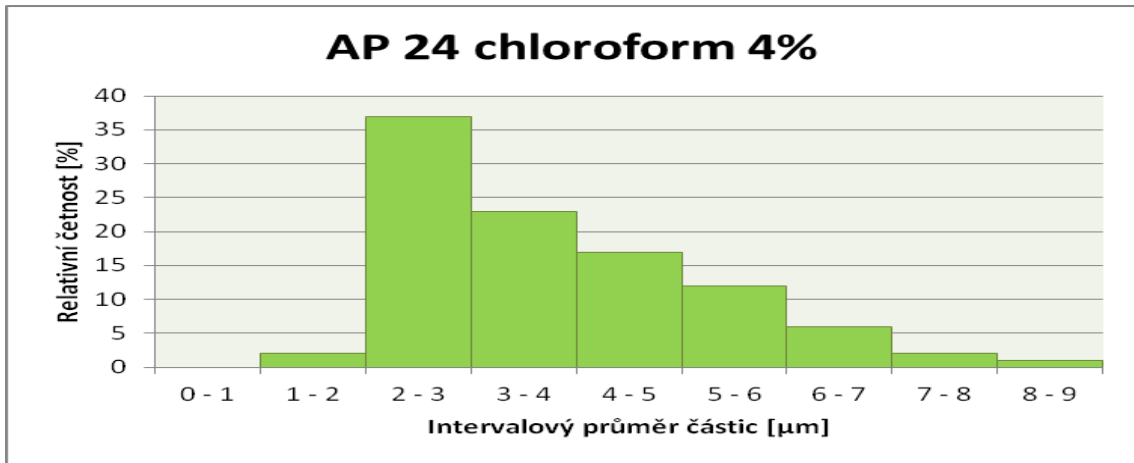


### C3 – Histogramy průměru částic pro AP 76 v CHEKU

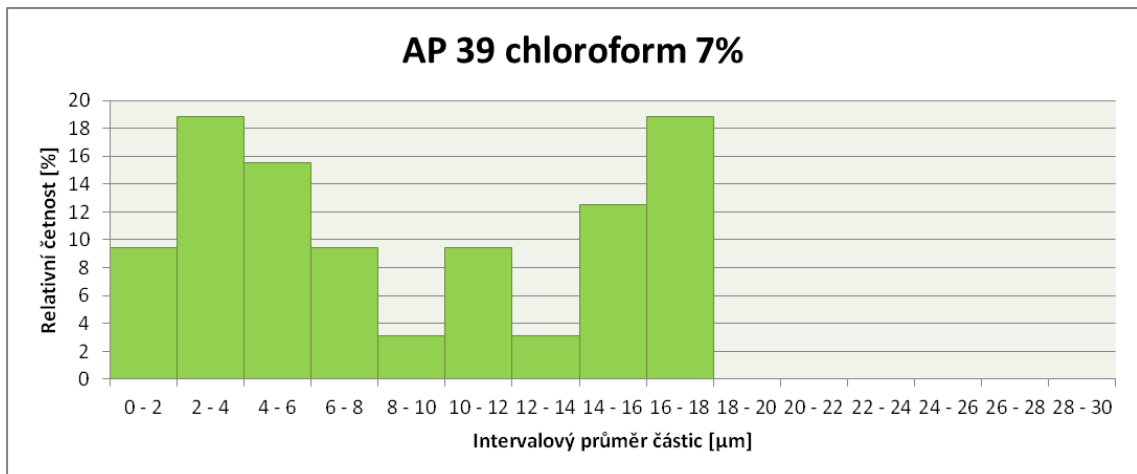
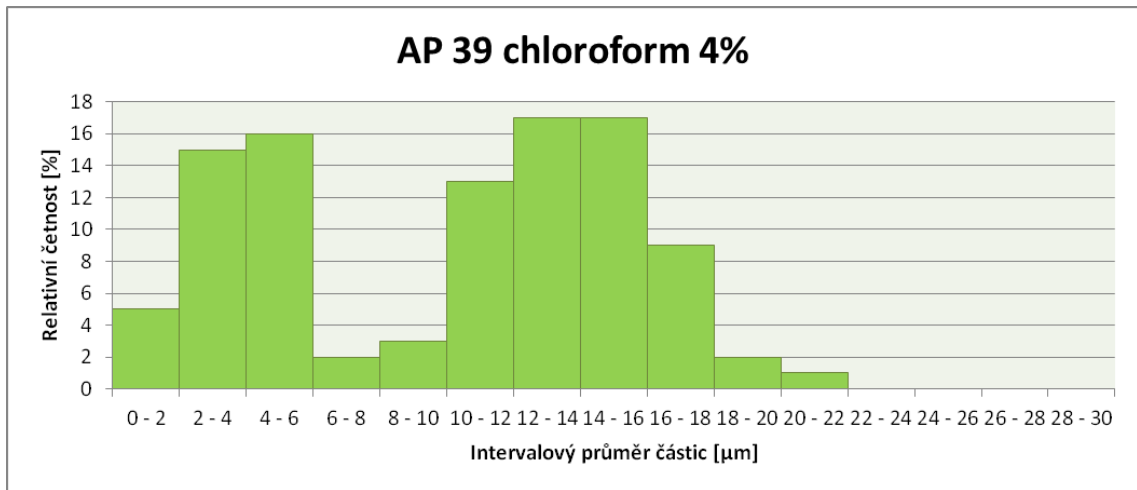


## Příloha D

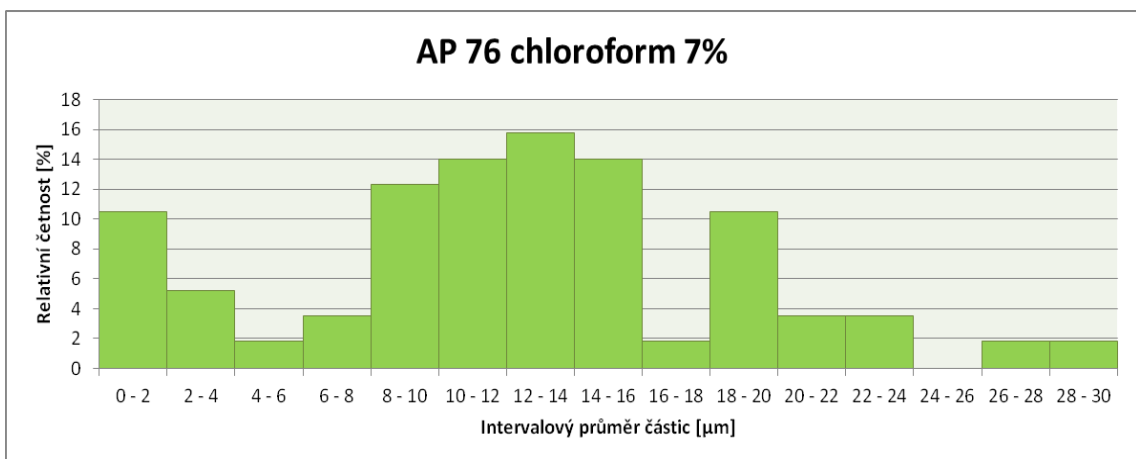
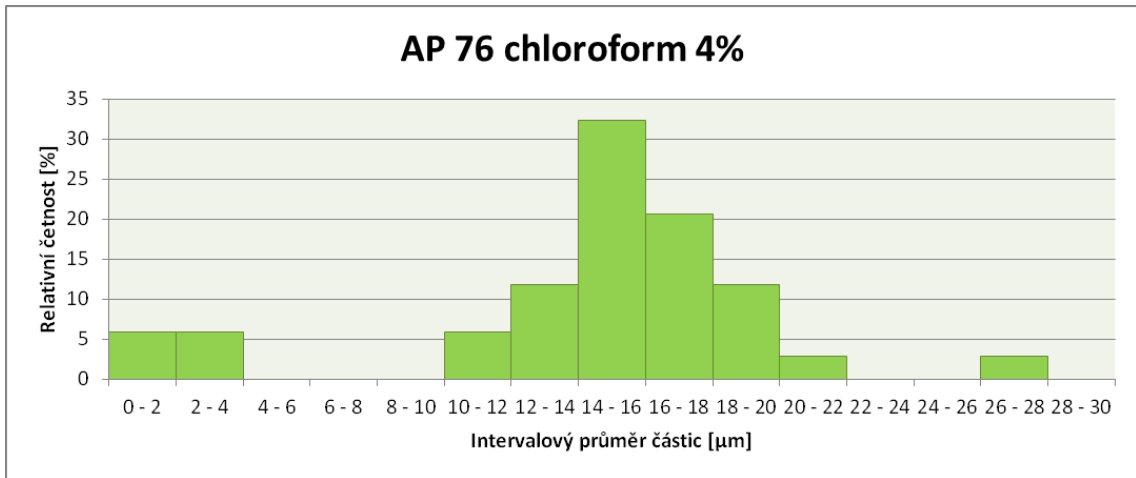
D1 – Histogramy průměru částic pro AP 24 v chloroformu



D2 – Histogramy průměru částic pro AP 39 v chloroformu

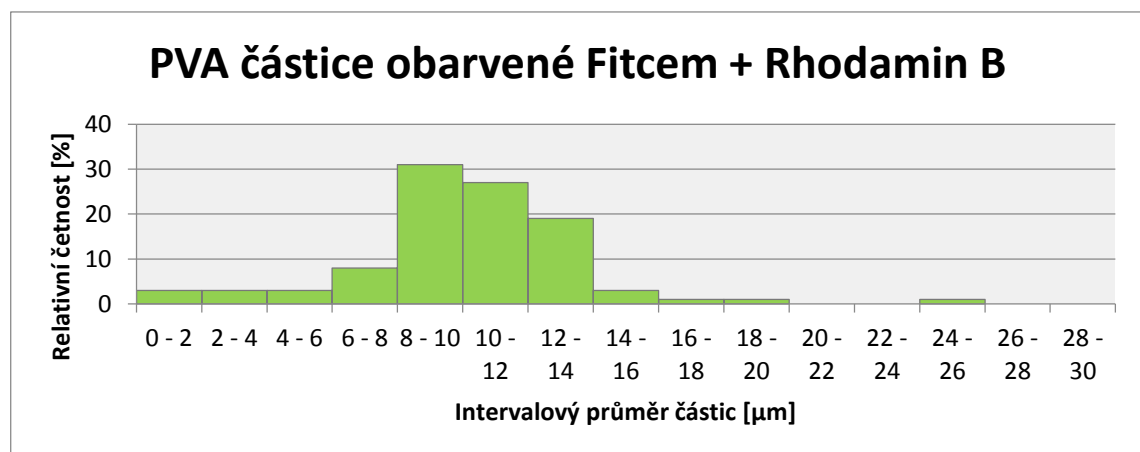
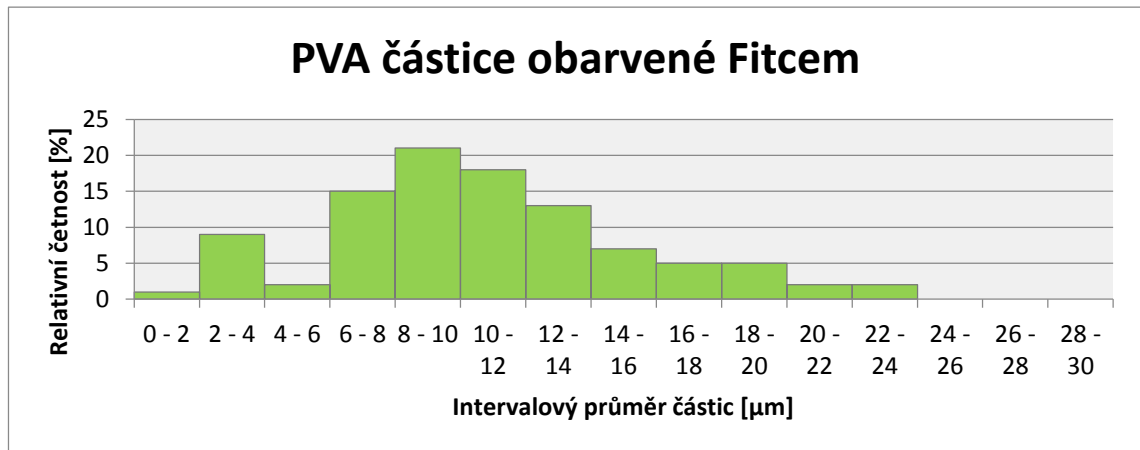


D3 – Histogramy průměru částic pro AP 76 v chloroformu



## Příloha E

E1 – Histogramy průměru vyrobených částic pomocí elektrosprayingu na volnou hladinu v kombinaci s elektrosprayingem z injekční stříkačky



E2 – Histogram průměru PVA částice nasprejovaných na volné hladině

