

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2018

Ing. Jana Oborná



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

ŘÍZENÉ UVOLŇOVÁNÍ LÉČIV Z BIODEGRADABILNÍCH HYDROGELŮ.

CONTROLLED DRUG RELEASE FROM BIODEGRADABLE HYDROGELS.

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Jana Oborná

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

BRNO 2018

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studentka: **Ing. Jana Oborná**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studijní obor: Chemie životního prostředí
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název dizertační práce:

Řízené uvolňování léčiv z biodegradabilních hydrogelů.

Zadání dizertační práce:

Literární rešerše na téma řízené uvolňování léčiv, „chytré“ kopolymery, mechanismus a profil uvolňování léčivých látek.

Volba modelových léčiv rozdílného lipofilního charakteru.

Vytvoření a optimalizace LC/MS metod pro stanovení vybraných léčiv.

Výběr PLGA–PEG–PLGA a ITA/PLGA–PEG–PLGA/ITA kopolymerů s vhodnými poměry PLGA/PEG s podmínkou tvorby gelu při teplotě 37 °C.

Ověření vhodnosti kinetického modelu, který byl vybrán na základě literární rešerše pro popis uvolňování léčiva.

Zhodnocení získaných výsledků.

Termín odevzdání dizertační práce: 23.7.2018

Ing. Jana Oborná
student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
vedoucí práce

doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 19.9.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na řízené uvolňování léčiv z biodegradabilních amfifilních hydrogelů na bázi kopolymeru hydrofobní kyseliny poly(mléčné) a poly(glykolové) a hydrofilního polyethylenglykolu (PLGA-PEG-PLGA, ABA) a jeho modifikace anhydridem kyseliny itakonové (ITA). Výsledný α,ω -itakonyl(PLGA-PEG-PLGA) je označován v této práci jako ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA neboli ITA/ABA/ITA. Kyselina itakonová poskytuje reaktivní dvojné vazby a funkční karboxylovou skupinu na koncích řetězce PLGA-PEG-PLGA kopolymeru, čímž se modifikovaný kopolymer ITA/ABA/ITA stává méně hydrofobním a nabízí tak možnost tvořit nosič i pro léčivé látky hydrofilní povahy. Tyto funkční kopolymery jsou citlivé na teplo a změnou vnějšího prostředí (teploty) vykazují sol-gel fázový přechod díky vzniku micelární struktury gelu. Léčivé látky tak mohou být smíchány s kopolymerem, který je v nízké viskózní fázi (sol fáze) a následně tato směs může být injektována do těla pacienta na cílové místo, kde vytvoří gel při 37 °C. Tento hydrogel se stává zásobníkem léčivé látky, odkud se postupně substance uvolňuje. Predikce trendu uvolňování léčivé látky z hydrogelu je účinný nástroj pro zjištění frekvence podávání, zvýšení účinnosti léčiva a také pro zjištění nežádoucích účinků spojené s dávkováním.

Jako hydrofilní modelové léčivo bylo vybráno analgetikum paracetamol. Zástupce hydrofobního modelového léčiva bylo použito sulfonamidové antibiotikum sulfathiazol. Přidání léčivé látky do roztoku kopolymeru mělo následně významný vliv na výslednou tuhost hydrogelu. Vliv na tuhost hydrogelu a následnou stabilitu systému mělo použití nanohydroxyapatitu i různých rozpouštědel resp. inkubačních médií. Řízené uvolňování léčiv probíhalo v simulovaných podmínkách lidského těla.

Tato práce se zabývá ověřením Korsmeyer-Peppasova modelu vhodného pro popis uvolňování hydrofobního modelového léčiva sulfathiazolu z hydrogelu ABA i ITA/ABA/ITA. Naopak bylo prokázáno, že Korsmeyer-Peppasův model není vhodný pro popis uvolňování hydrofilního léčiva paracetamolu z ABA hydrogelů, proto byl navržen nový regresní model, vhodný jak pro pufované simulované prostředí, tak i pro vodu. Tento model byl také ověřen za velmi těsný i pro popis uvolňování sulfathiazolu i paracetamolu z kompozitního materiálu připraveného z ABA hydrogelu a nanohydroxyapatitu.

KLÍČOVÁ SLOVA

hydrogel, PLGA-PEG-PLGA kopolymer, profil uvolňování léčiv, léčiva, Korsmeyer-Peppasův model

ABSTRACT

This dissertation is focused on the controlled release of drugs from a biodegradable amphiphilic hydrogel based on hydrophobic poly(lactic acid), poly(glycolic acid) and hydrophilic poly(ethylene glycol) (PLGA-PEG-PLGA, ABA) and its modification with itaconic anhydride (ITA). The resulting α,ω -itaconyl(PLGA-PEG-PLGA) copolymer is referred to as ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA or ITA/ABA/ITA. Itaconic acid provides reactive double bonds and a functional carboxyl group at the ends of the PLGA-PEG-PLGA copolymer chain, thereby rendering the modified ITA/ABA/ITA copolymer less hydrophobic and offering the possibility of forming a carrier for hydrophilic drug substances. These functional copolymers are thermosensitive and change in the external environment (e.g. temperature) causes a sol-gel phase transition due to the formation of micellar structure. The bioactive substances can thus be mixed with a copolymer which is in a low viscous phase (sol phase) and subsequently the mixture can be injected into patient's body at the target site where it forms a gel at 37 °C. This hydrogel becomes a drug depot, which gradually releases the active substance. Prediction of the substance's release profile from the hydrogel is an effective tool to determine the frequency of administration, potentially enhancing efficacy, and assessment of side effects associated with dosing.

The analgesic paracetamol and the sulfonamide antibiotic sulfathiazole were used as model drugs, representing hydrophilic and hydrophobic substances, respectively. The active substances had a significant effect on the resulting hydrogel stiffness. Type of solvent, incubation medium and nanohydroxyapatite also influenced on the gel stiffness and subsequent stability of the hydrogel-drug system. Controlled release of drugs took place in simulated conditions of the human body.

Verification of Korsmeyer-Peppas (KP) drug-release model is also discussed in this thesis. The KP model was found suitable for simulating the release of sulfathiazole from ABA and ITA/ABA/ITA hydrogels. On the contrary, the performance of KP model was not suitable for describing the release of paracetamol from the ABA hydrogels. Therefore, a new regression model suitable for both buffered simulated media and water has been proposed. The proposed model fitted better the release of both sulfathiazole and paracetamol from composite material prepared from ABA hydrogel and nanohydroxyapatite.

KEYWORDS

hydrogel, PLGA-PEG-PLGA copolymer, drug release profile, drugs, Korsmeyer-Peppas model

OBORNÁ, J. *Řízené uvolňování léčiv z biodegradabilních hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 117 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Ráda bych poděkovala především své rodině za finanční podporu během doktorského studia, bez níž by dokončení tohoto studia nebylo možné. Dále bych chtěla poděkovat svým blízkým přátelům a kolegům za psychickou podporu během studií i při dokončování dizertační práce.

Moje velké díky patří i Dr. Stuartu Gibbovi za umožnění studijní stáže v Environmental Research Institute, Dr. Marku Taggartovi za cenné rady během zpracování praktické části.

Tato práce by nevznikla bez příspěví Ing. Ivany Chamradové Ph.D., která připravila veškeré studované kopolymery a též jí náleží mé poděkování. Také děkuji pracovníkům Ústavu materiálů za odborné rady v oblasti polymerní chemie.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Miladě Vávrové CSc. za její čas věnovaný této práci a také za umožnění zpracování této odborné práce na Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Vývoj lékových forem.....	11
2.1.1 Lékové formy s prodlouženým uvolňováním	11
2.1.2 Lékové formy s kontrolovaným uvolňováním léčiva	12
2.2 Polymerní systémy pro řízené uvolňování léčiv	14
2.2.1 Uvolňování léčiv pomocí difúze	14
2.2.2 Chemicky řízené uvolňování	15
2.2.3 Rozpouštědlem aktivované systémy	15
2.2.4 Systémy založené na vnější aktivaci nebo modulaci	15
2.3 Hydrogely	16
2.3.1 Vznik hydrogelu	16
2.3.2 Dělení hydrogelů z hlediska reakce na změnu vnějších podmínek	17
2.3.2.1 Hydrogely citlivé na pH	17
2.3.2.2 Hydrogely citlivé na elektrické pole.....	18
2.3.2.3 Hydrogely citlivé na světlo	19
2.3.2.4 Hydrogely citlivé na teplo	19
2.4 Biodegradabilní hydrogely	19
2.4.1 Biodegradabilní hydrogely přírodního původu.....	19
2.4.2 Biodegradabilní syntetické hydrogely	20
2.4.2.1 Hydrogely založené na PEGu a polyfosfazenech.....	20
2.4.2.2 Hydrogely založené na PEGu a poly(trimethylenkarbonátu).....	21
2.5 Hydrogely na bázi polyethylenglykolu a polyesterů.....	21
2.5.1 PEG/PLGA amfifilní blokové kopolymery	21
2.5.2 Charakteristika PEG-PLGA-PEG	22
2.5.3 Charakteristika PLGA-PEG-PLGA	23
2.5.4 Využití PLGA-PEG-PLGA při uvolňování léčivých látek.....	23
2.5.5 Využití ITA/ABA/ITA kopolymerů pro biomedicínské aplikace	25
2.6 Základní požadavky na ideální léčivo, nosič a testování bezpečnosti	25
2.7 Mechanismus uvolňování léčiv z polymerní matrice.....	26
2.8 Degradace ABA a ITA/ABA/ITA.....	27
2.8.1 Degradace segmentu PLGA.....	28
2.8.2 Charakteristika monomerů	29
2.8.2.1 Polyethylenglykol	29
2.8.2.2 Kyselina mléčná.....	30
2.8.2.3 Kyselina glykolová	31
2.8.2.4 Kyselina itakonová	32
2.9 Profil uvolňování léčivých látek.....	32
2.9.1 Výběr kinetického modelu pro uvolňování léčiv	34
2.9.2 Příprava systémů.....	35
2.9.3 Charakteristika použitých léčiv	35
2.9.3.1 Paracetamol.....	35
2.9.3.2 Sulfathiazol.....	36
2.10 Finální stanovení léčiv	36
3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	39
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1 Přístroje, zařízení, software	40
4.1.1 Přístroje použité k přípravě vzorků	40

4.1.2	Software pro zpracování a prezentaci dat	40
4.2	Použité chemikálie a standardy	40
4.2.1	Chemikálie	40
4.2.2	Standardy	41
4.2.3	Charakterizace kopolymerů použitých jako nosiče pro léčiva	41
4.2.3.1	PLGA-PEG-PLGA kopolymer	41
4.2.3.2	ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA kopolymer	41
4.2.4	Sledované analyty	41
4.2.4.1	Sulfathiazol	41
4.2.4.2	Paracetamol	42
4.3	Design testu	42
4.4	Složení rozpouštědel/inkubačních médií	43
4.5	Příprava vzorků pro sledování uvolňování léčiv	43
4.5.1	Příprava vzorků pro sledování uvolňování paracetamolu	43
4.5.2	Příprava vzorků pro sledování uvolňování sulfathiazolu	43
4.5.3	LC/MS finální podmínky pro stanovení léčiv	44
4.6	Dynamická reologická analýza	46
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
5.1	Stabilita hydrogelů s testovanými léčivy	47
5.1.1	Stabilita hydrogelů s paracetamolem	47
5.1.2	Stabilita hydrogelů s hydrofobním léčivem sulfathiazolem (STA)	49
5.1.3	Stabilita ABA hydrogelů s léčivy a nanohydroxyapatitem (nHAp)	51
5.2	Ověření vhodnosti výběru Korsmeyer-Peppasova model pro uvolňování hydrofobních léčiv	55
5.2.1	Postup ověření vhodnosti Korsmeyer-Peppasova modelu	55
5.2.2	Návrh matematického modelu pro profil uvolňování léčiv	66
6	ZÁVĚR	78
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	80
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	99
	SEZNAM OBRÁZKŮ	101
	SEZNAM TABULEK	103
	SEZNAM PŘÍLOH	104
	PŘÍLOHY	105
	ŽIVOTOPIS AUTORA	112

1 ÚVOD

Lékové systémy zaměřené na kontrolované uvolňování léčiv umožňují efektivněji využívat léčivé látky a snížit četnost a celkové množství podávaného léčiva. Tímto lze dosáhnout zvýšení komfortu pacientů, snížení množství nežádoucích účinků a celkové spotřeby léčiv, což se může pozitivně promítnout při terapii široké škály různých onemocnění a také na zatížení životního prostředí léčivy. Z uvedených důvodů se v posledních letech na toto téma zaměřuje stále více odborných studií [1-8]. Systémy s kontrolovaným uvolňováním léčiv by měly dosáhnout delšího farmakologického efektu (dny, měsíce, roky) bez významné fluktuační koncentrace léčivé substance v krevní plazmě, jak je tomu u běžného podávání nízkomolekulárních léčiv [9]. Ideální lékový systém s řízeným uvolňováním by měl uvolňovat aktivní substanci tak, aby bylo téměř okamžitě dosaženo terapeutické koncentrace a nadále již uvolňovat jen potřebné množství léčiva pro udržení této koncentrace podle kinetiky nultého řádu [10].

V průběhu let se ve výzkumu zaměřeného na řízené uvolňování léčiv se stále více začaly využívat biodegradabilní syntetické (ko)polymery. Jejich výhodou ve srovnání s přírodními polymery je možnost navrhnout jejich složení, mechanické vlastnosti a kinetiku rozpadu samotného (ko)polymeru [10]. Léčivo navázané na polymerní nosič může v organismu cirkulovat řádově mnohem delší dobu díky vysoké molekulové hmotnosti a struktuře polymerního nosiče [9]. Jako velmi atraktivní se ukázaly tzv. „chytré“ (ko)polymery, které jsou schopny reagovat na změnu vnějších podmínek okolí změnou svých fyzikálně-chemických vlastností. Mezi tzv. „chytré“ polymery citlivé na teplo jsou řazeny i kopolymery na bázi hydrofobní kyseliny poly(mléčné), poly(glykolové) a hydrofilního polyethylenglykolu (PLGA-PEG-PLGA, ABA), které ve vodném prostředí tvoří hydrogel. Tyto amfifilní termocitlivé kopolymery jsou velmi atraktivní pro biomedicínské aplikace díky sol-gel fázovým přechodům, ke kterým dochází vlivem změny okolní teploty. Léčivá látka tak může být přidána do nízko viskózní fáze (sol fáze) za běžné laboratorní teploty a následně může být roztok vpraven do těla pacienta, kde se ze solu stane hydrogel. Ve srovnání s jinými syntetickými biomateriály, biodegradabilní hydrogely připomínají díky svým fyzikálním vlastnostem, relativně vysokému obsahu vody a měkké „gumové“ konzistenci živé tkáně [11].

V dnešní době jsou již komerčně dostupné produkty na bázi PLGA-PEG-PLGA kopolymerů pod názvy ReGel[®] a OncoGel[®]. Tyto tepelně citlivé kopolymery jsou využívány a nadále studovány k řízenému uvolňování léčivých látek hydrofobní povahy (paclitaxel, doxorubicin, indomethacin), ale i pro vysokomolekulární aktivní substance hydrofilní povahy (inzulín, exenatid). Vlivem změny okolní teploty PLGA-PEG-PLGA triblokové kopolymery ve vodném prostředí vytvářejí micelární struktury s hydrofobním (PLGA) jádrem a hydrofilním povrchem polyethylenglykolu (PEG). Hydrofilní léčiva vykazují převážně afinitu k hydrofilnímu PEGu a jejich uvolňování z matrice hydrogelu se děje pomocí prosté difúze. Naopak látky lipofilního charakteru vykazují afinitu k hydrofobnímu PLGA jádru. Mechanismus uvolňování hydrofobních léčiv tak zahrnuje erozi/degradaci hydrogelové matrice a následnou difúzi [1].

I přes nesporné výhody vykazují ABA blokové kopolymery několik zásadních nedostatků. Ve své struktuře obsahují pouze jeden typ funkčních skupin (–OH skupiny), které tento materiál limitují v dalších reakcích s biologicky aktivními látkami [12]. V roce 2010 byla Michlovskou a kol. publikována studie zabývající se modifikací PLGA-PEG-PLGA

kopolymeru pomocí anhydridu kyseliny itakonové. Kyselina itakonová poskytuje řetězci funkční karboxylovou skupinu a reaktivní dvojně vazby pro možnost případného chemického zesílení [13]. Množstvím navázané itakonové kyseliny na řetězec ABA kopolymeru lze ovlivnit celkovou hydrofobicitu blokového kopolymeru [13] a také následnou stabilitu ITA/ABA/ITA hydrogelů ve vodném prostředí [14; 12].

Dalším nedostatkem PLGA-PEG-PLGA fyzikálních hydrogelů je jejich stabilita. Stabilita ABA fyzikálních hydrogelů pro uvolňování léčivých látek byla prozatím pozorována řádově v hodinách až týdnech [2-8], což nemusí být pro terapii některých onemocnění dostačující. Prodloužení uvolňování léčivé látky lze vyřešit enkapsulací bioaktivní substance do „core-shell“ částic kopolymeru a vytvořit tak systém, který substanci uvolňuje v několika stupních během rozpadu samotných částic [2]. Liberaci léčivé látky lze také prodloužit přípravou kompozitních materiálů obsahujících hydrofobní biokompatibilní nanočástice, které se zabudovávají do hydrofobního PLGA jádra během tvorby micelárních struktur a zvyšují tím celkovou tuhost a stabilitu výsledného kompozitu. Tepelně citlivých vstřikovatelných kompozitních materiálů na bázi ABA kopolymerů a nanočástic hydroxyapatitu lze úspěšně využít například při léčbě tříštivých fraktur kostí [15].

Předkládaná dizertační práce se zabývá sledováním uvolňování léčiv z biodegradabilních fyzikálních hydrogelů založených na termosensitivních kopolymerech PLGA-PEG-PLGA a ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA tvořících gel při teplotě lidského těla 37 °C. Hlavním cílem práce bylo ověřit, zda modifikace kopolymeru kyselinou itakonovou má významný vliv na profil uvolňování léčivých látek různého lipofilního charakteru z fyzikálních ITA/ABA/ITA hydrogelů a jejich potenciální využití, jako nosičů hydrofilních nízkomolekulárních léčivých látek. Fyzikálně přidaná léčiva měla významný vliv na celkovou stabilitu systému hydrogel-léčivo v různých prostředích. Významný vliv na prodloužení liberace léčivých látek mělo i přidání nanohydroxyapatitu do systému ABA hydrogel-léčivo.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vývoj lékových forem

Způsob úpravy léčiva do formy vhodné pro léčebné použití zaštiťuje pojem léková forma. Jednou z nejstarších aplikačních dávkovaných forem jsou pilulky, které se připravovaly již ve 2. stol. př. Kristem z tzv. pilulkoviny. Pilulkovina se dále zpracovávala řezáním, tvarováním a sušením. Po objevu krevního oběhu, v roce 1628, kdy William Harvey publikoval své dílo „Anatomické pojednání o pohybu srdce a krve“ se léky začaly podávat parenterálně.

Dynamický rozvoj vědních oborů v 19. století přinesl vynález injekční stříkačky s jehlou, a tak se léky začaly aplikovat i subkutánně. Na počátku 20. století se začala rozvíjet průmyslová výroba léčivých látek a přípravků. Přes nesporná negativa přinesly obě světové války řadu nově vyvinutých léčiv, zejména pak antibiotik. Rozvíjí se také farmakokinetika, a to díky aplikaci moderních analytických metod a zavádění výpočetní techniky do farmakologie. S jejím rozvojem úzce souvisí vývoj nových lékových forem. Roste význam lékové formy tj. zpracování léčivé látky do léčivého přípravku a zájem o lékové formy s prodlouženým a řízeným uvolňováním a účinkem léčiva. K dosavadním lékovým formám přibýly retardované tablety, mikropelety, aerodisperze (aerosoly, spreje) a pěny, později také transdermální přípravky, z nichž se léčivo vstřebává kůží a dosahuje se jeho dlouhodobé terapeutické koncentrace v krvi [16].

2.1.1 Lékové formy s prodlouženým uvolňováním

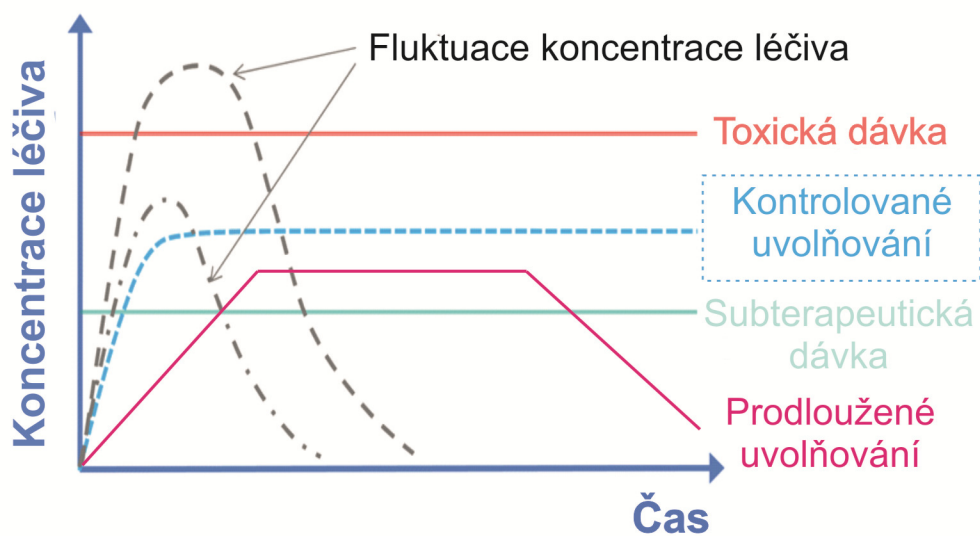
Vývoj nových aplikačních forem významně ovlivnil rozvoj chemie polymerů. V roce 1976 německý makromolekulární chemik Helmut Ringsdorf přišel s myšlenkou použít pro transport léčiv syntetické polymery rozpustné ve vodě. Do této doby se musela nízkomolekulární léčiva podávat velmi často v opakovaných dávkách tak, aby léčivo bylo v organismu v terapeutické koncentraci [9, 17]. Pokud je dávka vyšší než terapeutická koncentrace, léčivá látka je pro organismus toxická. Druhým extrémem je naopak subterapeutická dávka, která nemá požadovaný léčebný účinek [18]. Polymery umožnily díky své struktuře a daleko vyšší molekulové hmotnosti to, že nízkomolekulární léčivo navázané na polymer jako na svůj nosič, může cirkulovat v organismu mnohem déle řádově hodiny až dny. Dobu cirkulace ovlivňuje struktura polymerního nosiče [9]. Vzniklá nová léková forma s prodlouženým (retardovaným) uvolňováním léčiva snižuje frekvenci dávkování léku a s tím související výkyvy hladiny léčiva v krvi. Tato léková forma také vykazuje menší výskyt nežádoucích účinků, čímž zlepšuje léčbu pacienta. S vývojem lékové formy s prodlouženým uvolňováním se objevuje pojem lékový systém, který je charakterizován dávkou léčiva a také především konstantní definovanou rychlostí, kterou se léčivá látka uvolňuje po určitý časový úsek [16].

Léková forma s prodlouženým uvolňováním proto poskytuje léčivou látku po delší dobu, např. hodiny, avšak stále vyžaduje opakované podávání. Retardované uvolňování není řízeno kinetikou prvního řádu a rychlost uvolňování je silně ovlivněna vnějšími podmínkami, např. pH žaludku. Mezi lékové formy s prodlouženým uvolňováním patří mimo jiné transdermální náplasti, kapsle s pulzním uvolňovacím systémem Pulsincap apod. [16].

2.1.2 Lékové formy s kontrolovaným uvolňováním léčiva

Léková forma s řízeným (kontrolovaným) uvolňováním představuje lékovou formu tzv. třetí generace [19]. Tato forma udržuje konstantní hladinu léčivé látky v krevní plazmě nebo tkáni pomocí kinetiky prvního řádu po dobu několika dní až měsíců [18].

Léková forma s řízením uvolňováním léčiva umožňuje uvolnění léčiva na cílovém místě. To znamená, že polymerní systém lze nasměrovat v organismu do daného léčeného místa, kde se účinná látka uvolní v aktivní podobě [18]. Pro jiné, zdravé části organismu tím výrazně klesá toxicita léčivé látky, a to o jeden až dva řády. Díky tomu, lze podávat daleko vyšší dávky, které mají lepší účinek na cílovou tkáň [9].



Obrázek 1 – Schématické znázornění fluktuace koncentrace léčiva při konvenčním podávání v porovnání s kontrolovaným a prodlouženým uvolňováním [18]

Tabulka 1: Přehled komerčně dostupných produktů pro uvolňování léčivých látek pomocí řízeného uvolňování [6, 11, 20].

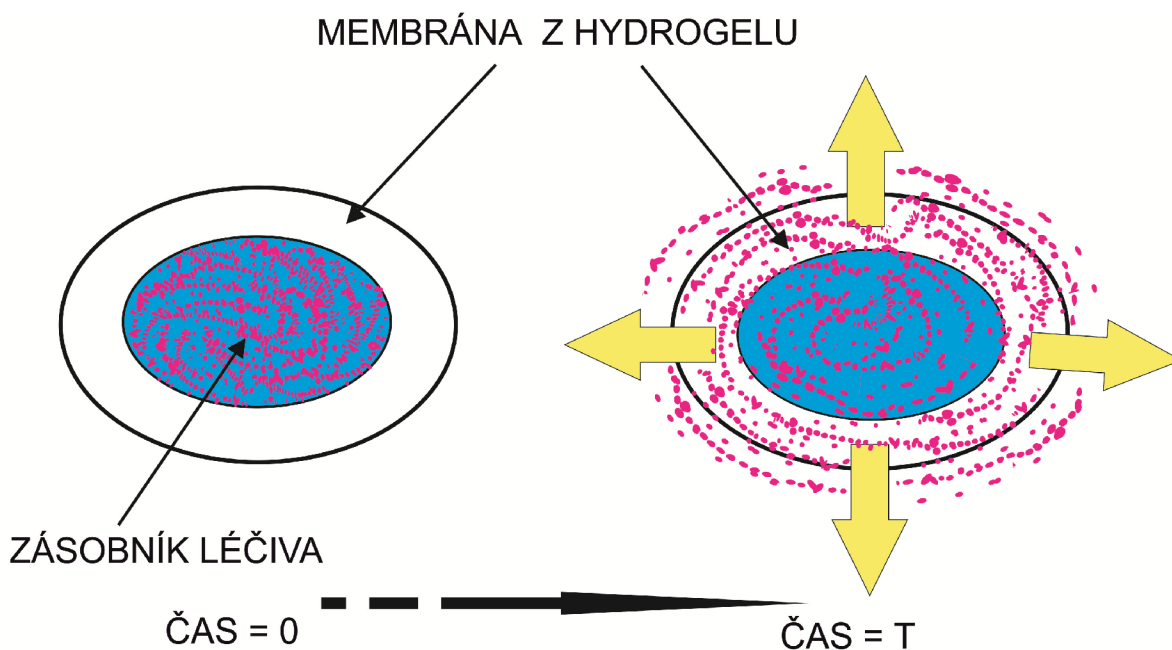
Značka	Léčivo	Polymer	Léková forma	Podání	Doba uvolňování
GLIADEL®	carmustin	1,3-bis-(p-carboxyphenoxy)propan a kyselina sebaková	tablety	intrakraniální implantace	6 – 8 týdnů
OZURDEX®	dexamethason	PLGA	implantát	intravitreální implantace	6 měsíců
IMPLANO®	progestagen etonogestrelu	kopolymer ethylvinylacetátu	tyčinka	subdermální implantace	3 roky
RETISERT®	fluocinolon acetonidu	polyvinylalkohol	tablety zapouzdřené v silikonovém obalu	intravitreální implantace	1 – 3 roky
Vitrasert®	ganciclovir	polyvinylalkohol a polyethylvinyl acetát	implantát	intravitreální implantace	32 týdnů
ZOLADEX®	goserelinum	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové	implantát	subkutánní implantace	3 měsíce
Viadur®	leuprorelin	polyurethan	titanový zásobník	subkutánní implantace	1 rok
Lupron Depot®	leuprorelin	PLGA a PLA	injekce	intramuskulárně	3 měsíce
DepoDur®	morfium	PLGA a PLA	injekce	epidurálně	48 hodin
Vivitrol®	naltrexon	PLG	injekce	intramuskulárně	1 měsíc
Sandostatin LAR® Depo	ocreotid	glykolová a <i>D,L</i> -mléčná kyselina	injekce	intramuskulárně	1 měsíc
RISPERDAL® CONSTA	risperidon	PLGA	injekce	intramuskulárně	2 týdny
Nutropin Depot®	somatropin	PLG	injekce	subkutánně	2 – 4 týdny
Testopel® Pellets	testosteron	polyvinylpyrolidon	implantát	subkutánní implantace	3–6 měsíců
OncoGel®	paclitaxel	PLGA-PEG-PLGA	injekce	intralézionální	6 týdnů
ReGel®	inzulin	PLGA-PEG-PLGA	injekce	subkutánně	14 dnů

2.2 Polymerní systémy pro řízené uvolňování léčiv

Technologie řízeného uvolňování léčiv se vyvíjela mnoha různými způsoby. Za její teoretický základ lze považovat dodávání léčiva do určitého místa, a to po definovaný časový úsek. Kinetika uvolňování léčiva by měla probíhat podle nultého řádu tak, aby byl maximalizován farmakologický efekt a zároveň minimalizovány vedlejší účinky, které mohou být způsobeny fluktuací koncentrace léčiva v krevní plazmě nad hranici terapeutického indexu léčiva. Kinetiky nultého řádu lze dosáhnout uvolňováním z polymerní matrice několika způsoby: difúzí, chemicky řízeným uvolňováním, použitím systémů aktivovaných rozpouštědlem nebo systémů založených na vnější aktivaci a modulaci [21].

2.2.1 Uvolňování léčiv pomocí difúze

Jeden z konvenčních způsobů je například uvolňování léčiva pomocí difúze přes polymerní bariéru, která určuje rychlost uvolňování léčivé látky. Mezi zásobní systémy, které uvolňují léčivo pomocí prosté difúze, patří lékové formy, jako jsou kapsle (tobolky), mikrokapsle, vlákna s dutou strukturou a membrány. Nejpoužívanější polymery pro difúzní uvolňování léčiva jsou silikonový kaučuk, poly(ethylvinylacetát) a některé typy hydrogelů.



Obrázek 2 – Uvolňování léčiva pomocí difúze ze zásobníku tvořeného polymerem [21]

Dalším typem pro řízené uvolňování léčiv pomocí difúze je systém tvořený polymerem, který je stabilní vůči erozi/degradaci. Molekuly léčivé látky jsou rovnoměrně rozloženy v matrici polymeru a opět se uvolňují pomocí difúze. Výhodou tohoto systému je lépe kontrovaný proces uvolňování léčiva, a to díky parametrům použitého polymeru. Nevýhodou tohoto systému je opětovný zákrok, který musí pacient podstoupit pro odstranění léčivem vyčerpané polymerní matrice [22].

2.2.2 Chemicky řízené uvolňování

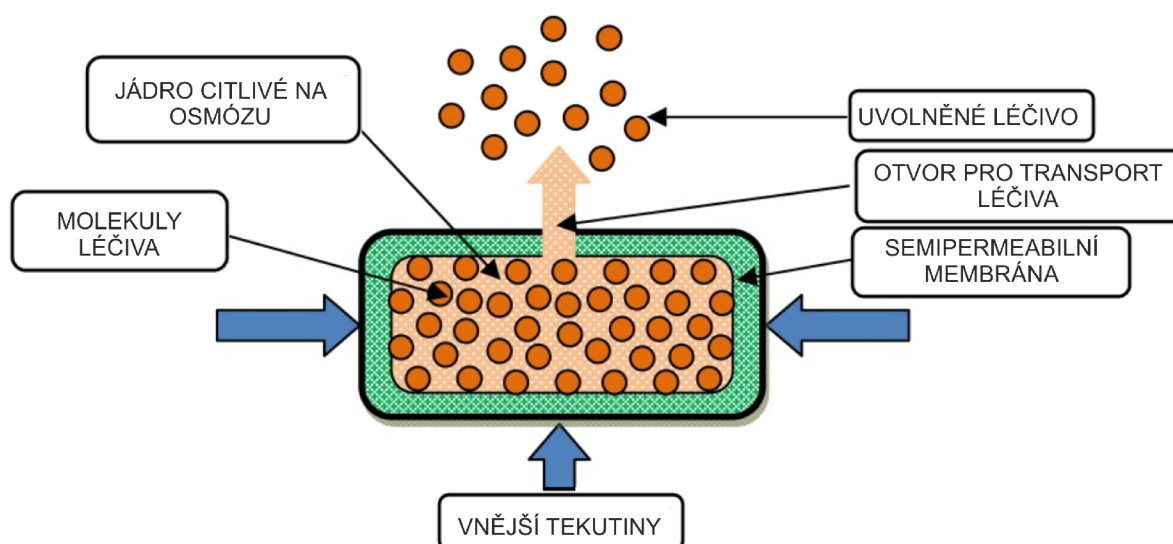
Dalším způsobem řízeného uvolňování léčiva je chemicky řízené uvolňování. Zde jsou zařazeny matricové systémy podléhající biodegradaci a biologické erozi. Během biodegradace polymerního systému dochází ke štěpení řetězců a k výraznému snížení molekulové hmotnosti polymeru. Naopak během biologické eroze matricového systému se molekulová hmotnost snižuje jen nepatrně. V obou případech je uvolňování léčiva řízeno celkovým rozpadem polymerního systému, který je zodpovědný za uvolňování léčiva. To znamená, že kontrolovaným rozpadem polymerního systému můžeme řídit kinetiku uvolňování samotného léčiva. Mezi chemicky řízené uvolňování patří i konjugáty léčiva a polymeru. Léčivo je navázáno na hlavní řetězec polymeru pomocí chemické vazby, která snadno podléhá hydrolýze nebo enzymatickému štěpení [23, 24].

2.2.3 Rozpouštědlem aktivované systémy

Třetí možností, jak řídit uvolňování léčiv, je pomocí rozpouštědla. Rozpouštědlem aktivované systémy podléhají botnání nebo osmóze.

Systémy řízené botnáním jsou založené na hydrofilních polymerech, které jsou schopny absorbovat velké množství vody, aniž by se zcela rozpustily. Během absorpce vody se léčivo postupně šíří směrem ven z polymerního systému. Rychlost uvolňování léčiva závisí na množství vody, která vstupuje do polymerního systému.

Osmózou kontrolované systémy jsou tvořeny semipermeabilní membránou. Přes tuto membránu je schopno proudit čisté rozpouštědlo, nebo rozpouštědlo s malým množstvím léčiva. Tok rozpouštědla je tak regulován směrem k zásobníku s léčivem. Tlak vyvolaný rozpouštědlem na zásobník nutí léčivo přestupovat přes póry v polymeru do rozpouštědla [25].



Obrázek 3 – Uvolňování léčiva ze systému kontrolovatelného pomocí osmózy [25]

2.2.4 Systémy založené na vnější aktivaci nebo modulaci

Systémy založené na vnější aktivaci nebo modulaci uvolňování léčiva, by měly v principu napodobovat udržování homeostáze živého organismu. Tyto systémy mohou být tvořeny zásobníkem léčiva, který je vybaven senzorem. Senzor reaguje na změnu vnějších signálů

a je tak schopen ovlivňovat celkové difúzní vlastnosti zásobníku léčiva nebo schéma uvolňování léčivé látky do okolního prostředí [26].

Při navrhování systémů s vnější aktivací nebo modulací lze použít přírodní i syntetické polymery, zejména ty, které jsou označovány jako „chytré“ polymery. Tyto „chytré“ polymery reagují i na malou změnu vnějších podmínek prostředí změnou svých fyzikálně-chemických vlastností a změnou svého chování, například změnou struktury nebo mechanické pevnosti. Jako vnější podněty jsou nejčastěji využívány fyzikální stimuly (teplota, světlo, elektrické a magnetické pole), chemické stimuly (pH, oxidačně-redukční potenciál, vliv iontů) a biologické stimuly (specifické molekuly jako jsou glukóza a enzymy). Stále častěji jsou syntetizovány polymery patřící do podskupiny hydrogelů, které reagují na dva odlišné podněty zároveň například na teplotu a pH [27].

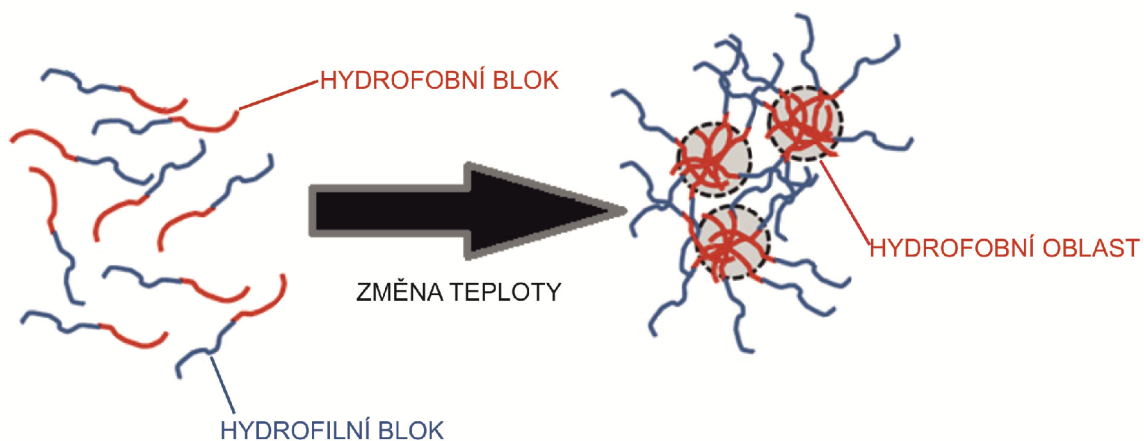
2.3 Hydrogely

Za hydrogely jsou označovány polymerní sítě hydrofilního nebo amfifilního charakteru, které jsou schopny absorbovat a udržet značné množství vody při zachování svého tvaru. Díky těmto vlastnostem nabývají na významu jako biomateriály pro potenciální biomedicínské aplikace. Hydrogely dnes již běžně nacházejí své uplatnění v lékařství a v biomedicině v podobě kontaktních čoček, hrudních implantátů, umělých orgánů, bio-lepidel a bio-senzorů. Farmacie postupně začíná využívat vlastností hydrogelů, a to ve formě obvazů na popáleniny a pro řízené uvolňování léčivých látek [21, 28].

2.3.1 Vznik hydrogelu

Existuje široká škála síťovacích technik, včetně UV-fotopolymerace a dalších chemických síťovacích metod. Tyto techniky zesíťování jsou vhodné pouze za předpokladu, že jsou důkladně odstraněny všechny toxické reagenty před samotnou aplikací hydrogelu. Odstranění často toxických síťovacích činidel je velmi obtížné a při jejich odstraňování může zároveň docházet k vyplavování samotné léčivé látky. Takto připravené hydrogely mají definované rozměry (dimenzionalitu) a vysokou pružnost, která vylučuje injekční podání, a proto musí být do těla implantovány, což je pro pacienta stresující. Tento problém lze obejít vytvořením gelu v podobě mikro- nebo nano-částicového systému. V některých aplikacích může být hydrogel vytvořen *in situ* (tj. *in vivo*), ale je nezbytné brát v úvahu potenciální rizika vznikající např. působením síťovacích činidel nebo expozicí UV-zářením. Jako alternativa k chemicky zesíťovaným hydrogelům lze použít fyzikální hydrogely. Fyzikálního zesíťování polymerních řetězců může být dosaženo změnou environmentálních podmínek (teplota, pH, iontová síla) a různými fyzikálně-chemickými interakcemi (hydrofobní interakce, vodíkové vazby, iontové interakce, Coulombovy interakce, stereoselektivní interakce atd.) [29].

Polymery tvořící gel na základě hydrofobních interakcí vykazují ve vodném prostředí tzv. sol-gel fázové chování (přechody). Tyto polymery jsou složeny z hydrofobní a hydrofilní části, a jsou tudíž nazývány jako amfifilní [11]. Míra hydrofobicity celého systému řídí gelaci. Amfifilní kopolymery jsou rozpustné ve vodě za nízkých teplot. Jakmile dojde ke zvýšení teploty, hydrofobní segmenty začínají agregovat za účelem minimalizace plochy kontaktu hydrofobního povrchu s velkým množstvím vody. Teplota gelace závisí na koncentraci polymeru, délce hydrofobního segmentu a chemické struktuře polymeru. Platí, že s rostoucí hydrofobicitou polymeru klesá gelační teplota celého systému [29].



Obrázek 4 – Vznik micel [29]

Pro zesítnění *in situ* gelujících polymerů byly široce zkoumány interakce mezi náboji. Výhoda tohoto gelujícího systému je, že biodegradace může nastat za pomoci iontů, které se běžně vyskytují v extracelulární tekutině. Zesítnění, nebo jeho opačný proces, tak může být vyvolán změnami pH, kdy dochází k ionizaci nebo protonizaci funkčních skupin, které způsobí gelaci. Hydrogel může vzniknout na základě interakcí nábojů mezi nabitým řetězcem polymeru a nabitou molekulou o nízké molekulové hmotnosti anebo dvěma řetězci polymerů s opačnými náboji [29].

Na vzniku injektovatelných hydrogelů se podílejí i vodíkové vazby. Směs dvou a více přírodních polymerů mohou vykazovat viskozitně-elastické vlastnosti, tj. připomínají gel, jako konvenční gelující syntetické polymery. Tento synergický efekt je obvykle výsledkem interakcí vodíkových vazeb mezi polymerními řetězci, který je posílen kompatibilitou vzájemně působících polymerů. Pokud je tato směs přírodních polymerů vystavena tlaku, dochází k rozrušení vodíkových vazeb a systém se stává tekutým, což ulehčuje injekční aplikaci. Nevýhodou je aplikace těchto směsí přírodních polymerů *in vivo*, neboť dochází k velmi rychlému rozpadu v důsledku pronikání vody, což omezuje jejich použití při uvolňování léčivých látek [29].

Fyzikální hydrogely mohou vznikat i při vzájemném synergickém působení mezi polymerním řetězcem a malými molekulami stejného chemického složení lišícími se stereochemií [29].

Zatímco fyzikální hydrogely mají výhodu v tom, že tvoří gel *in vivo* bez nutnosti chemické modifikace nebo přidáním síťovacích činidel, mají také svá omezení. Stabilita gelu je přímo závislá na vlastnostech gelujících segmentů. Na základě experimentálního měření je pak nutné určit čas potřebný k vytvoření gelu a zároveň i k degradaci. Je obtížná jeho dodatečná chemická funkcionalizace a také unifikace velikosti pórů v polymerní síti hydrogelu [29].

2.3.2 Dělení hydrogelů z hlediska reakce na změnu vnějších podmínek

2.3.2.1 Hydrogely citlivé na pH

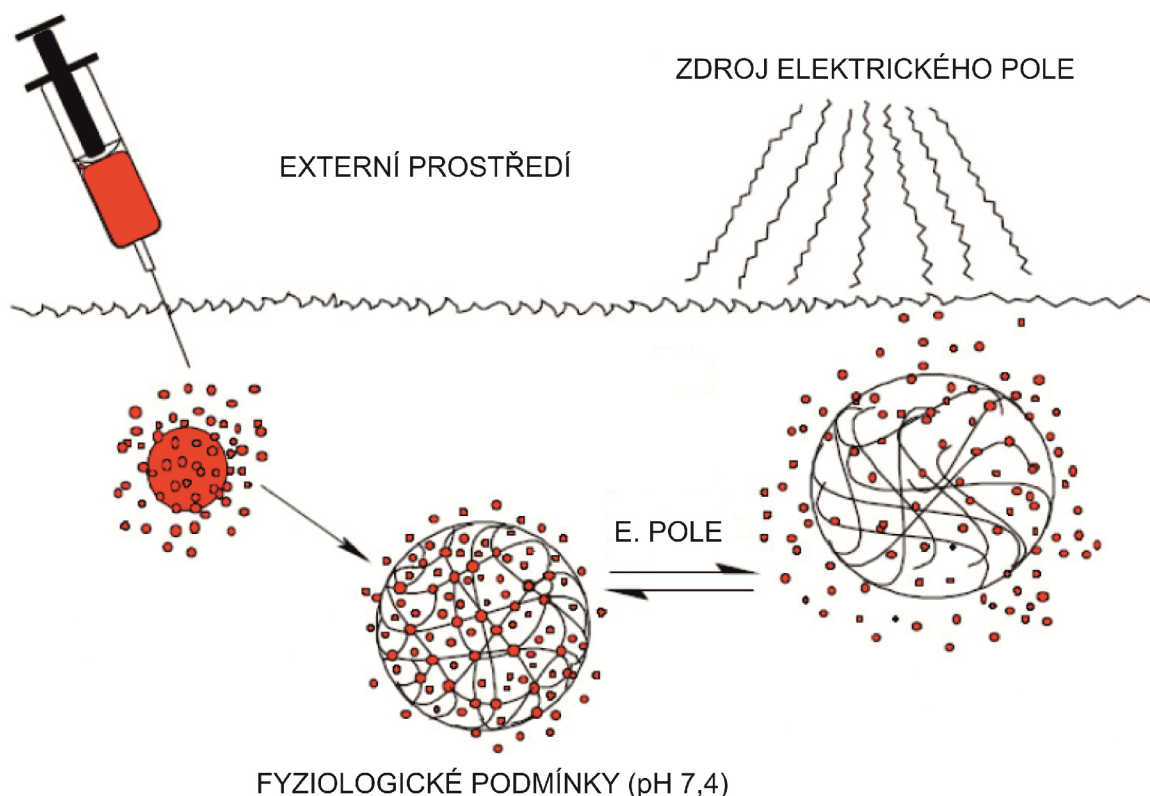
Polymery citlivé na změnu pH obsahují ve své struktuře ionizovatelné funkční skupiny. Mohou obsahovat kyselé karboxylové skupiny nebo bazické amino skupiny. Během vytváření postupného náboje podél řetězce polymeru způsobuje elektrostatické odpuzování těchto skupin zvýšení hydrodynamického objemu hydrogelu. Mezi zástupce hydrogelů

citlivých na pH patří kyselina polyakrylová, kyselina poly(methakrylová) (PMAA) a poly(*N,N*-dimethylaminoethylmethakrylamid).

Největší potenciál využití mají hydrogely citlivé na pH jako nosiče léčiv, které dané léčivo uvolní až při specifickém pH, například v žaludku nebo naopak až ve střevech. Další aplikace těchto hydrogelů by mohly být biosensory. Bohužel již je však známo, že syntetické polymery citlivé na pH nejsou biodegradabilní, a proto nemohou být použity přímo v lidském těle. Z tohoto důvodu se výzkum nyní zaměřuje na pH citlivé polymery, které jsou založené na bázi polysacharidů, polypeptidů a proteinů [30, 31].

2.3.2.2 Hydrogely citlivé na elektrické pole

Hydrogely citlivé na elektrický proud podléhají smršťování, botnání a ohýbání při aplikaci elektrického pole. Tyto hydrogely jsou vyrobeny z polyelektrolytů. Význam těchto hydrogelů spočívá v tom, že dovedou účinně převádět chemickou energii na energii mechanickou, stejně jako živé organismy. Proto hydrogely citlivé na elektrické pole mohou sloužit jako matrice pro růst umělých svalových tkání. Další uplatnění tohoto typu hydrogelu je při řízeném podávání léků. Výhodou takového systému je snadno ovladatelná rychlost uvolňování léčiva pomocí modulace elektrického signálu. Navíc hydrogely citlivé na elektrické pole fungují i v nepřítomnosti elektrolytů, což však může způsobovat problémy při aplikaci za běžných fyziologických podmínek. Významným benefitem hydrogelů citlivých na elektrické pole je v porovnání s jinými typy jejich rychlá reakce na změnu environmentálních podmínek [31].



Obrázek 5 – Schématické znázornění mechanismu uvolňování léčiva z hydrogelu pomocí aplikace vnějšího elektrického pole [32]

2.3.2.3 Hydrogely citlivé na světlo

Byly vytvořeny dva typy hydrogelů, jeden typ reagující pouze na ultrafialové záření a druhý typ citlivý pouze na oblast viditelného světla. Hydrogely citlivé na VIS oblast jsou mnohem bezpečnější a snadno ovladatelné pro možnou lékařskou aplikaci. Hlavní nevýhodou hydrogelů citlivých na světlo je jejich pomalá reakce na stimul. Ve většině případů dochází k přeměně světla na tepelnou energii, kterou musí předcházet restrukturalizace polymerního řetězce. Kromě toho, pokud jsou chromofory obsažené v hydrogelu vázány kovalentně na hlavní kostru polymeru, mohou se během cyklu smršťování a botnání uvolňovat ze struktury. Během několika cyklů by se potom takový polymer mohl stát inaktivním.

Hydrogely citlivé na světlo mohou být použity pro vývoj optických spínačů, tzv. switchů, zobrazovacích jednotek u monitorů a jako systém řízeného uvolňování léčiv, zejména pro orgán oko [31].

2.3.2.4 Hydrogely citlivé na teplo

Teplotu lze pokládat za nejrozšířenější používaný environmentální stimul pro tzv. „chytré“ polymery. Změna teploty je relativně snadno kontrolovatelná a rovněž snadno použitelná pro testy jak *in vitro*, tak *in vivo* [31, 33].

Společnou charakteristickou vlastností polymerů citlivých na teplo je přítomnost hydrofobní skupiny ve struktuře řetězce polymeru, jako je methyl-, ethyl- nebo propylskupina. Ve většině případů těchto polymerů se rozpustnost ve vodě zvyšuje se zvyšující se teplotou. Výjimku tvoří tzv. polymery s nízkou kritickou teplotou roztoku, jejichž rozpustnost ve vodě se snižuje se zvyšující se teplotou. Toto chování hydrogelů je popisováno v literatuře jako chování inverzní. Hydrogely s inverzním chováním mají hlavní řetězec polymeru vytvořený z mírně hydrofobních skupin, nebo obsahují směs hydrofilních a hydrofobních segmentů. Při nízké teplotě jsou vodíkové vazby mezi hydrofilními částmi řetězce a molekulami vody dominantní a vedou tak ke zlepšení rozpustnosti ve vodném prostředí. Během zahřívání vodného prostředí dochází k oslabení vodíkových vazeb a naopak k posílení vazeb mezi hydrofobními segmenty. Na základě tohoto chování hydrogelů citlivých na teplo potom dělíme hydrogely na tzv. negativně citlivé na teplo, pozitivně citlivé na teplo a na termoreverzibilní gely [31].

U těchto polymerů bylo pozorováno jejich chování ve vodném prostředí. Negativně citlivé hydrogely na teplo se smršťovaly se zvyšující se teplotou. Naopak pozitivně citlivé hydrogely, též označované jako hydrogely s horní kritickou teplotou roztoku, botnaly [34]. Toto chování hydrogelů je reverzibilní a odpovídá postupným změnám teploty okolního prostředí [31]. Díky schopnostem hydrogelů botnat nebo se smršťovat v důsledku změny okolní teploty tekutiny získaly značnou pozornost a využití ve farmaceutické oblasti. V rámci četných výzkumů byly studovány různé aplikace těchto hydrogelů, jako je regulace uvolňování léčivých látek a vývoj biosensorů [35, 36].

2.4 Biodegradabilní hydrogely

2.4.1 Biodegradabilní hydrogely přírodního původu

Přírodní biodegradabilní polymery (hydrogely) vznikají během přirozených metabolických procesů v průběhu růstu rostlin i živočichů. Do této skupiny patří především kolagen, želatina, chitin, chitosan, kyselina hyaluronová, fibrin. Jejich velkým kladem je, že téměř

nevyvolávají odezvu hostitelské tkáně, avšak jejich potenciál využití terminují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Nejrozšířenější využití našla želatina ve farmacii, kde se používá jako pojivo do tablet a k výrobě kapslí. Želatinové mikročástice jsou používány jako nosiče pro dodávání a lokální uvolňování buněk a růstových buněčných faktorů. Jsou vydávány odborné publikace, kde se zkoumá kombinace kolagenu, chitosanu a chitosanových nanočástic pro kontrolované uvolňování hydrofobních protinádorových léčiv jako je doxorubicin. Intenzivně je studována i kombinace chitosanu se syntetickými hydrogely pro řízené uvolňování polárních léčivých látek, jako jsou peptidy a proteiny. Pro kontrolované uvolňování léčivých látek jsou známy i další kombinace biodegradabilních hydrogelů přírodního původu jako je hyaluronan v kombinaci s chitosanem apod [30, 37, 38].

2.4.2 Biodegradabilní syntetické hydrogely

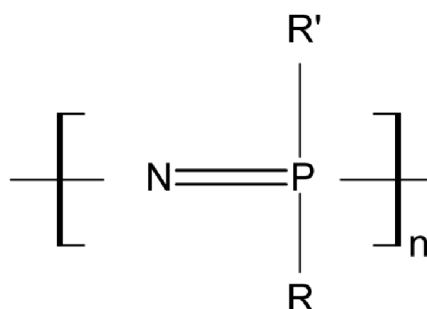
Kromě přírodních polymerů (hydrogelů), které mají tu výhodu, že ve většině případů nevzniká problém s toxicitou a biodegradací, se syntetizuje celá řada dalších polymerů nebo kopolymerů. Jejich hlavním benefitem je to, že se dají připravit konkrétní typy (ko)polymerů s požadovanými vlastnostmi.

2.4.2.1 Hydrogely založené na PEGu a polyfosfazenech

Polyfosfazeny zahrnují širokou škálu hybridních polymerů, jejichž skelet obsahuje jak anorganickou, tak organickou část. Charakteristické pro tyto struktury je střídání atomů dusíku a fosforu. Polymery založené na polyethylenglykolu a polyfosfazenech jsou připravovány pomocí síťování postranních řetězců gama zářením [39, 40].

Biodegradabilní polyfosfazeny obsahují hydrofobní aminokyseliny nebo bloky peptidů. Byly připraveny biodegradabilní polyfosfazeny obsahující *L*-isoleucin ethyl ester, *D,L*-isoleucin ethyl ester, *L*-valin ethyl ester nebo di-, tri- nebo oligopeptidy s postranními skupinami. Gelační chování tepelně citlivých polyfosfazenů je podmíněno strukturou oligopeptidů a hydrofobních postranních skupin. Rychlost degradace kopolymerů (hydrogelů) založených na polyfosfazenech lze kontrolovat zabudováním depepsipeptidu do struktury kopolymeru [41]. Depepsipeptidy jsou lineární nebo cyklické sloučeniny podobné peptidům, ve kterých je peptidická (amidická) vazba nahrazena vazbou esterovou. Takto upravené polyfosfazeny degradují mnohem rychleji, protože dochází k hydrolyze esterové vazby za vzniku karboxylových kyselin, které následně inicializují degradaci hydrofobních skupin aminokyselin [42].

Byly publikovány hydrogelové systémy založené na polyfosfazenech, u kterých bylo sledováno uvolňování doxorubicinu, paclitaxelu a insulínu [41].



Obrázek 6 – Strukturní vzorec polyfosfazenů

2.4.2.2 Hydrogely založené na PEGu a poly(trimethylenkarbonátu)

Atraktivita alifatických polykarbonátů spočívá v jejich degradaci, neboť jejich produkty rozkladu nejsou kyselé povahy a nezpůsobují tak aseptické záněty. *In vivo* je poly(trimethylkarbonát) (PTMC) rozkládán na alkoholy a oxid uhličitý. Tento amorfní biokompatibilní polymer podléhá degradaci mechanismem povrchové eroze. Velkým nedostatkem samotného PTMC je jeho slabá mechanická pevnost. Kombinace polyethylenglykolu a PTCM je využívána jako resorbovatelný materiál v biomedicíně avšak mohl by to být i slibný nosič léčivých látek [41, 43].

2.5 Hydrogely na bázi polyethylenglykolu a polyesterů

Pro vývoj nových biomateriálů je dnes intenzivně studována kombinace biokompatibilního polyethylenglykolu (PEG) a biodegradabilních alifatických polyesterů, které jsou rovněž biokompatibilní. Mezi alifatické polyestery patří polylaktidy (PLA), polyglykolidy (PGA), poly(ϵ -kaprolaktony) nebo poly[(R)-3-hydroxybutyrát]. Příčinou, proč výše zmíněné polymery podléhají tak dobře degradaci je právě jejich esterová vazba. Aby byl syntetický polymer biodegradabilní pomocí enzymatické hydrolýzy, musí být řetězec polymeru schopen se správně prostorově uspořádat do aktivního místa enzymu. To je také hlavní důvod, proč přízpůsobivý řetězec alifatických polyesterů podléhá biodegradaci, a to na rozdíl od aromatických polyesterů [41].

Kombinací PEG s polylaktidy a polyglykolidy vzniká celá řada různě se chovajících hydrogelů, které jsou detailně popsány v kapitole 2.5.1.

Poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) je hydrofobní, semikrystalický, biodegradabilní a biokompatibilní polymer. PCL se nacházejí v práškové formě, a tudíž se s nimi lépe pracuje v porovnání s kopolymerem na bázi poly(mléčné) a poly(glykolové) kyseliny (PLGA) a poly(L-mléčné) kyseliny (PLLA), které mají formu lepících past. PCL je využíván jako šicí materiál v lékařství, v implantační technice a jako nosič léčiv. Byla publikována studie, kde z diblokového kopolymeru založeného na PEG a PCL, byla uvolňována léčivá látka dexamethason. Triblokový kopolymer PCL-PEG-PCL je tepelně citlivý kopolymer při zavedení poly(β -aminoesteru) (PAE) do struktury blokového kopolymeru PAE-PCL-PEG-PCL-PAE se stává tento pentablok citlivý i na pH. Výše zmíněný pentablok byl použit při uvolňování inzulínu. Při smíchání PAE-PCL-PEG-PCL-PAE a inzulínu docházelo ke gelaci systému při nižších teplotách, neboť mezi inzulínem a pentablokem došlo k vytvoření iontového komplexu. Také byla pozorována degradace ve dvou stupních, kdy nejrychleji došlo k rozpadu poly(β -aminoesteru). Následovala pomalá degradace tribloku PCL-PEG-PCL [41].

2.5.1 PEG/PLGA amfifilní blokové kopolymery

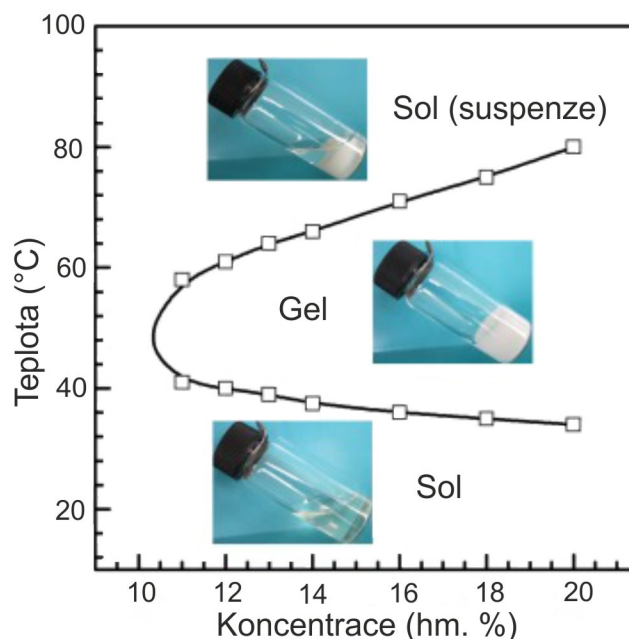
Kopolymerizace hydrofilního, biokompatibilního polyethylenglykolu (PEG) s biodegradabilními a zároveň biokompatibilními polyestery poskytuje velmi zajímavé systémy hydrogelů citlivých na teplo. PLGA/PEG blokové kopolymery začaly hrát významnou roli, neboť podléhají biodegradaci a mají mimořádnou schopnost enkapsulace (zapouzdření, obalení) a uvolňování biologických látek [34].

Termoreverzibilní blokové kopolymery, skládající se z polyethylenglykolu (A) a biodegradabilních polyesterů (B), jako jsou polylaktidy (PLA), polylaktidglykolidy (PLGA) již

byly zkoumány jako nosiče léčiv s prodlouženým uvolňováním. Testováno bylo uspořádání jak PLGA-PEG-PLGA (ABA), tak i PEG-PLGA-PEG (BAB). Nejvíce jsou prozkoumány PLGA-PEG-PLGA triblokové kopolymery založené na poly(ethylen glykolu) a poly(D,L-laktid glykolidu), známé jako pod značkou ReGel[®] s řízeným uvolňováním inzulínu [34].

2.5.2 Charakteristika PEG-PLGA-PEG

V roce 1997 byla poprvé zveřejněna syntéza nového injekčně aplikovatelného typu kopolymeru PEG-PLGA-PEG [34]. Tento kopolymer je biokompatibilní a podléhá biodegradaci. Za běžné laboratorní teploty zůstává vodný roztok kopolymeru tekutý. Díky kombinaci vysokomolekulární PLGA s nízkomolekulárním PEG byl výsledkem hydrogel s rychlou reverzibilní gelací při fyziologické teplotě. Průběh změny stavu je zaznamenán ve fázovém diagramu, kde v závislosti na koncentraci polymeru a na dané teplotě jsou sledovány fázové přechody. Z grafu jsou určeny dvě důležité charakteristiky pro daný kopolymer, kterými jsou kritická gelační teplota (CGT) a kritická gelační koncentrace (CGC). Jedná se o společný bod těchto charakteristik, který označuje nejnižší teplotu a koncentraci, při které se z roztoku začne tvořit gel. Další výzkumy se zabývaly ovlivněním CGT a CGC, a to v závislosti na velikosti molekulové hmotnosti hydrofobní části PLGA. Bylo prokázáno, že zvyšující se molekulová hmotnost PLGA ($2\,320 - 2\,840\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) způsobila posun CGC na nižší hodnotu, přičemž CGT se nezměnila. Tímto výzkumem bylo potvrzeno, že se zvyšující se hydrofobností polymeru klesá CGC [34, 44-46].



Obrázek 7 – Ukázkové znázornění sol-gel fázového diagramu [47]

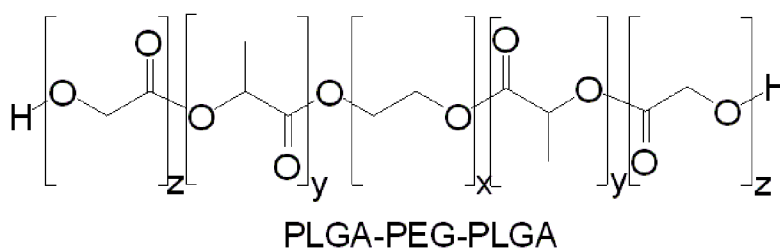
Vzhledem k tomu, že předchozí studie již ukázaly, že triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG byl vhodný pro použití jako injekční systém, byla dále zkoumána formace gelu *in situ* u potkanů. Tato studie prokázala, že přednostně probíhá degradace na hydrofilním úseku PEG [46]. Tento systém byl i testován na uvolňování léčiv různého lipofilního charakteru. Ketoprofen, jako zástupce hydrofilního modelového léčiva, se uvolňoval po dobu 2 týdnů podle kinetiky prvního řádu. Další testovaným léčivem bylo léčivo hydrofobní povahy

spironolakton, který se užívá jako diuretikum. Spironolakton se uvolňoval z kopolymeru po dobu 2 měsíců [48].

2.5.3 Charakteristika PLGA-PEG-PLGA

Zenter a kol. (2001) jako první syntetizovali hydrogel z triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA [49]. Tento typ kopolymeru byl registrován pod značkou ReGel[®] a byl vyvinut jako biologicky odbouratelný systém pro řízené uvolňování léků. Stejně jako u PEG-PLGA-PEG je za běžné pokojové teploty roztok polymeru kapalinou. Pouze při vpravení do prostředí s fyziologickou teplotou se z něho postupně stává gel. Postupná degradace gelu umožnila řízené uvolňování léčiva v rozmezí 1 až 6 týdnů. Těmito vlastnosti je ReGel[®] vhodný pro lokální aplikaci nebo systematické podávání léků [34].

Kritický jev, který ovlivňuje reverzibilní fázový přechod ve vodném prostředí, je rovnováha mezi hydrofobní a hydrofilní délkou bloku [50]. Triblokový kopolymer je založen na centrálním PEG bloku ($M_n=1\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) se dvěma PLGA koncovými bloky o molekulové hmotnosti nad $1\ 600\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Tyto kopolymery jsou nerozpustné ve vodě. Naopak triblokový kopolymer s bloky PLGA a molekulovou hmotností pod 900 je rozpustný ve vodě. Proto pouze triblokové polymery bloku PLGA, s molekulovou hmotností v rozmezí od 900 do 1 600, vykazují termoreverzibilní přechod solů na gel. Dále je třeba poznamenat, že CGC pro ABA (PLGA-PEG-PLGA) typ triblokového kopolymeru je nižší než u BAB (PEG-PLGA-PEG) typu [51].



Obrázek 8 – Strukturní vzorec triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA

2.5.4 Využití PLGA-PEG-PLGA při uvolňování léčivých látek

Uvolňování léčivých látek z kopolymeru PLGA-PEG-PLGA (ABA) již bylo popsáno v mnoha odborných článcích. Převážně jsou zaměřeny na uvolňování problematických léčivých látek, které jejich časté podávání pacientům způsobuje diskomfort.

Tabulka 2: Přehled léčivých látek testovaných na uvolňování z PLGA-PEG-PLGA

Léčivá látka	Doba uvolňování	Literární zdroj
Exenatid	1 týden	[8]
Inzulín	14 dnů	[6]
Paclitaxel	6 týdnů	[11]
Ricin	18 dnů	[41]
Docetaxel	3 týdny	[3]
Topotekan	5 dnů	[5]
Hydrazid kyseliny isonikotinové	124 hodin	[2]
Acetát dexamethasonu	1,67 hodin	[4]
Naltrexon + vitamin B ₁₂	29 dnů	[7]

Li a kolektiv (2013) se ve své práci zabývají uvolňováním exenatidu, což je syntetický analog glukagonu. Exenatid se používá při léčbě diabetu místo inzulínu, který nelze podávat ústy, neboť dochází k jeho rozštěpení na kratší peptidy a k deaktivaci v trávicím ústrojí. V současnosti se inzulín aplikuje převážně pomocí tzv. inzulínových per opakovaně před jídlem, což se stává problematickým pro pacienty. Bylo zjištěno, že exenatid tvoří nanočástice s ionty zinku, které byly následně obaleny řetězcí kopolymeru. Snížení počátečního návalového uvolnění a prodloužení uvolňování léku po dobu jednoho týdne bylo dosaženo synergickým efektem tří pomocných látek, a to octanu zinečnatého, PEG a sacharózy [8]. Suna Choi a jeho kolektiv (2003) se zabývali přímo uvolňováním inzulínu z ABA kopolymeru. Přidáním uhličitanu zinečnatého do ABA roztoku se snížila rozpustnost inzulínu ve vodě. Nebylo sledováno žádné počáteční návalové uvolňování inzulínu díky Zn^{2+} iontům. Inzulín se uvolňoval po dobu 14 dnů [6].

Hydrogely tvořené PLGA-PEG-PLGA kopolymery se také nabízejí jako ideální nosiče pro řízené uvolňování léčiv proti rakovině. Bylo sledováno uvolňování buněčného jedu ricinu. Tato přírodní látka hydrofobního charakteru se uvolňovala z hydrogelu po dobu 18 dnů. Na základě tohoto výzkumu bylo zjištěno, že lipofilní látky vykazují spíše postupné uvolňování související s degradací kopolymeru, což způsobuje dlouhodobější uvolňování [41]. Yuan Gao a kolektiv (2011) prokázali zlepšení rozpustnosti prakticky nerozpustného protinádorového léku docetaxelu v PLGA-PEG-PLGA hydrogelu. Při použití 20% roztoku kopolymeru se rozpustnost zvýšila až 460 x, a to pouhým fyzikálním zamícháním léčiva do roztoku kopolymeru. Uvolňování docetaxelu z hydrogelu bylo pozorováno po dobu delší než 3 týdny. Při testování tohoto hydrogelu na geneticky upravených myších bylo zjištěno, že jedna injekce PLGA-PEG-PLGA hydrogelu s docetaxelem inhibuje nárůst nádoru a její účinek je tak srovnatelný s třemi běžnými injekcemi samotného léčiva. Aplikace docetaxelu spolu s hydrogelem snižuje celkové toxické účinky na organismus. Pokrok v léčbě rakoviny postoupil díky kombinaci lokalizované chemoterapie a implantátům, které tvoří tzv. depa protinádorových léčiv [3]. Changovi a kol. (2011) se podařilo obalit protinádorové léčivo topotekan tepelně citlivým hydrogelem PLGA-PEG-PLGA. Topotekan podléhá v neutrálním a zásaditém prostředí hydrolyze laktonového kruhu, což snižuje jeho celkový účinek. Z PLGA-PEG-PLGA kopolymeru se topotekan uvolňoval po dobu 5 dnů. Bylo zjištěno, že tyto kopolymery se hodí pro uvolňování hydrofilních léčiv, které pro svoji aktivní formu potřebují kyselé prostředí jako je tomu u topotekanu [5].

Gajendiran a kol. (2013) nasyntetizovali nízkomolekulární práškový kopolymer PLGA-PEG-PLGA, který smíchali s hydrazidem kyseliny isonikotinové, která se používá při léčbě tuberkulózy v kombinaci s dalšími antituberkolitiky, jako jsou rifampicin a pyrazinamid. Hydrazid kyseliny isonikotinové se snadno oxiduje, čímž se snižuje jeho účinnost proti patogenům. Vytvořený nanočásticový systém z PLGA-PEG-PLGA kopolymeru ochraňoval samotné léčivo před oxidací a také poskytl jeho rovnoměrnou distribuci a snížení toxicity. Léčivo se uvolňovalo z core-shell nanočásticového systému po dobu 124 hodin [2].

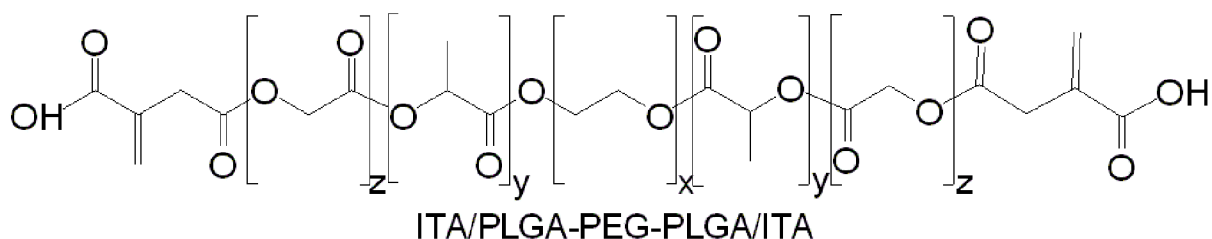
Pro zvýšení biologické dostupnosti a doby působení léčiv, které jsou aplikovány přímo do oka, bylo sledováno uvolňování acetátu dexamethasonu z PLGA-PEG-PLGA hydrogelu. Farmakokinetika acetátu dexamethasonu byla sledována *in vivo*, a to za použití mikrodialyzační techniky v přední části oka. Pro kontrolu byl porovnáván farmakokinetický profil očních kapek a hydrogelu s obsahem léčiva. Doba zdržení léčiva v přední části oka byla přibližně stejná pro oba způsoby aplikace, avšak v případě použití hydrogelu byla koncentrace léčiva 7 x vyšší v přední části oka, než u kapek. Využití tepelně-citlivých

hydrogelu při aplikaci acetátu dexamethasonu pro léčbu oka se tak stalo inovativním krokem v oblasti této léčby [4].

Khodaverdi a kol. (2012) provedli studii zaměřenou na sledování profilu uvolňování naltrexon-hydrochloridu spolu s vitamínem B₁₂. Naltrexon se používá při léčbě v závislosti na opiátech. Při perorálním podání má silné vedlejší účinky, které způsobují bolest břicha, nevolnost a zvracení. Také vykazuje nízkou biologickou dostupnost, asi 5 až 10 %. Silné vedlejší účinky a nízká biologická dostupnost má za následek selhání léčby u drogově závislých pacientů, kteří si často nemohou dovolit velmi drahé subkutánní podávání tohoto léku. Vitamin B₁₂ se z ABA hydrogelu uvolnil z 50 % a naltrexon-hydrochlorid více jak z 60 %. Tato studie prokázala, že velikost a molekulová hmotnost přidaného léčiva a koncentrace kopolymeru může ovlivnit rychlost a mechanismus uvolňování léčiva. Tyto experimenty vedou k závěru, že PLGA-PEG-PLGA hydrogel je vhodný pro pacienty se slabou vůlí léčit svoji závislost [7].

2.5.5 Využití ITA/ABA/ITA kopolymerů pro biomedicínské aplikace

Modifikace triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA anhydridem kyseliny itakonové (ITA) (3-methylentetrahydrofuran-2,5-dion) se může ukázat jako významné pro různorodé biomedicínské aplikace. Hlavní výhodou ITA je poskytnutí karboxylové skupiny do řetězce kopolymeru. Tyto karboxylové skupiny pak mohou sloužit jako vazebné místo pro léčivou látku. Dvojně vazby, které rovněž ITA poskytuje, jsou nezbytné pro chemické zesítnění. Modifikovaný kopolymer ITA se tak stává citlivý na světlo, na teplo a na pH. Vytvořit trojrozměrnou síť hydrogelu lze pomocí chemického síťování díky kovalentním a dvojným vazbám pomocí fotopolymerace. Fyzikální hydrogel vzniká díky vodíkovým vazbám, případně iontovým interakcím například s Ca²⁺ ionty [52].



Obrázek 9 – Strukturální vzorec triblokového kopolymeru ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA

2.6 Základní požadavky na ideální léčivo, nosič a testování bezpečnosti

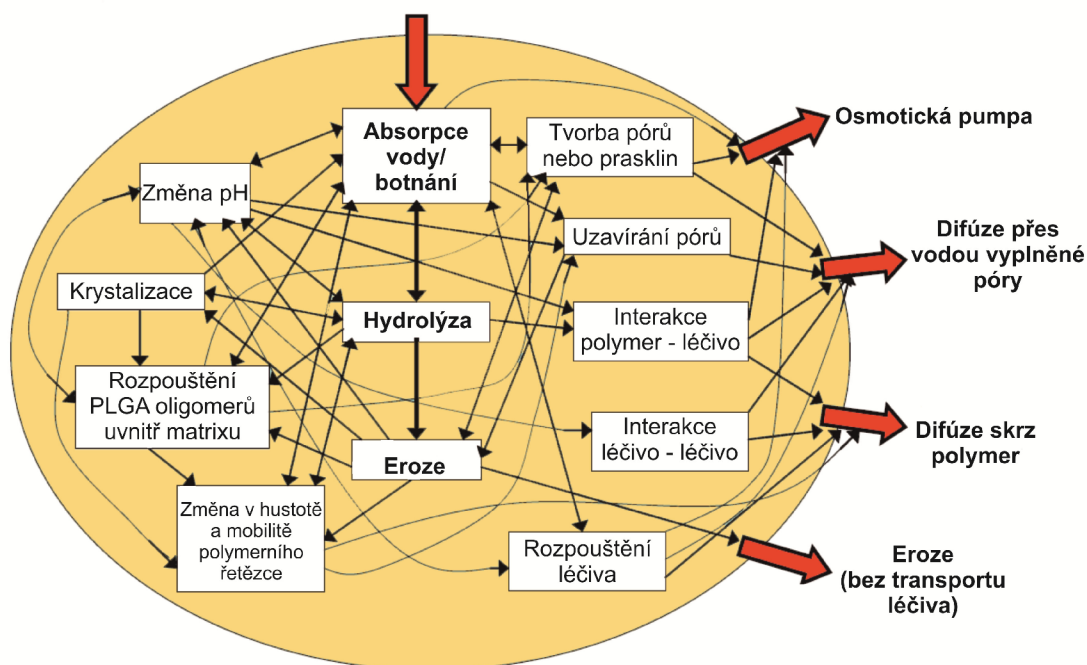
Léková forma, ve které je léčivo distribuováno v organismu, by měla být naprosto netoxická, nesmí ovlivňovat organismus a pro organismus je tzv. „neviditelná“. Jakmile je tato forma dopravena do místa, které je pro ni specifické, dochází k aktivaci substance. Aktivní léčivá látka by se měla uvolnit v koncentraci, která je nutná pro kýžený léčebný účinek a měla by působit po dobu, která je optimální. Po ukončení působení se všechny součásti daného systému (léčivá látka, její metabolity, části dopravního systému a jeho degradační produkty) vyloučí z organismu tak, aby neměly žádné vedlejší účinky.

Nosič léčiva by měl být v průběhu transportu léčiva stabilní. Uvolnění aktivní substance z nosiče by mělo být řízeno chemickou hydrolýzou anebo enzymolýzou. Po ukončení děje by se nosič léčiva měl zcela rozložit v organismu.

Proto při zavádění nových *in situ* systémů musí být každá pomocná látka podílející se na složení těchto systémů testována z hlediska bezpečnosti a biokompatibility. Dále se provádějí farmakologické a geneticko-toxikologické studie a testy akutní a semichronické toxicity. Také se aplikují studie zabývající se adsorpcí, distribucí, metabolismem a exkrecí sloučeniny, reprodukční testy, studie karcinogenity a hemologické rozборы. Výsledky výše zmíněných testů a studií by měly odhalit, zda nové produkty obsahují pyrogeny a zda mají negativní vliv na plodnost [20].

2.7 Mechanismus uvolňování léčiv z polymerní matrice

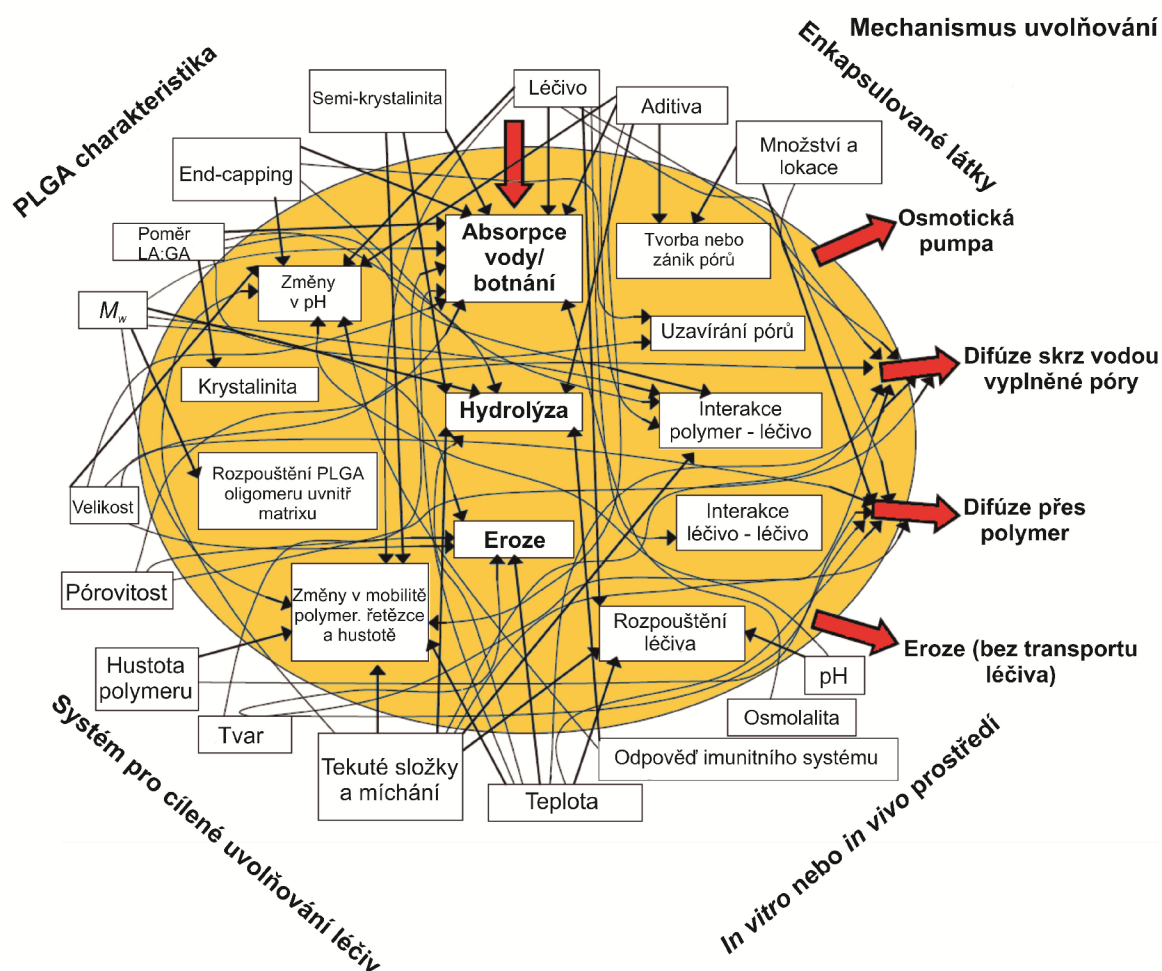
Mechanismus uvolňování léčiva z polymerní matrice může být popsán dvěma mírně odlišnými způsoby. První způsob popisuje transport molekuly léčiva přes polymerní matrici. Druhý způsob popisuje již přímé uvolňování léčiva do okolního prostředí. Jak transport molekuly léčiva přes polymerní matrici, tak i jeho samotné uvolnění z matrice určuje rychlost uvolňování. Pokud vytváříme systém s postupným uvolňováním léčiva, je důležité znát mechanismus uvolňování, a to spolu s fyzikálně-chemickými procesy, které uvolňování ovlivňují. Molekula léčiva se může ze systému uvolnit několika způsoby. Fredenbergová a kol. [53] studovali mechanismus uvolňování systémů s postupným uvolňováním, založené na PLGA. PLGA systém ponořený do vody okamžitě absorbuje vodu, která nastartuje hydrolýzu, štěpení esterových vazeb i následné snížení molekulové hmotnosti (M_w). Tímto štěpením se tvoří kyseliny, které způsobují kyselou hydrolýzu uvnitř systému. Jakmile jsou produkty hydrolýzy rozpustné a schopny difundovat ven ze systému, začíná proces eroze. Komplexnost fyzikálně-chemických procesů je zobrazena na obrázku 10 [53].



Obrázek 10 – Schématické znázornění mechanismu uvolňování léčiva z polymerní matrice [53]

Na procesy, probíhající v matrici polymeru mohou mít vliv i přidaná léčiva a další aditiva (soli, povrchově aktivní látky, atd.). Vlastnosti léčiva, zejména pak jejich polarita, může změnit vlastnosti původního polymeru. Dále také léčiva kyselé povahy mohou zvyšovat kyselou hydrolýzu a naopak přídavek léčiva zásadité povahy může kyselou hydrolýzu zpomalovat až případně neutralizovat kyselé produkty hydrolýzy.

Uvolňování léčiva z polymerní matrice proto závisí na vlastnostech polymeru, léčiva a jejich vzájemných interakcích. Faktory ovlivňující uvolňování léčiva z PLGA polymeru jsou zobrazeny na obrázku 11 [53].



Obrázek 11 – Faktory ovlivňující uvolňování léčiva z PLGA polymeru [53]

2.8 Degradace ABA a ITA/ABA/ITA

Degradace polymerů (kopolymerů) je charakteristická poklesem molekulové hmotnosti vzorku polymeru, která je doprovázena zvýšením koncentrace nízkomolekulárních segmentů řetězce polymeru, které se uvolnily do okolního prostředí. Tento proces je doprovázen i ztrátou mechanické pevnosti polymeru [54].

Lze obecně říci, že téměř všechny biologicky rozložitelné polymery obsahují některou z hydrolyzovatelných labilních vazeb, jako jsou vazby esterové, anhydridické, uhličitanové, amidické a mnohé další. Jejich nejvýznamnější degradační mechanismus, probíhající v živých organismech, je enzymaticky katalyzovaná hydrolýza. Pro abiotické prostředí

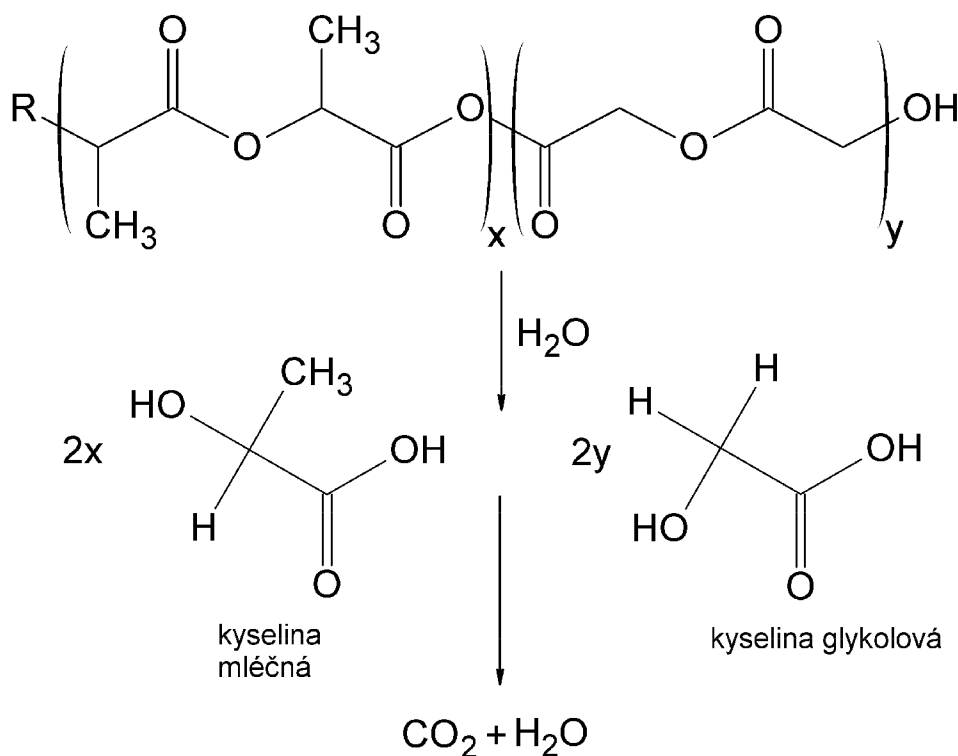
převažuje mechanismus chemické hydrolyzy. Na hydrolytické štěpení vazeb má silný vliv složení polymeru a stérické uspořádání makromolekuly, které ovlivňuje přístup molekul vody k labilním vazbám. Celkovou rychlost hydrolyzy ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří například hydrofobnost či hydrofilnost, relativní stabilita vazeb, rozpustnost degradačních produktů, vznik autokatalyzujících produktů degradace, mikrostruktura a schopnost krystalizace [54].

Bylo ověřeno, že funkcionalizace triblokového kopolymeru ABA anhydridem kyseliny itakonové má vliv na rychlost degradace fyzikálního hydrogelu v inkubačních prostředí o různé hodnotě pH. Koncová karboxylová skupina pocházející z kyseliny itakonové se při hodnotě pH 7,4 ionizuje, a tak zvyšuje celkovou hydrofilitu ITA/ABA/ITA kopolymeru a následně i rychlost degradace v prostředí o hodnotě pH 7,4. Naopak v mírně kyselém prostředí (pH 4,2) nejsou karboxylové skupiny ionizovány a mohou tvořit vodíkové můstky, kopolymer se pak chová hydrofobně. Jeho rychlost degradace v prostředí o hodnotě pH 4,2 byla srovnatelná s nemodifikovaným ABA kopolymerem [14].

2.8.1 Degradace segmentu PLGA

PLGA segment ve vodném prostředí degraduje mechanismem autokatalýzy. Jedná se o hydrolytické štěpení jedné esterové vazby PLGA kopolymeru, která rozštěpením poskytne jednu karboxylovou a jednu hydroxylovou skupinu. Takto vzniklé konce karboxylových skupin jsou schopny katalyzovat hydrolyzu dalších esterových vazeb [55].

Faktorů, které ovlivňují rychlost degradace segmentu PLGA, je velmi mnoho. Mezi nejvýznamnější patří délka řetězce vytvářejícího se oligomeru, pH, teplota, základní vlastnosti polymeru a celková velikost a tvar předmětu vytvořeného z kopolymeru [56].



Obrázek 12 – Schéma mechanismu degradace PLGA

Obecně platí, že míra degradace alifatických polyesterů se určí podle jejich molekulové

hmotnosti a složení. Další vliv na degradaci má struktura polymeru (může být amorfni nebo krystalická). Významný vliv na degradaci ve vodném prostředí má i hydrofilnost nebo hydrofobnost dané struktury [57].

Rychlost degradace nanočásticových systémů závisí na celkové hydrofilitě polymeru. Bylo potvrzeno, že čím více je polymer hydrofilní, tím rychleji podléhá degradaci. Celková hydrofilita polymeru je také ovlivněna poměrem krystalické části k části amorfni [58]. Vliv na degradační rychlost má rovněž samotná stereochemie monomerů. Experimenty prokázaly, že PLGA kopolymer, připravený z poly(glykolové kyseliny) a z poly(L-mléčné kyseliny), patří mezi krystalické kopolymery, zatímco kopolymery připravené z D,L-PLA a PGA jsou amorfni. Také bylo zjištěno, že rozdíly ve složení polymerů a jejich následný vliv na degradaci jsou vlastnosti, které mohou způsobovat samotné užití monomery. Obsahuje-li kopolymer monomery PLA je méně hydrofilní, než kopolymer složený pouze z PGA. Zpomalení procesu degradace kopolymerů obsahujících PLA způsobuje methylová skupina nacházející se na monomeru kyseliny mléčné, která brání v přístupu molekulám vody a tím i hydrolyze [59].

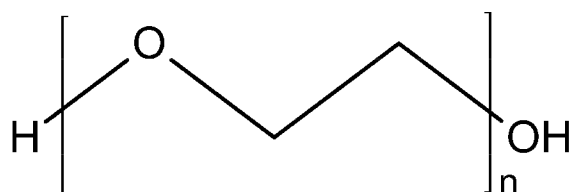
Z výše uvedených poznatků vyplývá, že složení polymerního řetězce (tzn. obsah L-LA, D-LA, anebo GA jednotek) výrazně určuje degradaci PLGA polymeru [57, 60-62]. Kopolymer, obsahující vyšší procento jednotek kyseliny glykolové v hlavním řetězci, následně generuje více kyseliny mléčné do okolního prostředí. Příčinou tohoto chování je vazba mezi jednotkami monomeru kyseliny glykolové a mléčné, která podléhá primárně hydrolyze.

Biologický rozklad PLGA *in vivo* je rychlejší než biodegradace semikrystalického PLA. Hydrolytický rozklad *in vitro* produkuje převážně rozpustné dioly [63].

2.8.2 Charakteristika monomerů

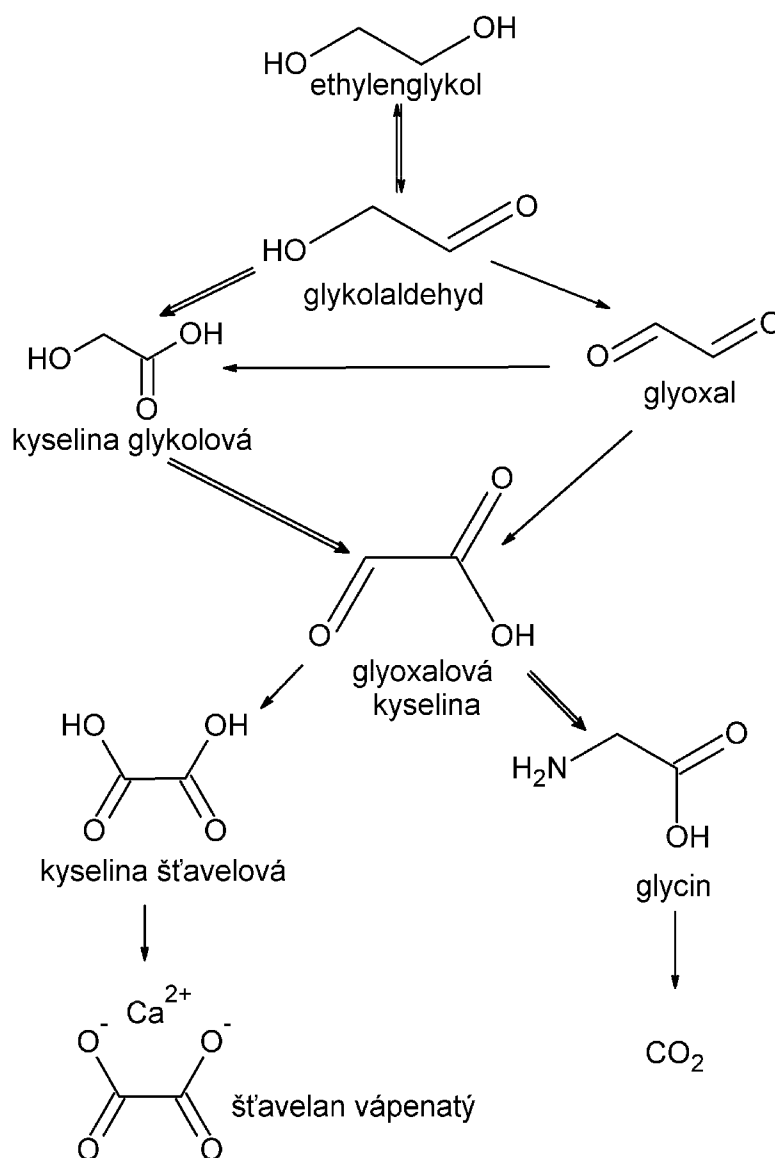
2.8.2.1 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) patří mezi syntetické polymery rozpustné ve vodě. PEG a jeho deriváty jsou široce využívány v různých průmyslových odvětvích. V kosmetickém průmyslu se například používá pro výrobu zvláčňujících látek, přidávaných do krémů, ve spotřebním průmyslu slouží pro výrobu surfaktantů a čisticích prostředků a farmaceutický průmysl z PEG připravuje základy pro masti, kapsle, tablety a plniva do pilulek [64].



Obrázek 13 – Struktura polyethylenglykolu

Při perorálním nebo intravenózním podání je polyethylenglykol vylučován převážně v nezměněné podobě v exkrettech. Podmínkou odstranění polyethylenglykolu z těla je, že PEG blok musí mít nižší molekulovou hmotnost než $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [50]. Větší řetězec nedokáže ledviny odfiltrovat z krve. Polyethylenglykol se může částečně vstřebávat a částečně metabolizovat. PEG je metabolizován do nižších oligomerů kyseliny glykolové, hydroxyglykolové a diglykolové kyseliny. PEG je také částečně metabolizován na oxid uhličitý a vyloučen pomocí plicní ventilace. Procentuální vylučování ve formě CO_2 klesá se zvyšující se metabolizovanou dávkou a s rostoucí molekulovou hmotností homologické řady [64-66].



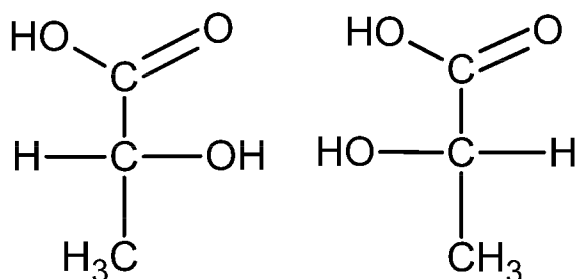
Obrázek 14 – Schéma metabolismu ethylenglykolu [67]

2.8.2.2 Kyselina mléčná

Kyselinu mléčnou (kyselina 2-hydroxypropanová) poprvé izoloval v roce 1780 švédský chemik Carl Wilhelm Scheele. Princip tvorby kyseliny mléčné byl pak objasněn v roce 1865, kdy Louis Pasteur objevil bakterie rodu *Lactobacillus*, které tuto kyselinu produkují [68].

Molekula kyseliny mléčné má chirální centrum, a proto se vyskytuje ve dvou izomerních formách D(-) a L(+) a v racemické směsi. Polymery z této α -hydroxy kyseliny jsou také

obvykle zkráceně označovány pomocí jejich chiralidy. Ve většině biomedicínských aplikací je přednostně vybírán (L) izomer kyseliny mléčné, neboť pouze ten je lidské tělo schopno metabolizovat [68].



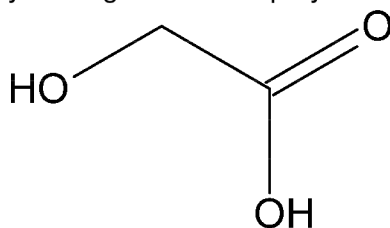
Obrázek 15 – Struktura D a L izomeru kyseliny mléčné [68]

Kyselina mléčná vykazuje dráždivé účinky především na kůži a sliznice. Bylo zjištěno, že laktát vznikající během metabolismu buňky je méně toxický než samotná kyselina mléčná. Lidský organismus je schopen tolerovat dávku až 1 500 mg kyseliny mléčné na kilogram tělesné hmotnosti při perorální podání. Letální koncentrace v krvi se pohybuje okolo 20 mM. Perorální podávání D, L-kyseliny mléčné. v oblasti smrtelné koncentrace u potkanů způsobuje úbytek tělesné hmotnosti, chudokrevnost a také snižuje koncentraci oxidu uhličitého v krvi [69].

Klinický obraz intoxikace kyselinou mléčnou způsobuje metabolickou acidózu se zvýšeným podrážděním, dušností a zrychlením srdeční frekvence [69].

2.8.2.3 Kyselina glykolová

Kyselina glykolová, neboli 2-hydroxyethanová kyselina, se v čisté formě nachází jako silně hygroskopická krystalická látka s molekulovou hmotností $76,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [70]. Kyselina glykolová má všestranné využití. Je používána v textilním, potravinářském a farmaceutickém průmyslu [71]. Vzhledem k tomu, že je tato kyselina v lidském těle výborně odbourávána, využívá se stále více i pro syntézy biodegradabilních polymerů [69].



Obrázek 16 – Vzorec kyseliny glykolové

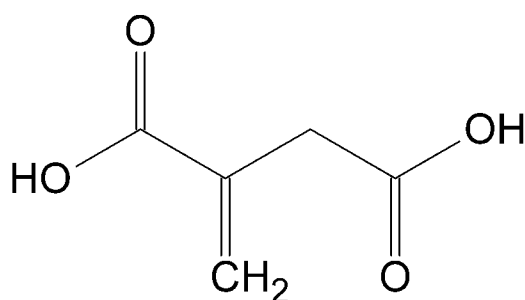
Kyselina glykolová má velmi nízkou akutní toxicitu, avšak stejně jako u kyseliny mléčné vykazuje dráždivé účinky. Předpokládá se, že prekursor kyseliny glykolové je ethylenglykol, který je v metabolismu přeměněn na glykolaldehyd a posléze na kyselinu glykolovou. Ta je následně přeměněna na glyoxalátovou kyselinu a poté na kyselinu šťavelovou. Během vylučování se může kyselina šťavelová slučovat s vápenatými ionty za vzniku solí. Pokud se tyto soli (šťavelany) vyskytují v těle v dostatečně vysoké koncentraci, může docházet k jejich vysrážení do tubulů a k následné poruše filtrace ledvin [67]. Kyselina mléčná i glykolová ve formě šťavelanů tak vstupují do Krebsova cyklu, odkud jsou potom z těla vyloučeny močí [54, 72].

2.8.2.4 Kyselina itakonová

Kyselina itakonová (kyselina 2-methylenbutandiová, $C_5H_6O_4$) patří mezi nenasycené dikarboxylové organické kyseliny. V čistém stavu se jedná o bílou krystalickou látku s molekulovou hmotností $130,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [73]. Tato biomolekula je primárním metabolitem některých mikroorganismů a vzniká dekarboxylací *cis*-akonitové kyseliny, ze které také vznikl přesmykem její název. Nejvíce se této kyseliny ročně vyrobí pomocí fermentace sacharidů, na které se podílejí plísně rodu *Aspergillus terreus* [74]. Je vyráběna z obnovitelných zdrojů, jako je melasa a hydrolyzovaný škrob. Kyselina itakonová se běžně používá při výrobě syntetických pryskyřic a vláken. Zlepšuje jejich mechanické vlastnosti, kterými je pružnost a tažnost. Modifikovaná poly(itakonová kyselina) se uplatňuje ve výrobě detergentů, šampónů i herbicidů [74, 75].

Dvojná vazba ve struktuře kyseliny itakonové umožňuje snadnou kopolymerizaci. Zcela ionizovaná kyselina itakonová se skládá ze dvou karboxylových skupin s odlišnými pK_a hodnotami (pK_a 3,84 a 5,45). Zavedením kyseliny itakonové do struktury polymeru je získán řetězec upravený na koncích karboxylovými skupinami, které zvyšují hydrofilitu polymeru a jsou schopny vytvářet vodíkové vazby s odpovídajícími skupinami. Modifikace hydrogelu malým množstvím kyseliny itakonové zvyšuje stupeň botnění a citlivost na pH [76]. Cíleným zaváděním této kyseliny jako monomeru do struktury polymeru se přispívá ke vzniku vodíkových vazeb, čímž lze zvýšit mechanickou pevnost hydrogelu. Další pozitivní vlastností kyseliny itakonové je její biokompatibilita, která pramení z jejího procesu výroby a použitých surovin [75, 77].

V posledních letech byla poly(itakonová kyselina) použita pro syntézu řady kopolymerních hydrogelů, jako je poly(N-isopropylakrylamiditakonová kyselina) (PNIPAM/ITA) [78], poly(N-vinyl-2-pyrrolidonitakonová kyselina) (PNVP/ITA) [76] a (PHEMA/ITA), tj. poly(2-hydroxyethylmethakrylitakonová kyselina) (PHEMA/ITA). Byly studovány jejich vlastnosti, botnění a reakce na teplotu [79].



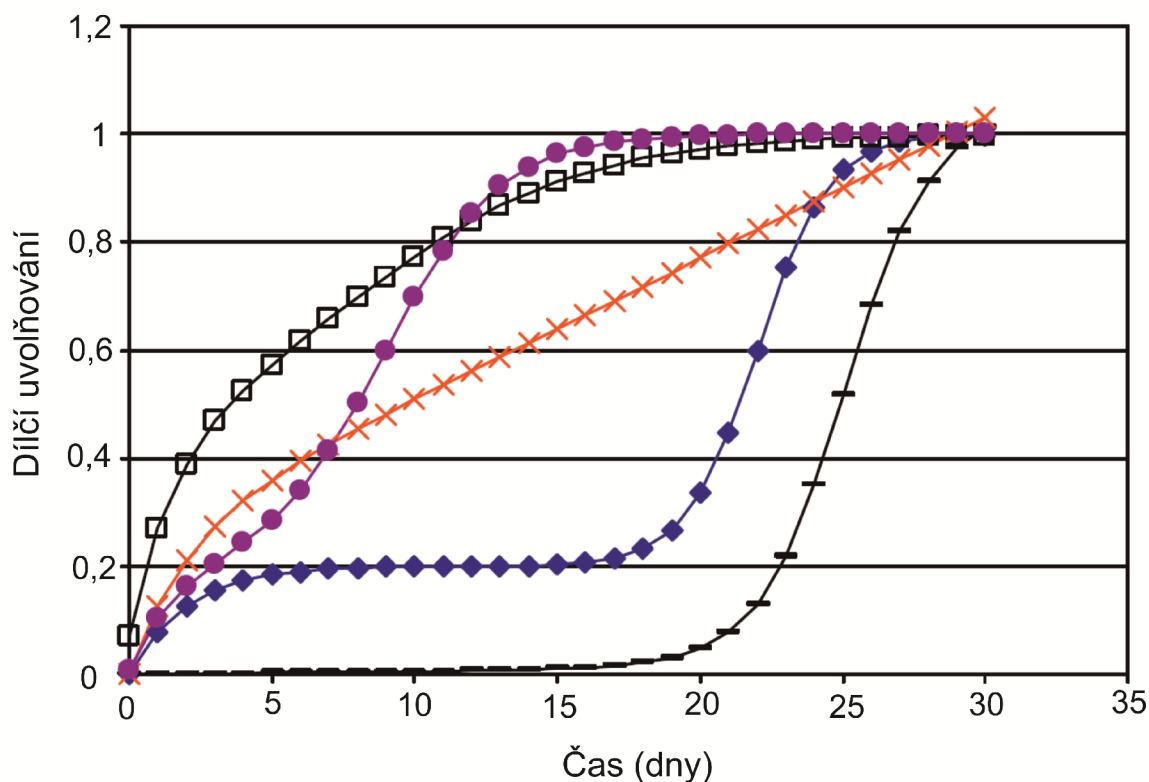
Obrázek 17 – Vzorec kyseliny itakonové

2.9 Profil uvolňování léčivých látek

Profil uvolňování léčivých látek je někdy používán jako základ pro vyhodnocení mechanismu účinku celého systému. Fredenbergová a kol. (2011) popsali profily uvolňování léčiv, které jsou složené z několika fází. Jednofázové uvolňování je velmi vzácné. Mnohem častějšími profily uvolňování léčivých látek jsou profily dvoufázové nebo třífázové. Velké systémy (částice) často vykazují třífázový systém uvolňování, a to vzhledem k heterogenní degradaci. Naopak u malých systémů (částic) bývá velmi často pozorováno dvoufázové uvolňování [53].

První fáze v třífázovém uvolňování je obvykle popisována jako návalové uvolňování léčiva, které je spojené s uvolněním léčiva z povrchu systému, případně s uvolněním molekul léčiva, které se nachází blízko pod povrchem systému a ze systému se uvolní pomocí hydratace systému. Další důvod návalového uvolňování léčiva je spojen s vytvořením prasklin a s celkovou dezintegrací systému. Ve druhé fázi se léčivo pozvolna uvolňuje pomocí difúze přes existující póry. Během této fáze se polymer dále hydratuje a degraduje. Třetí fáze je poměrně často nazývána druhým návalovým uvolňováním, které je rovněž velmi rychlé a je založeno na celkové erozi systému. Jestliže je druhá fáze uvolňování velmi rychlá, může být naopak třetí fáze velmi pozvolná. Příklady různého průběhu uvolňování jsou zobrazeny na *obrázku 18* [53], význam jednotlivých značení:

- | | |
|--------------------|---|
| čtverce bez výplně | návalové uvolňování a rychlá druhá fáze |
| fialové kruhy | trojfázové uvolňování s krátkou druhou fází |
| kříže | návalové uvolňování a uvolňování dle kinetiky nultého řádu |
| modré kosočtverce | třífázové uvolňování |
| čárky | dvojfázové uvolňování, totožné s třífázovým uvolňováním, ale bez počátečního návalového uvolňování. |



Obrázek 18 – Profily uvolňování skládající se z různých fází [53]

2.9.1 Výběr kinetického modelu pro uvolňování léčiv

Schémata uvolňování lze rozdělit na ty, která popisují pomalé uvolňování léčiva při kinetice nultého nebo prvního řádu. Další vzorce popisují rychlé počáteční uvolňování, které je následováno prodlouženým uvolňováním, jež lze opět popsat kinetikou nultého nebo prvního řádu. Hlavním účelem systémů s řízeným uvolňováním léčiv je udržovat koncentraci léčivé látky v krvi, nebo v cílové tkáni na požadované hodnotě po definovaný čas. Obecně proto systémy s řízeným uvolňováním léčiva na počátku uvolní takovou dávku, aby bylo v co nejkratším časovém úseku dosaženo efektivní terapeutické koncentrace. Následně pak systém uvolňuje tzv. udržovací koncentraci léčivé látky, aby byla efektivní terapeutická koncentrace této látky udržena po požadovanou dobu. Vzhledem k široké všestrannosti využití systémů s řízeným uvolňováním v moderním konceptu terapeutické léčby, jehož cílem je zvýšit účinnost léků a snížit jejich frekvenci podávání a nežádoucí účinky spojené s dávkováním se matematické modelování ukázalo pro tento účel jako užitečný nástroj, neboť tento přístup umožňuje předpovědět kinetiku uvolňování před tím, než je systém plně realizován. Existuje celá řada kinetických modelů, které popisují celkové uvolňování léčivé látky z lékových forem. Vzhledem k tomu, že kvalitativní a kvantitativní změny v lékové formě mohou měnit výkonnost uvolňování léků *in vivo*, je nezbytné vyvíjet nástroje, které usnadňují vývoj konečného produktu a rovněž snižují nutnost biologických studií. Metody přístupu ke zkoumání kinetiky uvolňování léků z lékové formy s řízeným uvolňováním mohou být rozděleny do tří kategorií, a to na statistické metody, modelově závislé metody a modelově nezávislé metody [80].

Modelově závislé metody jsou založeny na matematických funkcích, které popisují profil uvolňování léčivé látky. Po zvolení vhodné funkce jsou profily uvolňování vyhodnocovány v závislosti na odvozených parametrech modelu. Mezi modelově závislé metody náleží kinetika nultého a prvního řádu, Higuchi, Hixson, Crowell, Baker-Lonsdale, Weibull a Korsmeyer-Peppasův model [80].

Na základě literární rešerše [81-88] byl vybrán Korsmeyer-Peppasův model, který popisuje uvolňování léčivé látky z polymerní matrice válcovitého tvaru. Tento jednoduchý vztah, který byl odvozen v roce 1983 [80] uvádí rovnice (1).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (1)$$

kde $\frac{M_t}{M_\infty}$ je poměr uvolněného léčiva v čase t ;

k je rychlostní konstanta;

n je exponent uvolňování.

Hodnota exponentu n je používána k charakterizaci různého mechanismu uvolňování léčiva z matrice válcovitého tvaru. Hodnoty n pro různé mechanismy uvolňování léčiva jsou popsány v *tabulce 3*. Pro zjištění exponentu n je třeba použít část přímký, kde je podíl M_t/M_∞ menší než hodnota 0,6 [80].

Tabulka 3: Interpretace difúzního mechanismu uvolňování z polymerní matrice [80]

Exponent uvolňování (n)	Mechanismus transportu léčiva	Rychlost jako funkce času
0,5	Fickova difúze	$t^{-0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	transport probíhající jinou cestou, než je Fickova difúze	t^{n-1}
0,89	případ II. transportu	uvolňování 0. řádu
větší než 0,89	super případ II. transportu	t^{n-1}

2.9.2 Příprava systémů

Systémy s řízeným uvolňováním léčiva mohou nabývat různých podob a tvarů. Nejčastěji se využívají systémy (pomůcky) ve tvaru disků, tyčinek, pelet nebo mikročastic na bázi polymerů. Vzhledem ke svým výhodám jsou rozložitelné polymerní mikrosféry jedním z nejběžnějších typů vhodných pro řízené uvolňování léčiv. Mikrosféry jsou schopny obalit, resp. zapouzdřit, mnoho typů léčivých látek, zahrnujících např. molekuly nízkomolekulárních proteinů, nukleové kyseliny nebo biologicky aktivní anorganický materiál. Také je lze snadno aplikovat vstříkáním injekční jehlou. Mikrosféry mohou být připraveny mnoha způsoby, nejčastěji emulzními metodami nebo sprejovacími technikami [89].

Jedním ze způsobů přípravy je tzv. metoda voda/olej, kdy je polymer rozpuštěn v organickém rozpouštědle, např. v dichlormethanu, za účelem přípravy jednofázového roztoku. Léčivá látka je potom následně přidána do tohoto roztoku za stálého míchání. Vzniklá suspenze polymeru a léčivé látky je následně emulgována ve velkém objemu vody za přítomnosti emulgátoru (např. polyvinylalkoholu), a to za odpovídající teploty a míchání. Organické rozpouštědlo se potom odpaří, případně se extrahuje do olejových kapiček za definovaných podmínek [90, 91].

Druhou možností přípravy je tzv. proces dvojité emulze. Tato metoda je vhodná pro zapouzdření polárních léčivých látek, jakými jsou např. peptidy, proteiny a vakcíny. Léčivá látka je nejprve rozpuštěna v deionizované vodě a poté je tento roztok přidán do organické fáze obsahující organické rozpouštědlo a polymer. Tyto dvě fáze jsou míchány tak dlouho, až vznikne emulze (voda v oleji). Do této emulze je přidán polyvinylalkohol a vodná suspenze je nadále emulgována. Organické rozpouštědlo může být odpařeno nebo extrahováno stejnou technikou jako v případě metody voda/olej [92-94].

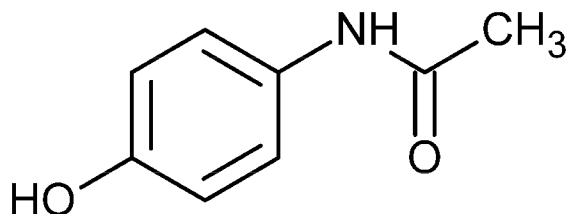
Další metodou přípravy je tvorba emulzního systému založena na dvou procesech. První fáze (označována též jako olejová fáze) je připravena disperzací pevné fáze (léčivá látka) v roztoku polymeru. Tato fáze je za stálého míchání postupně vkapávána do vodné fáze obsahující emulgátor až do vzniku jednotné emulze [95, 96].

2.9.3 Charakteristika použitých léčiv

2.9.3.1 Paracetamol

Jako vhodné modelové léčivo pro sledování uvolňování z biodegradabilních hydrogelů byl pro svoji poměrně dobrou rozpustnost ve vodě ($12,78 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ při teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$) vybrán paracetamol, který je z hlediska vzhledu bílý krystalický prášek. Systematický název paracetamolu (acetaminofenu) je *N*-(4-hydroxyfenyl)ethanamid. Paracetamol patří mezi deriváty anilinu. Jedná se v dnešní době o nejpoužívanější volně dostupné analgetikum a antipyretikum. Svoji oblibu si pravděpodobně získal vzhledem ke své vysoké účinnosti při relativně nízké toxicitě. Při předávkování je hepatotoxický. Paracetamol se používá k tlumení

bolestí různého původu (bolesti hlavy, zubů, kloubů, svalů, bolesti doprovázející revmatická onemocnění, neuralgie, bolesti páteře, menstruační bolesti) a také ke snížení zvýšené teploty. Podstatou jeho léčebného účinku je inhibice enzymu cyklooxygenázy. Na českém trhu ho lze koupit jako léčiva pod názvy ATARALGIN, COLDREX, FEBRISAN, PANADOL, PARALEN [97].

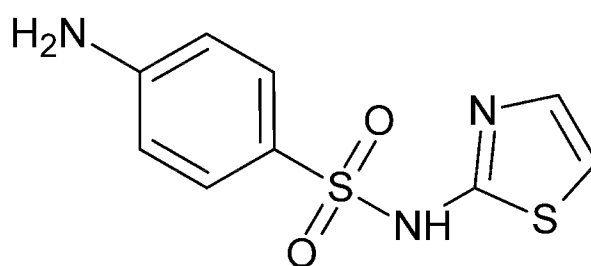


Obrázek 19 – Strukturální vzorec paracetamolu

2.9.3.2 Sulfathiazol

Sulfathiazol patří do skupiny sulfonamidových antibiotik. Sulfonamidová antibiotika jsou deriváty paraaminobenzosulfonamidu, obsahující benzenové jádro s amino skupinou ($-NH_2$) a sulfonamidovou skupinou ($-SO_2NH_2$). Sulfonamidy jsou amfoterní látky, jejichž hodnota pH se pohybuje v rozmezí 4,5 – 9. Vzhledem k N-H vazbě přítomné v sulfonamidové skupině se chovají jako slabé kyseliny. Podstata mechanismu účinku sulfonamidů určuje jejich podobnost se strukturou kyseliny *p*-aminobenzoové, kterou mikroorganismy potřebují pro syntézu esenciální kyseliny listové. Bakterie potřebují k buněčnému dýchání a růstu kyselinu dihydrolistovou, kam se právě zabudovává kyselina *p*-aminobenzoová. Vytěsnění kyseliny *p*-aminobenzoové a její nahrazení *p*-aminobenzosulfonamidem vede v konečném důsledku ke smrti mikroorganismů [98].

Jako druhé modelové léčivo z této skupiny byl pro svoji nižší rozpustnost ve vodě ($373 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$) zvolen zástupce sulfonamidových antibiotik, sulfathiazol. Sulfathiazol, jehož systematický název je (4-amino-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)benzensulfonamid, se aplikuje pouze lokálně, a to především u infikovaných popálenin, bércových vředů, omrzlin a odřenin [99].



Obrázek 20 – Strukturální vzorec sulfathiazolu

2.10 Finální stanovení léčiv

Na základě poznatků z odborné literatury lze konstatovat, že nejčastěji jsou pro stanovení paracetamolu a sulfathiazolu využívána kapalinová a plynová chromatografie, případně elektromigrační metody.

Pro stanovení výše zmiňovaných léčivých látek byla v minulosti nejčastěji používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV detektory typu diodového pole

[100-108]. V případě derivatizace sulfonamidových antibiotik lze úspěšně použít i fluorescenční detektor (FLD) [109]. Rozvoj v oblasti ionizačních technik (hmotnostní spektrometrie) a neustálé požadavky na zajištění nižších limitů detekce a kvantifikace, vedly ke spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Toto spojení je v současnosti již rutinně používáno pro analýzu léčiv izolovaných z environmentálních matric. Ve většině případů spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je jako ionizační technika používán elektrosprej.

V literatuře jsou nejčastěji uváděny následující analyzátoři pro stanovení léčivých látek: trojitý kvadrupól, kombinace trojitého kvadrupólu a lineární iontové pasti (QQQ-LIT), spojení kvadrupólového analyzátoru a analyzátoru doby letu (Qq-TOF) a kombinace lineární iontové pasti a Orbitrapu (LIT-Orbitrap). Přehled LC/MS metod pro stanovení paracetamolu uvádí *příloha 1* a pro stanovení sulfathiazolu *příloha 2*.

Vysoká spotřeba rozpouštědel pro přípravu mobilní fáze a dlouhé doby jednotlivých analýz vedou však k postupnému přechodu z vysokúčinné kapalinové chromatografie HPLC (z angl. high performance liquid chromatography) na ultra účinnou kapalinovou chromatografii UHPLC (z angl. ultra high performance liquid chromatography), u které je aplikována nová generace kolon. Tyto kolony jsou tvořeny hybridními částicemi, které jsou menší jak 2 μm . Částice, jejichž průměrná velikost se pohybuje okolo 1,7 μm , vyžaduje pracovat za dvojnásobně vysokých tlaků, než je tomu u konvenční HPLC. Tím dochází k rapidnímu zkrácení jednotlivých dob analýz a ke snížení spotřeby rozpouštědel.

Sulfathiazol i paracetamol lze úspěšně stanovit i plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, GC-MS/MS) za podmínky, že je vzorek před vlastní analýzou derivatizován. V případě derivatizace těchto látek je aktivní vodík obsažený v hydroxy- a amino- skupině nahrazen za jinou charakteristickou skupinu, čímž se sníží tvorba vodíkových můstků mezi těmito funkčními skupinami a zvýší se těkavost nově vzniklé sloučeniny. Pro derivatizaci těchto látek se nejčastěji používá alkylace, při níž dochází k náhradě aktivního vodíku za alkyl, nejčastěji methyl. V případě derivatizace sulfathiazolu se alkylace (methylace) provádí za přítomnosti diazomethanu [110, 111]. Paracetamol lze derivatizovat také pomocí silylace, kdy dochází k náhradě vodíku různou methylovanou silyl skupinou. Nejčastější činidla používaná pro silylaci paracetamolu jsou následující: *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), trimethylchlorsilan (TMCS), *N*-methyl-*N*-terc-butylodimethylsilyl-trifluoroacetamid (MTBSTFA), terc-butylodimethylchlorsilan (TBDMCS), případně jejich směsi [112-114]. V paracetamolu lze obsaženou hydroxy- skupinu také derivatizovat pomocí pentafluorbenzylbromidu (PFB-Br), a to v prostředí bezvodého acetonitrilu za vzniku etherového derivátu *N*-{4-[(pentafluorbenzyl)oxy]fenyl}acetamidu [115, 116]. Vhodnými kolonami pro plynovou chromatografii jsou nejčastěji dlouhé křemenné kapiláry potažené tenkým polymerním filmem. Pro separaci paracetamolu a sulfathiazolu jsou převážně používány kapilární kolony s filmem obsahujícím 5 % fenylu a 95 % methylpolysiloxanu [111, 112, 115, 116], 5 % difenylu a 95 % dimethylpolysiloxanu [116], 100 % dimethylpolysiloxanu [110, 117], nebo fenyl arylenu [113]. Podobně jako u kapalinové chromatografie, se pro stanovení sledovaných léčiv ve spojení s plynovou chromatografií používají MS detektory [110, 112, 113, 115-118], avšak v případě sulfathiazolu lze aplikovat také i detektor elektronového záhytu nebo atomově emisní detektor [111].

Při stanovení paracetamolu a sulfathiazolu lze úspěšně využít i elektromigrační techniky. Pro studované látky jsou nejčastěji uváděny techniky kapilární elektroforézy [119-130], a to izotachofóza, micelární elektrokinetická chromatografie [131] a kapilární zónová

elektroforéza [132-136], ve spojení s UV [122, 123, 129], chemiluminiscenční [120], elektrochemickou [124, 127, 130], a hmotnostní detekcí [123, 136, 137]. Rovněž 2D spojení izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy s ionizační technikou elektrosprejem a hmotnostní detekcí představuje atraktivní alternativu k chromatografickým technikám, a to vzhledem k jednoduchosti, separační účinnosti, univerzálnosti a nízkému objemu použitých kapalin [138].

3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této dizertační práce je sledování uvolňování léčivých látek z biodegradabilních hydrogelů. Prvním typ hydrogelu je založen na tepelně citlivém triblokovém kopolymeru PLGA-PEG-PLGA, který je tvořen hydrofobní poly(mléčnou) a poly(glykolovou) kyselinou (PLGA) a hydrofilním polyethylenglykolem (PEG). Druhý typ hydrogelu je založen na modifikaci PLGA-PEG-PLGA kopolymeru anhydridem kyseliny itakonové (ITA) (ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA). Modifikací získávají konce řetězce kopolymeru karboxylové skupiny, které mohou ovlivňovat celkovou hydrofobicitu kopolymerního řetězce a následně i profil uvolňování léčivých látek.

Jednotlivé kroky předkládané dizertační práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Volba nízkomolekulárních modelových léčiv rozdílného lipofilního charakteru.
- Vytvoření a optimalizace LC/MS metod pro stanovení vybraných léčiv.
- Výběr PLGA-PEG-PLGA a ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA kopolymerů s vhodnými poměry PLGA/PEG s podmínkou tvorby gelu při teplotě 37 °C.
- Reologická charakterizace systému hydrogel-léčivo ve vodě a v PBS o hodnotě pH 7,4.
- Posouzení vlivu přídavku léčiva na celkovou stabilitu systému hydrogel-léčivo.
- Prodloužení liberace léčiva přídavkem nanočástic hydroxyapatitu.
- Ověření vhodnosti kinetického modelu, který byl vybrán na základě literární rešerše pro popis uvolňování hydrofobního léčiva.
- Návrh jiného regresního modelu pro popis uvolňování léčiv a jeho ověření.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje, zařízení, software

Tabulka 4: Přehled přístrojů použitých k analýze

Technika	Název	Specifikace MS	Výrobce	Ovládací software
HPLC	Agilent 1 100 Series	–	Agilent, USA	ChemStation Rev. A 02.01
MS	Agilent 6 320 Series	ESI-iontová past	Agilent, USA	Agilent 6300 Ion Trap LC/MS verze 6.2
HPLC	Waters 2 695	–	Waters, USA	MassLynx™ verze 4.0
MS	Quatro Micro™ API	ESI-QQQ	Waters, USA	MassLynx™ verze 4.0

4.1.1 Přístroje použité k přípravě vzorků

- analytické váhy KERN 770, Version 2.3, Německo
- pH metr 730, WTW series, inoLab, Německo
- magnetická míchačka s ohřevem a elektrickým kontaktním teploměrem IKA ETS-D5, Německo
- Ultrazvuková vodní lázeň, typ Teson 4, Tesla, Česká republika
- infuzní pumpa kdS 9 100, kdScientific, USA
- digitální inkubátor INCU-Line IL-10, VWR, Slovinsko
- běžné laboratorní vybavení

4.1.2 Software pro zpracování a prezentaci dat

- ChemStation Rev. A 02.02
- Data Analysis for 6 300 Series Ion Trap LC/MS verze 4.0
- MassLynx™ verze 4.0
- OriginPro 8
- CorelDRAW 2018
- Microsoft Excel 2010
- Microsoft Word 2010

4.2 Použité chemikálie a standardy

4.2.1 Chemikálie

- ledová kyselina octová, čistota HPLC, Fisher Scientific, UK
- acetonitril, čistota gradient grade for HPLC, Lach:ner, Česká republika
- dihydrogenfosforečnan draselný, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo
- hydrogendifosforečnan sodný, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo
- nanohydroxyapatit (nHAp) připravený Ing. Klárou Částkovou, Ph.D. pomocí

hydrotermálního mletí, CEITEC VUT Brno, Česká republika

- deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q Academic firmy Millipore o specifické vodivosti $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ při teplotě $24 \text{ }^\circ\text{C}$
- chlorid sodný, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo
- chlorid draselný, čistota $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- kyselina chlorovodíková, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo

4.2.2 Standardy

- Sulfathiazol, čistota $\geq 99 \%$, Sigma-Aldrich, Německo
- Paracetamol, čistota $\geq 99 \%$, Sigma-Aldrich, Německo

4.2.3 Charakterizace kopolymerů použitých jako nosiče pro léčiva

4.2.3.1 PLGA-PEG-PLGA kopolymer

- PLGA-PEG-PLGA kopolymer byl připravený Ing. Ivanou Chamradovou, Ph.D., prostřednictvím polymerace otevřeného kruhu (CEITEC, Brno) podle Michlovské a kol. [13]
- **Parametry kopolymeru pro testování koncentrace 22 hm./obj. %:**
 - poměr (PLGA/PEG) = 2,0
 - poměr (LA/GA) = 2,9
 - $M_n = 4\,500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 - polydisperzita PDI = 1,15
- **Parametry kopolymeru pro testování koncentrace 12 hm./obj. %:**
 - poměr (PLGA/PEG) = 2,4
 - poměr (LA/GA) = 2,9
 - $M_n = 5\,050 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 - polydisperzita PDI = 1,15

4.2.3.2 ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA kopolymer

- ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA kopolymer byl připravený Ing. Ivanou Chamradovou, Ph.D., prostřednictvím polymerace otevřeného kruhu (CEITEC, Brno) podle Michlovské a kol. [13]
- **Parametry kopolymeru pro testování koncentrace 22 hm./obj. %:**
 - poměr PLGA/PEG = 2,4
 - poměr LA/GA = 2,9
 - $M_n = 5\,200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 - polydisperzita PDI = 1,15

4.2.4 Sledované analyty

4.2.4.1 Sulfathiazol

- Chemicky: 4-amino-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid ($\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$)
- $M_r = 255,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je nerozpustný ve vodě, špatně rozpustný v 96% ethanolu, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

4.2.4.2 Paracetamol

- Chemicky: *N*-(4-hydroxyfenyl)ethanamid ($\text{CH}_3\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{OH}$)
- $M_r = 151,165 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Bílý krystalický prášek slabě hořké chuti. Je dobře rozpustný ve vodě, methanolu, ethanolu, dimethylformamidu, chlorethanu, acetonu a ethylacetátu. Je slabě rozpustný v etheru a prakticky nerozpustný v benzenu a pentanu.

4.3 Design testu

V této práci byl testován termocitlivý kopolymer PLGA-PEG-PLGA (ABA) a jeho funkcionalizovaná forma ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA (ITA/ABA/ITA). Kopolymer ABA byl testován v koncentracích 22 a 12 hm./obj.%, při teplotě lidského těla (37 °C). První zvolená koncentrace (22 hm./obj.%) ABA i ITA/ABA/ITA byla použita pro svoji schopnost tvorby tuhého gelu (ABA poměry PLGA/PEG = 2,0; LA/GA = 2,9; ITA/ABA/ITA poměry PLGA/PEG = 2,4; LA/GA = 2,9) pro otestování uvolňování léčiv. Zvolené koncentrace kopolymerů byly vybrány na základě předchozí řešené studie, jejichž výsledky autorka dizertační práce publikovala v roce 2016 [14].

Druhá nižší koncentrace ABA kopolymeru (12 hm./obj.%) byla zvolena z důvodu testování uvolňování léčiv z ABA kopolymeru v kombinaci s nanohydroxyapatitem (nHAp). Tato koncentrace i poměry PLGA/PEG = 2,4, LA/GA = 2,9 byly zvoleny na základě studie Ing. Ivany Chamradové Ph.D., která již byla publikována v roce 2017 [15].

Volba testovaných koncentrací v případě léčiva paracetamolu (PCM) vycházela z jeho velmi dobré rozpustnosti ve vodě. Za výchozí koncentrace PCM byly zvoleny 5 a 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dalšími koncentracemi PCM bylo zvoleno ekvimolární množství léčiva k množství kopolymeru a také dvojnásobek ekvimolárního množství léčiva. V případě volby koncentrace sulfathiazolu bylo vycházeno z podobné úvahy. Přehled testovaných koncentrací léčiv a kopolymerů je uveden v *tabulce 5*. Výpočty navážek pro ekvimolární množství vycházely z M_n kopolymerů.

Tabulka 5: Přehled testovaných koncentrací léčiv a kopolymerů

Kopolymer	Paracetamol ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)				Sulfathiazol ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)		
	5	7,4*	10	14,7**	5	-	-
ABA 22 hm./obj.%	5	7,4*	10	14,7**	5	-	-
ABA 12 hm./obj.%	3,5*	5	7**	-	5	6**	10
ITA/ ABA /ITA 22 hm./obj. %	5	6,4*	10	13**	5	11	-

Pozn.

* ekvimolární množství

**2 x ekvimolární množství

4.4 Složení rozpouštědel/inkubačních médií

Jako první testované rozpouštědlo/inkubační médium byla zvolená voda. Jednalo se o deionizovanou vodu, která byla upravená přístrojem Milli-Q Academic firmy Millipore o specifické vodivosti $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ při teplotě $24 \text{ }^\circ\text{C}$. V této práci je toto používané médium označené jako Milli-Q voda.

Druhým testovaným rozpouštědlem/inkubačním médiem byl zvolen pufovaný fyziologický roztok, označovaný v této práci zkráceně jako PBS (z angl. phosphate buffered saline). PBS byl vždy připravován tak, aby obsahoval 137 mM NaCl , $2,6 \text{ mM KCl}$; $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ a $1,7 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$. Po rozpuštění všech použitých solí v 800 ml Milli-Q vody a homogenizaci připraveného objemu, bylo pH roztoku upraveno pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové na hodnotu pH $7,4$. Následně byl takto upravený roztok doplněn na objem 1 litru a skladován v chladicím boxu při teplotě $4\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ [139].

4.5 Příprava vzorků pro sledování uvolňování léčiv

4.5.1 Příprava vzorků pro sledování uvolňování paracetamolu

Příslušné vypočtené množství xerogelu kopolymeru bylo naváženo do vialky. Následně bylo přidáno poloviční množství rozpouštědla (Milli-Q voda, nebo PBS). Směs byla míchána po dobu dvou dnů v ledové lázni při teplotě $4\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, dokud se nevytvořil homogenní kapalný roztok kopolymeru. Do druhé poloviny rozpouštědla pak bylo zamícháno léčivo, které se po kapkách z injekční stříkačky přidávalo do rozpuštěného kopolymeru.

Z takto připraveného roztoku kopolymeru bylo pipetováno $300 \mu\text{l}$ roztoku do další vialky, která byla vložena do inkubátoru. Inkubátor byl předem vytemperován na teplotu $37\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Vialka s roztokem kopolymeru byla ponechána v inkubátoru tak dlouho, dokud se z roztoku kopolymeru nestal gel. Na tuhý gel bylo aplikováno $700 \mu\text{l}$ inkubačního média, mající teplotu rovněž $37\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně byla odpipetována část inkubačního media ($400 \mu\text{l}$) podle zvoleného časového úseku a takto odňatá část byla nahrazena stejným množstvím čerstvého inkubačního roztoku, vytemperovaného opět na teplotu $37\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek odebraný pro daný časový úsek byl uskladněn v chladicím boxu a před samotnou analýzou byl podle potřeby naředěn a analyzován metodou LC/MS.

4.5.2 Příprava vzorků pro sledování uvolňování sulfathiazolu

Příslušné vypočtené množství xerogelu kopolymeru bylo naváženo do vialky. Do stejné vialky byl také navážen sulfathiazol. Následně byla za stálého míchání postupně přikapávána z injekční stříkačky Milli-Q voda nebo jiné příslušné vodné médium. Směs byla míchána po dobu dvou dnů v ledové lázni při teplotě $4\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, dokud se nevytvořil homogenní kapalný roztok kopolymeru obsahující léčivo. Další postup v přípravě a analýze vzorků byl zcela shodný se vzorky pro sledování uvolňování paracetamolu.

4.5.3 LC/MS finální podmínky pro stanovení léčiv

Léčiva byla analyzována pomocí následujících separačních systémů:

- HPLC-ESI-iontová past: kapalinový chromatograf Agilent 1100 s DAD detektorem a hmotnostním spektrometrem Agilent 6320 Series
- HPLC-ESI-trojité kvadrupól: kapalinový chromatograf Waters 2695LC a hmotnostní spektrometr Quatro Micro™ API

Finální optimalizované podmínky jsou uvedeny v *tabulkách 6, 7, 9 a 10*.

Tabulka 6: Parametry HPLC stanovení pro chromatograf Agilent 1100

Kolona	Restek Aqueous C18 (250×4,6 mm; 5 μm)
Složení mobilní fáze	Složka A – 0,1 % CH ₃ COOH Složka B – acetonitril
Průtok mobilní fáze	0,220 ml·min ⁻¹
Izokratická eluce	80 % složka A a 20 % složka B
Nástřik vzorků i standardů	4 μl
Nastavení termostatu kolony	35 °C
Doba analýzy	10 minut

Tabulka 7: Parametry MS stanovení pro hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series

Parametry	Paracetamol	Sulfathiazol
Napětí na kapiláře (kV)	3,5	3,5
Teplota sušícího plynu (°C)	350	350
Průtok sušícího plynu N ₂ (l·h ⁻¹)	10	10
Průtok zmlžovacího plynu N ₂ (psi)	25	25
Detekce	pozitivní ionty	pozitivní ionty
Rozsah skenovaných hmot (m/z)	50 – 200	50 – 300
Cílová hmota (m/z)	152	256

Pro systém HPLC-ESI-iontová past a analyt paracetamol byla prokázána linearita v koncentračním rozsahu 5–1 000 ug·l⁻¹, pro analyt sulfathiazol byla prokázána linearita v koncentračním rozsahu 0,5–1 000 ug·l⁻¹. Pro ověření linearity bylo testováno v případě paracetamolu osm koncentračních úrovní, v případě sulfathiazolu bylo testováno nejméně deset koncentračních úrovní. Paracetamol byl sledován a hodnocen pomocí fragmentací 152 m/z→110 m/z. Sulfathiazol byl posuzován a hodnocen pomocí fragmentací 256 m/z→156 m/z. Meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), rovnice regrese a koeficienty determinace R² pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v *tabulce 8*. Linearita byla hodnocena jako závislost plochy píku (y) na koncentraci analytu (x). Koeficient determinace R² byl u všech stanovovaných léčivých látek vyšší než 0,99.

Tabulka 8: Základní metrologické parametry na přístroji Agilent 1100 Series s hmotnostním spektrometrem Agilent 6320 Series.

Léčivo	Rovnice regrese	R ²	LOD (ug·l ⁻¹)	LOQ (ug·l ⁻¹)
Paracetamol	$y = 5\,343,96x + 157\,972,1$	0,9981	1,331	4,437
Sulfathiazol	$y = 150\,641,5x + 1\,862\,290,8$	0,9976	0,1564	0,5213



Obrázek 21 – HPLC Agilent 1100 Series s DAD detektorem a hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series

Tabulka 9: Parametry HPLC stanovení pro chromatograf Waters 2695LC

Kolona	Restek Aqueous C18 (250×4,6 mm; 5 μm)
Složení mobilní fáze	Složka A – 0,1 % CH ₃ COOH Složka B – acetonitril
Průtok mobilní fáze	0,220 ml·min ⁻¹
Izokratická eluce	80 % složka A a 20 % složka B
Nástřik vzorků i standardů	20 μl
Nastavení termostatu kolony	35 °C
Doba analýzy	5 minut

Tabulka 10: Parametry MS stanovení pro hmotnostní spektrometr Quatro Micro™ API

Parametry	Paracetamol	Sulfathiazol
Napětí na kapiláře (kV)	3	3
Teplota iontového zdroje (°C)	125	125
Teplota sušícího plynu (°C)	300	300
Napětí na skimmeru (V)	28	25
Napětí na extraktoru (V)	4	3
Napětí na RF elektrodách (V)	0,1	0,1
Průtok sušícího plynu N ₂ (l·h ⁻¹)	1 100	900
Průtok zmlžovacího plynu N ₂ (l·h ⁻¹)	10	10
Detekce	pozitivní ionty	pozitivní ionty
MS/MS kolizní energie (eV)	17	16
Nastavení MRM (m/z)	152 → 110; 152 → 92,1	256 → 156

Pro systém HPLC-ESI-trojité kvadrupol a analyt paracetamol byla prokázána linearita v koncentračním rozsahu 1–150 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pro analyt sulfathiazol byla prokázána linearita v koncentračním rozsahu 0,5–200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro ověření linearity bylo testováno nejméně osm koncentračních úrovní pro každý analyt. Paracetamol byl sledován a hodnocen pomocí fragmentací 152 $m/z \rightarrow 110 m/z$. Sulfathiazol byl sledován a hodnocen pomocí fragmentací 256 $m/z \rightarrow 156 m/z$. Meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), rovnice regrese a koeficienty determinace R^2 pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v *tabulce 11*. Linearita byla hodnocena jako závislost plochy píku (y) na koncentraci analytu (x). Koeficient determinace R^2 byl u všech stanovovaných léčivých látek vyšší než 0,999, což prokazuje dobrou linearitu.

Tabulka 11: Základní metrologické parametry měření na přístroji HPLC Waters 2695LC s hmotnostním spektrometrem Quatro Micro™ API.

Léčivo	Rovnice regrese	R^2	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Paracetamol	$y = 182,22x + 341,25$	0,9991	0,2356	0,7852
Sulfathiazol	$y = 1\,064,93x + 677,41$	0,9996	0,1454	0,4847



Obrázek 22 – HPLC Waters 2695LC s hmotnostním spektrometrem Quatro Micro™ API

4.6 Dynamická reologická analýza

Termosenzitivní a mechanické vlastnosti kopolymerů PLGA-PEG-PLGA a ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA byly stanoveny pomocí dynamického napětově řízeného reometru (AR-2 TA Instruments, USA) s geometrií kužel-deska o úhlu 2° , průměru 40 mm a mezerou 60 μm . Před každým měřením byl žlábek kuželu naplněn vodou tak, aby nedocházelo k odpaření roztoku a nepřesnosti výsledků. Měření probíhalo v dynamickém oscilačním módu s úhlovou frekvencí 1 rad/s s teplotní rampou od 20 do 60 $^\circ\text{C}$, při zvyšování teploty 0,5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ a při smykovém napětí 0,4 Pa [15].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stabilita hydrogelů s testovanými léčivy

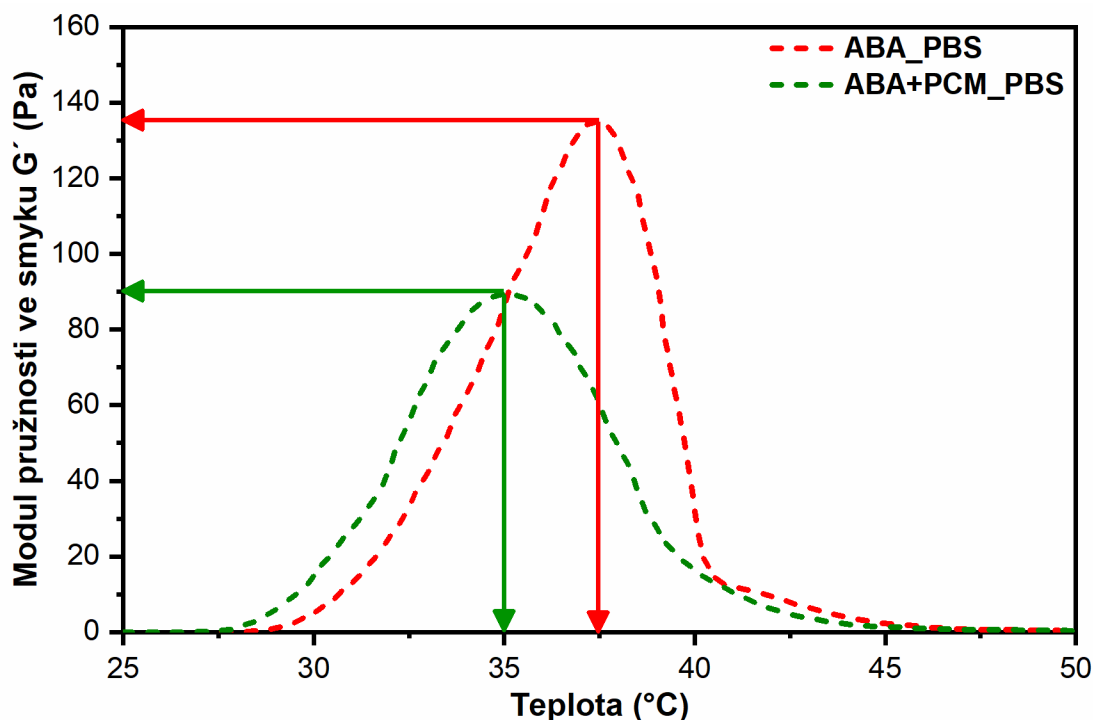
Během testů uvolňování léčiva byla zároveň pozorována stabilita hydrogelů, na které také závisí samotné uvolňování léčivé látky.

5.1.1 Stabilita hydrogelů s paracetamolem

Vizuálně bylo pozorováno, že přidavek paracetamolu do roztoku kopolymeru snižuje kritickou gelační teplotu (CGT z angl. Critical Gelation Temperature) celého systému.

Změna termocitlivých vlastností systému byla ověřena pomocí dynamické reologické analýzy. Pro potřeby reologického měření byl připraven 22 hm./obj.% roztok kopolymeru typu ABA v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS pH=7,4) a 22 hm./obj.% roztok ABA kopolymeru ve stejném médiu s přidavkem paracetamolu o koncentraci 10 mg·ml⁻¹. Z *obrázku 23* je patrné, že přidavek paracetamolu do 22 hm./obj.% ABA roztoku kopolymeru snižuje tuhost gelu. Maximální tuhost hydrogelu při gelační teplotě 35 °C 22 hm./obj.% ABA roztoku kopolymeru s paracetamolem v prostředí PBS byla nižší (89,4 Pa), než maximální tuhost hydrogelu bez léčiva (135 Pa) při teplotě 37,5 °C.

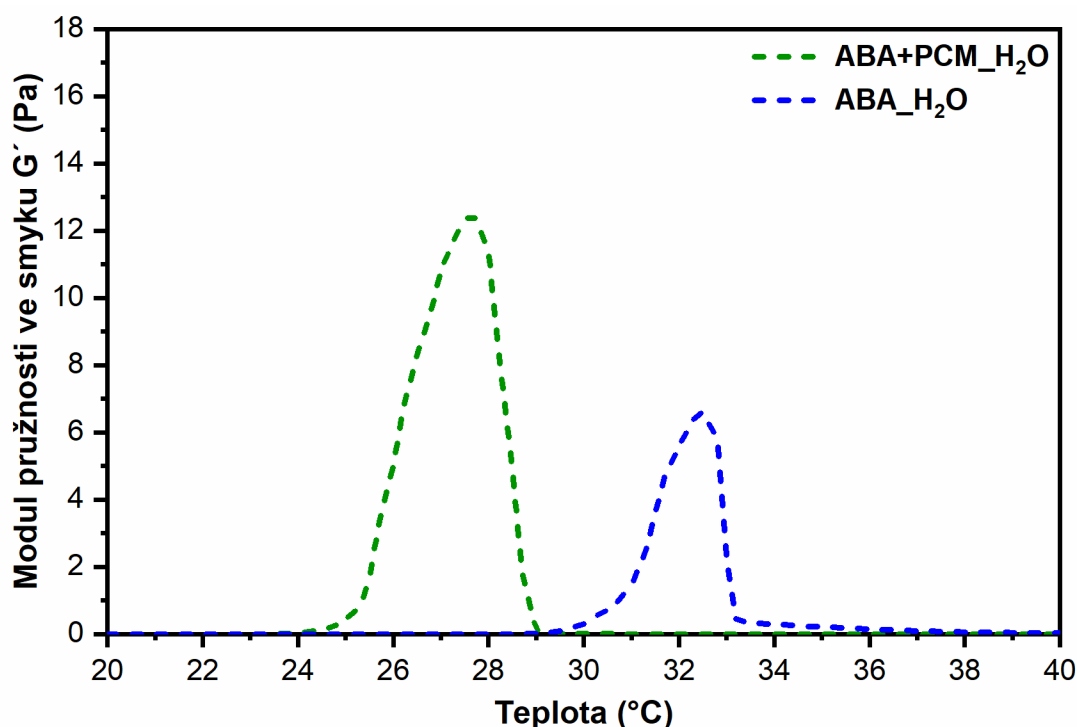
Nižší tuhost hydrogelu připraveného v PBS s obsahem hydrofilního léčiva může být vysvětlena přesycením systému ionty rozpouštědla PBS a samotného hydrofilního léčiva, které snižuje schopnost micelizace založeného na poměru hydrofilní/hydrofobní části kopolymerů. Snížením hydrofobních interakcí mezi micelami, v našem případě přidáním hydrofilního léčiva může být proces micelizace narušen. Nižší tuhost ABA hydrogelu s paracetamolem v médiu PBS tak přispěla i k nižší stabilitě hydrogelu během testů s uvolňováním léčiva.



Obrázek 23 – Zobrazení posunu gelační teploty a změny hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 22 hm./obj. % kopolymer typu ABA připraveného v PBS s přidavkem paracetamolu (PCM) a bez přidavku léčiva

Další aspekt, který byl u stability hydrogelů pozorován, byla vyšší stabilita hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě s paracetamolem (168 hodin), než hydrogel připravený o stejné koncentraci kopolymeru v PBS se stejnou léčivou látkou (stabilita pouhých 24 hodin). Toto zjištění v podstatě kombinuje několik probíhajících dějů: přidavek paracetamolu do kopolymeru připraveného v PBS snižuje celkovou tuhost systému a zároveň je velice pravděpodobné, že dochází k vyšší fluktuaci iontů a léčiva z prostředí hydrogelu do prostředí inkubačního média, kde je koncentrace léčiva podstatně nižší, než v samotném hydrogelu. Tato fluktuace iontů, pak napomáhá degradaci hydrogelu a snižuje jeho stabilitu.

V případě 22 hm./obj.% ABA kopolymeru připraveného v Milli-Q vodě s PCM měl výsledný roztok kopolymeru hodnotu pH 3,2. Paracetamol (pK_a 9,38) je látka zásadité povahy a při hodnotě pH 3,2 dochází k jeho ionizaci. Vzhledem ke struktuře paracetamolu, která obsahuje elektronegativní prvky, jako jsou kyslík a dusík, může pravděpodobně docházet k tvorbě vodíkových můstků mezi molekulou paracetamolu a $-C=O$ skupinou polymléčné kyseliny. Pomocí dynamického reologického měření byla ověřena i vyšší tuhost hydrogelu připraveného v Milli-Q vodě s paracetamolem. Kopolymer 22 hm./obj.% ABA v Milli-Q vodě vykazoval značnou tuhost, a proto pro potřeby reologického měření musela být zvolena nižší koncentrace kopolymeru a to 10 hm./obj.%. Z obrázku 24 je patrné, že kopolymer připravený v Milli-Q vodě bez paracetamolu vykazuje nižší tuhost (6,6 Pa) při gelační teplotě 32,5 °C. Přidavek PCM do roztoku ABA kopolymeru zvyšuje tuhost hydrogelu (12,4 Pa) při gelační teplotě systému 28 °C.



Obrázek 24 – Porovnání posunu hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 10 hm./obj. % kopolymer typu ABA připraveného v Milli-Q vodě s přidavkem paracetamolu (PCM) a bez přidavku léčiva

Podobné trendy stability byly pozorovány i u 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu s paracetamolem, jeho stabilita v Milli-Q vodě byla zaznamenána po dobu 96 hodin, stabilita v prostředí PBS pouhých 8,5 hodiny. Po přidání léčiva byla zaznamenána i změna pH celého systému, neboť PCM je látka zásadité povahy. Přehled stabilit ABA i ITA/ABA/ITA hydrogelů a hodnot pH po přidání paracetamolu je uveden v *tabulce 12*.

Tabulka 12: Přehled stability a hodnot pH 22 hm./obj.% ABA a ITA/ABA/ITA hydrogelů s paracetamolem (PCM) v různých prostředích (rozpuštědlo/inkubační médium).

prostředí	ABA+PCM		ITA/ABA/ITA+PCM		
	pH	stabilita (hod)	pH	stabilita (hod)	
Milli-Q voda	2,8*	3,2	2,8*	2,8	96
PBS	3,7*	5,3	3,7*	3,8	8,5

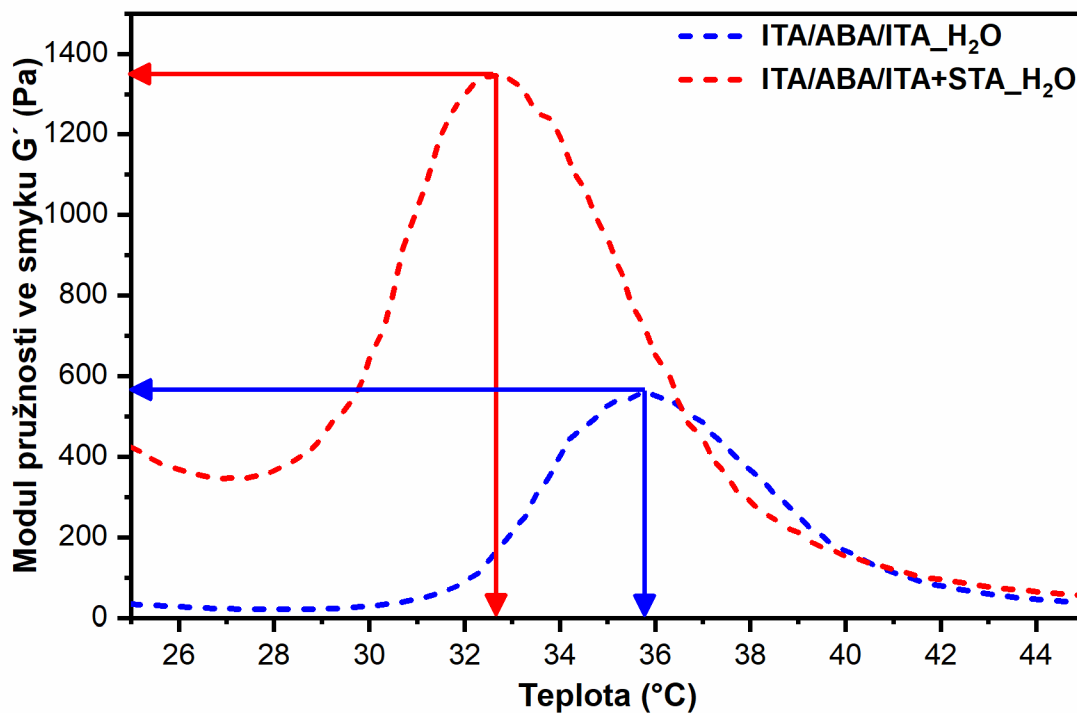
Pozn. pH* - hodnota pH roztoku kopolymeru před přidáním léčiva

5.1.2 Stabilita hydrogelů s hydrofobním léčivem sulfathiazolem (STA)

Stabilita připraveného 22 hm./obj.% ABA hydrogelu s léčivem sulfathiazolem (STA) byla 48 hodin bez ohledu na zvolené rozpouštědlo. Stabilitu hydrogelů připravených v PBS i v Milli-Q vodě lze odůvodnit vysokou koncentrací kopolymeru v roztoku (22 hm./obj.%),

proto je vizuální hodnocení stability hydrogelu velice subjektivní. Hodnota pH měřeném v Milli-Q vodě 22 hm./obj.% ABA roztoku kopolymeru byla 2,9, hodnota pH roztoku kopolymeru připraveném v PBS byla 4,2.

Stabilita hydrogelu 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA připraveného v Milli-Q vodě byla 120 hodin a hodnota pH roztoku kopolymeru se sulfathiazolem měla hodnotu 2,9. Z obrázku 25 je patrné, že přidavek STA do roztoku 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA připraveného v Milli-Q vodě zvyšuje tuhost celého systému a mění i termocitlivé vlastnosti roztoku kopolymeru. Je zřejmé, že funkcionalizovaný kopolymer ITA/ABA/ITA připravený v Milli-Q vodě bez sulfathiazolu vykazuje nižší tuhost (562 Pa) při gelační teplotě 35,8 °C. Přidavek sulfathiazolu do roztoku ITA/ABA/ITA kopolymeru zvyšuje tuhost hydrogelu na (1 383 Pa) při gelační teplotě systému 32,5 °C. Vzhledem ke struktuře sulfathiazolu, která obsahuje elektronegativní prvky, jako jsou kyslík a dusík, je velmi pravděpodobné, že dochází k tvorbě vodíkových můstků mezi molekulou sulfathiazolu (resp. NH_2 - a NH - skupinami) a $-\text{C}=\text{O}$ skupinou polymléčné kyseliny. V případě tvorby vodíkových můstků vzniká v systému více vazeb, a proto hydrogel vykazuje vyšší tuhost.



Obrázek 25 – Zobrazení posunu gelační teploty v maximu tuhosti a změny hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 22 hm./obj. % kopolymer typu ITA/ABA/ITA připraveného v Milli-Q vodě s přidavkem sulfathiazolu a bez přidavku léčiva

Stabilita 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného v PBS se stejným léčivem byla pouhých 24 hodin. Hodnota pH roztoku kopolymeru 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA v PBS se sulfathiazolem byla 3,8. Hodnota pH roztoku 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru připraveného v PBS bez léčiva byla téměř totožná (pH 3,7). Nižší stabilitu lze opět vysvětlit přesycením systému ionty rozpouštědla PBS a samotného léčiva, které omezují micelizaci. Nedostatek hydrofobních interakcí mezi micelami, tak snižuje celkovou tuhost systému.

Tabulka 13: Přehled stability a hodnot pH 22 hm./obj.% ABA a ITA/ABA/ITA hydrogelu se sulfathiazolem (STA) v různých prostředích (rozpuštědlech/inkubačních médiích).

prostředí	ABA+STA			ITA/ABA/ITA+STA		
	pH		stabilita (hod)	pH		stabilita (hod)
Milli-Q voda	2,8*	2,9	48	2,8*	2,9	120
PBS	3,7*	4,2	48	3,7*	3,8	24

Pozn. pH* - hodnota pH roztoku kopolymeru před přidáním léčiva

5.1.3 Stabilita ABA hydrogelů s léčivou a nanohydroxyapatitem (nHAp)

Na základě výsledků z předcházejících experimentů je patrné, že uvolňování léčivé látky, která je do kopolymeru přidána fyzikálně, je přímo závislé na tuhosti a stabilitě systému. Pro zvýšení tuhosti hydrogelu a jeho celkové stability byl přidán nanohydroxyapatit (nHAp) v koncentraci 0,5 hm.%. Koncentrace nHAp byla zvolena na základě výzkumu Ing. Ivany Chamradové Ph.D. [15]. Snížení koncentrace kopolymeru bylo nutné pro vytvoření reprezentativního vzorku pro další popis mechanismu uvolňování léčiv.

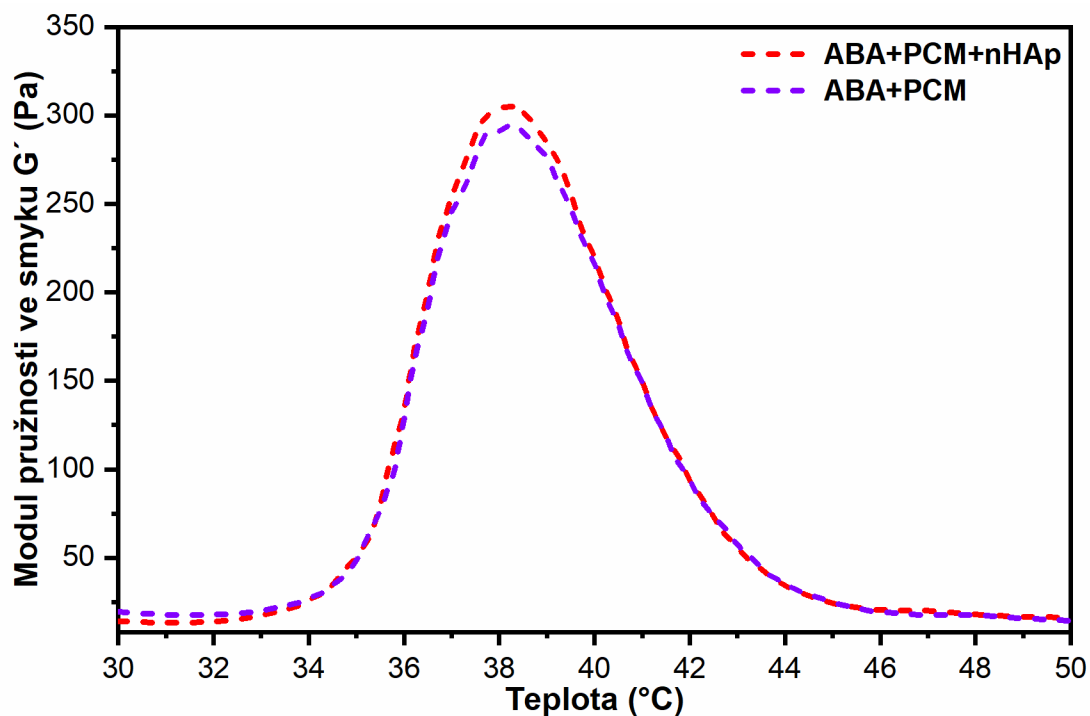
Připravený 12 hm./obj.% roztok ABA v PBS s přidavkem paracetamolu vykazoval stabilitu 96 hodin, hodnota pH roztoku byla 6,1. Přídavek nHAp do systému zvýšil pH na hodnotu 6,6 a značně posunul stabilitu na 168 až 240 hodin.

Připravený 12 hm./obj.% roztok ABA v PBS s přidavkem sulfathiazolu vykazoval stabilitu 120 až 144 hodin, hodnota pH roztoku byla 4,1. Přídavek nHAp do systému zvýšil hodnotu pH na 4,8 a zvýšil stabilitu na 648 hodin, tj. 27 dní.

Tabulka 14: Přehled stability a hodnot pH 12 hm./obj.% ABA hydrogelu připraveného v PBS s přidavky nanohydroxyapatitu (nHAp) a léčivými látkami.

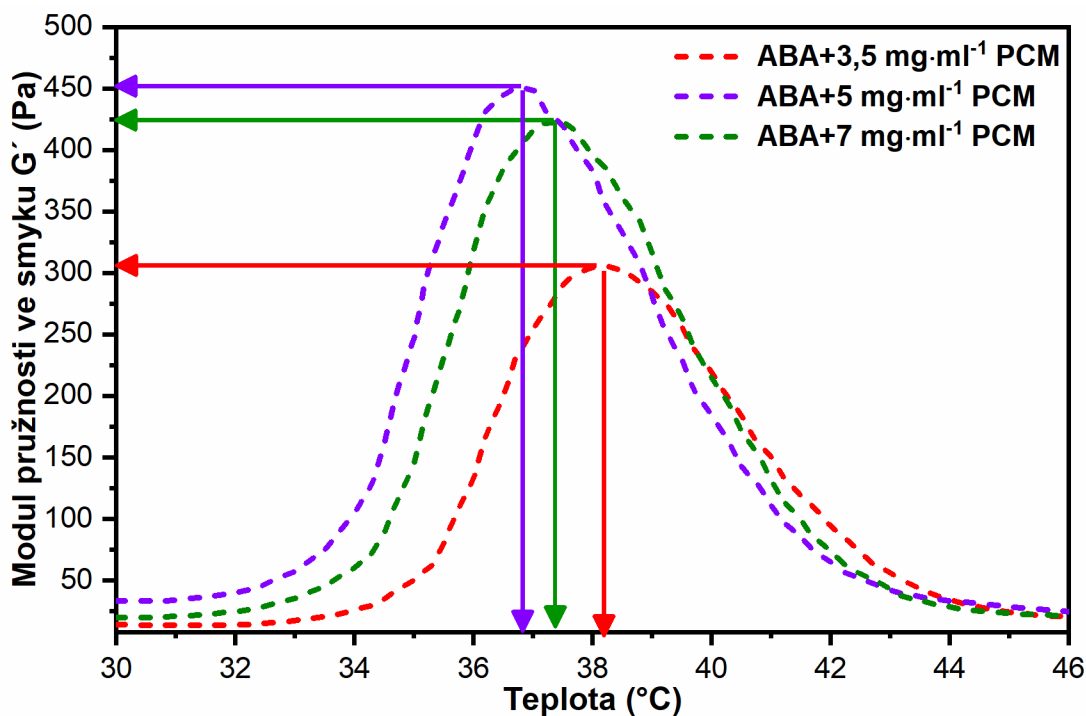
12 hm./obj.% ABA	pH	stabilita (hod)
+ PCM	6,1	96
+ PCM + nHAp	6,6	168 až 240
+ STA	4,1	120 až 144
+ STA + nHAp	4,8	648

Z dynamické reologické analýzy 12 hm./obj.% ABA kopolymeru připraveného v PBS s paracetamolem a s nHAp vyplývá, že přídavek nanohydroxyapatitu již výrazně nemění tuhost gelu ani jeho termocitlivé vlastnosti, viz *obrázek 26*. Nanohydroxyapatit byl do systému přidán v podobě nanočástic, avšak ty mohou agregovat do velikosti mikročástic. Mikročástice hydroxyapatitu již nemají značný vliv na termosensitivitu hydrogelového systému. Zda částice nHAp zůstávají v měřítku nanočástic i po přidání do roztoku kopolymeru již v této práci nebylo ověřeno.



Obrázek 26 – Porovnání hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 12 hm./obj. % roztok kopolymeru typu ABA připraveného v PBS s přidavkem paracetamolu a směsi o stejné koncentraci paracetamolu i s přidavkem nHAp

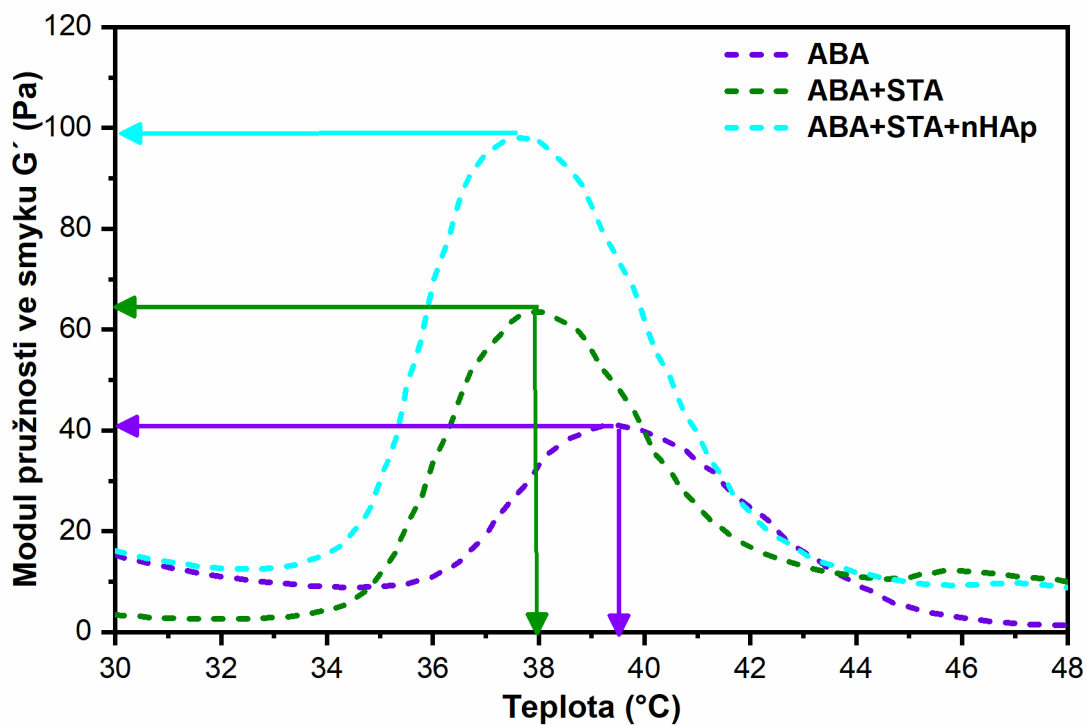
Výraznější vliv na tuhost hydrogelu a jeho termocitlivé vlastnosti měla iontová struktura paracetamolu. Obrázek 27 prezentuje, že se zvyšující se koncentrací paracetamolu ve 12 hm./obj. % roztoku ABA kopolymeru se zvyšuje i tuhost gelu a snižuje se i gelační teplota systémů v maximu tuhosti. Tento trend je pozorován u koncentrace paracetamolu 3,5 a 5 mg·ml⁻¹. Vyšší koncentrace 7 mg·ml⁻¹ paracetamolu již naopak snižuje tuhost systému a gelační teplota se mírně posouvá doprava k vyšším hodnotám. Snižování tuhosti hydrogelu je pravděpodobně důsledkem nasycení systému léčivem, které má již významný vliv na tvorbu vznikajících micel.



Obrázek 27 – Porovnání hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 12 hm./obj. % roztok kopolymeru typu ABA připraveného v PBS s různými koncentracemi paracetamolu

V případě přidavku hydrofobního léčiva sulfathiazolu do 12 hm./obj.% roztoku ABA kopolymeru byla opět zaznamenána vyšší tuhost hydrogelu a posun k nižší gelační teplotě. Přídavek nHAp dále zvyšuje tuhost hydrogelu se sulfathiazolem a také snižuje gelační teplotu. Z provedené dynamické reologické analýzy vyplynulo, že (viz obrázek 28) 12 hm./obj. % roztok kopolymeru typu ABA připraveného v PBS je maximální tuhost $G'_{\max}=40,9$ Pa při teplotě 39,5 °C. Přidáním sulfathiazolu o koncentraci 6 mg·ml⁻¹ do roztoku kopolymeru se tuhost zvyšuje na 63,7 Pa při teplotě gelace 38 °C. Přídavek nanohydroxyapatitu dále zvyšuje tuhost gelu na hodnotu 98 Pa při teplotě gelace 37,7 °C. STA je léčivo kyselé povahy stejně jako kopolymer a tudíž jeho přidavek do systému významně nenarušuje micelizaci.

Vyšší tuhost hydrogelu po přidavku nHAp je způsobena tím, že hydrofobní nanočástice HAp jsou „umístěny“ v jádru micely, což zvyšuje tuhost celého systému.



Obrázek 28 – Porovnání hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 12 hm./obj. % roztok kopolymeru typu ABA připraveného v PBS s přidavkem $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu (ABA + STA) a směsi o stejné koncentraci sulfathiazolu i s přidavkem 0,5 hm.% nanohydroxyapatitu (ABA+STA+nHAp)

5.2 Ověření vhodnosti výběru Korsmeyer-Peppasova model pro uvolňování hydrofobních léčiv

Na základě literární rešerše byl vybrán Korsmeyer-Peppasův model, který popisuje uvolňování léčivé látky z polymerní matrice válcovitého tvaru a to podle rovnice (1):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (1)$$

kde $\frac{M_t}{M_\infty}$ je poměr uvolněného léčiva v čase t ;

k je rychlostní konstanta;

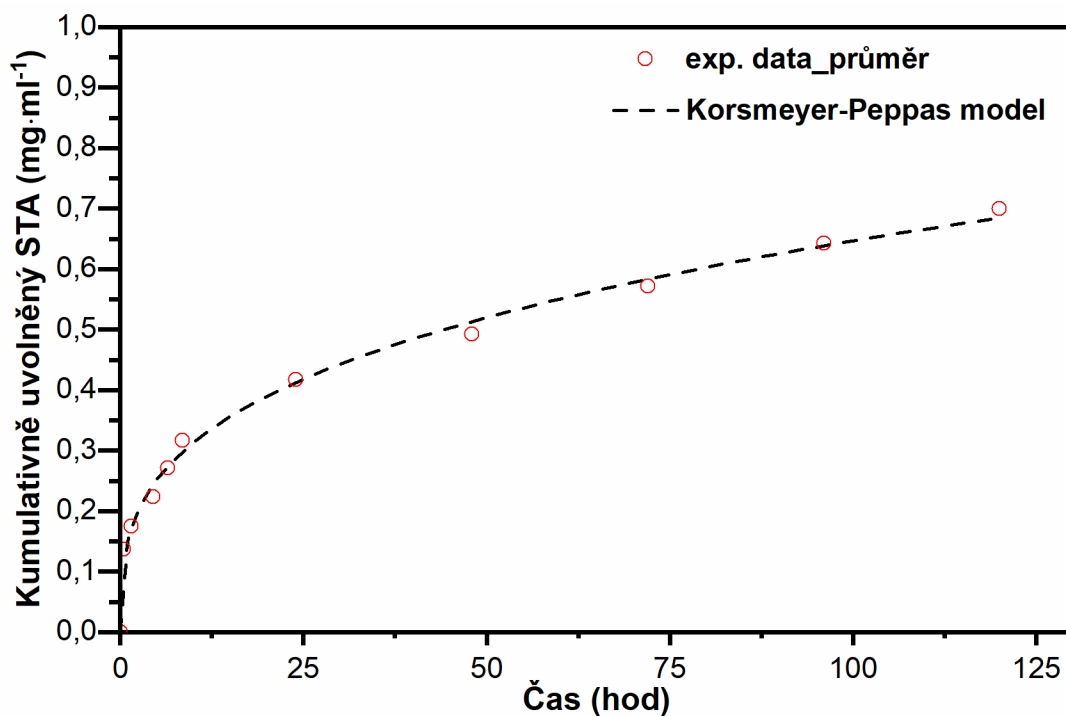
n je exponent uvolňování.

Vhodnost zvoleného matematického modelu musela být prošetřena statistickým testováním hypotéz. Statistické testování hypotéz slouží k ověřování, zda je vybraná hypotéza v souladu s experimentálními daty. Pro statistické otestování naměřených experimentálních dat se zvoleným Korsmeyer-Peppasovým modelem bylo zvoleno spojitě F-rozdělení, které se dříve nazývalo Fisher-Snedecorovo rozdělení.

5.2.1 Postup ověření vhodnosti Korsmeyer-Peppasova modelu

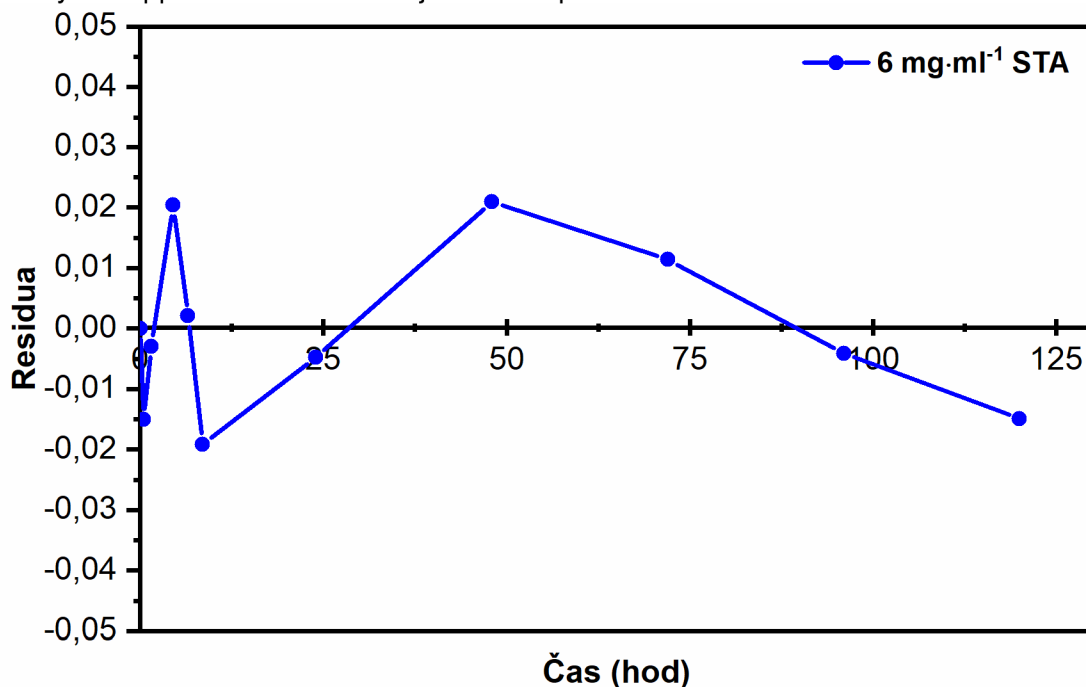
V programu Microsoft Excel byl vytvořen Korsmeyer-Peppasův model podle rovnice (1). Následně byl vytvořen parametr „*Kritérium*“. Vhodné odhady parametrů se získávají metodou nejmenších čtverců, která je založena na minimalizaci tzv. reziduálního součtu čtverců, tj. součtu čtverců rozdílů experimentálních hodnot x od teoreticky vypočtených hodnot y . Parametr „*Kritérium*“ byl vypočten pomocí funkce Excel $\text{SUMXMY2} = \sum (x-y)^2$ [140].

Následně pomocí funkce *řešitel* byly přepočteny hodnoty rychlostní konstanty k a exponent uvolňování n pro Korsmeyer-Peppasův model [140]. Na *obrázku 29* je zobrazen graf s naměřenými experimentálními daty, která jsou proložena Korsmeyer-Peppasovým modelem.



Obrázek 29 – Proložení naměřených experimentálních dat kumulativně uvolněného sulfathiazolu (STA) $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ s Korsmeyer-Peppasovým modelem.

Následně byla zobrazena residua, která se vypočtou jako rozdíl mezi hodnotami skutečně naměřenými a vypočtenými z vybraného modelu. Na obrázku 30 jsou zobrazena residua pro Korsmeyer-Peppasův model vztahující se k experimentu na obrázku 29.



Obrázek 30 – Zobrazení residuí pro Korsmeyer-Peppasův model uvolňování $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ STA

Poté bylo zapotřebí vypočítat kritickou hodnotu F-rozdělení F_c (rovnice (2)) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro daný počet parametrů modelu f_1 a počet stupňů volnosti f_2 . Kritickou hodnotu testu získáme jako příslušný kvantil F-rozdělení s příslušnými stupni volnosti v čitateli a jmenovateli pomocí funkce Excel FINV [140].

Použité parametry:

- hladina významnosti $\alpha = 0,05$
- počet parametrů modelu $f_1 = 2$ (v případě Korsmeyer-Peppasova modelu jsou to: rychlostní konstanta k a exponent uvolňování n , tj. 2)
- počet stupňů volnosti f_2 byl získán jako rozdíl počtu experimentálních hodnot x a počtu parametrů modelu m .

$$F_c = (\alpha, f_1, f_2) \tag{2}$$

Následně byla vypočtena kritická hodnota F-rozdělení pro experimentální hodnoty F_{exp} dle vzorce 3:

$$F_{exp} = \frac{n - m}{m} \cdot \frac{\sum (q_{reg.} - \bar{q})^2}{\sum (q_{reg.} - q_e)^2}; \tag{3}$$

kde:

- m počet parametrů modelu
- n počet experimentálních bodů (dat)
- $q_{reg.}$ vypočtená hodnota z regresního modelu
- \bar{q} průměrná hodnota všech experimentálních dat
- q_e konkrétní experimentální hodnota

Dále musí platit podmínka: $F_{exp.} \geq F_c$

Pokud platí výše uvedená podmínka ($F_{exp} \geq F_c$), bylo dále nezbytné vypočítat kritickou hodnotu odezvy R_c dle vzorce (4), která představuje odhad směrodatné odchylky vypočítaných regresních parametrů a slouží jako kritérium hranic intervalu spolehlivosti.

$$R_c = \text{Kritérium} \cdot \left(1 + \frac{m \cdot F_c(\alpha; f_1; f_2)}{f_2} \right) \tag{4}$$

kde:

- f_1 počet parametrů modelu
- f_2 počet stupňů volnosti
- F_c kritická hodnota F-rozdělení na hladině významnosti $\alpha = 0,05$

Jestliže sledujeme průběh kritériální funkce v závislosti na hodnotě určitého parametru, dostaneme funkci zvanou odezva (na proměnný parametr). Tato funkce má pro každý parametr minimum, které se rovná minimální odezvě (tj. „Kritérium“), a to právě v regresní hodnotě sledovaného parametru.

Pokud se kritická hodnota odezvy R_c zakreslí do grafu odezvy na určitý parametr jako vodorovná linie, pak dva body, ve kterých protne tato linie křivku odezvy, určují hranice

intervalu spolehlivosti pro tento parametr (viz obrázek 31 jsou dva body označeny jako *limity intervalu spolehlivosti*) [140].

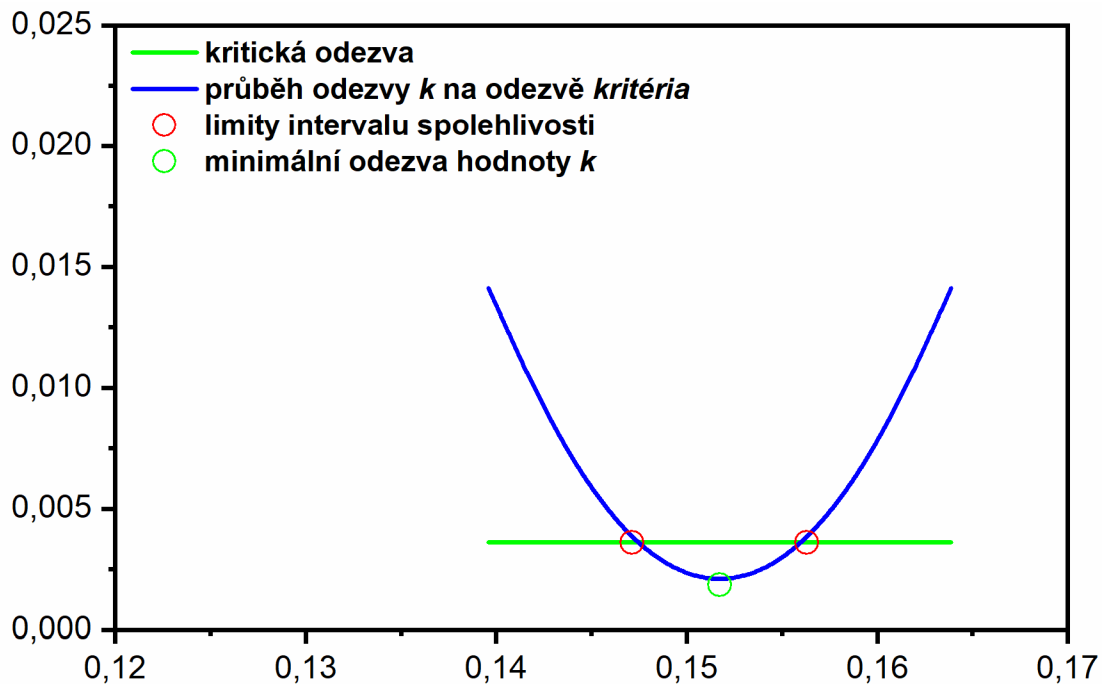
Dalším krokem bylo tedy vypočítat limitní hodnoty odezvy exponentu uvolňování n a rychlostní konstanty k .

Nejdříve byl proveden odhad horní a dolní limitních hodnot. Následně byl vypočten „zbytek“ pomocí Excel funkce SUMXMY2 podle vzorce pro rychlostní k dle vzorce:

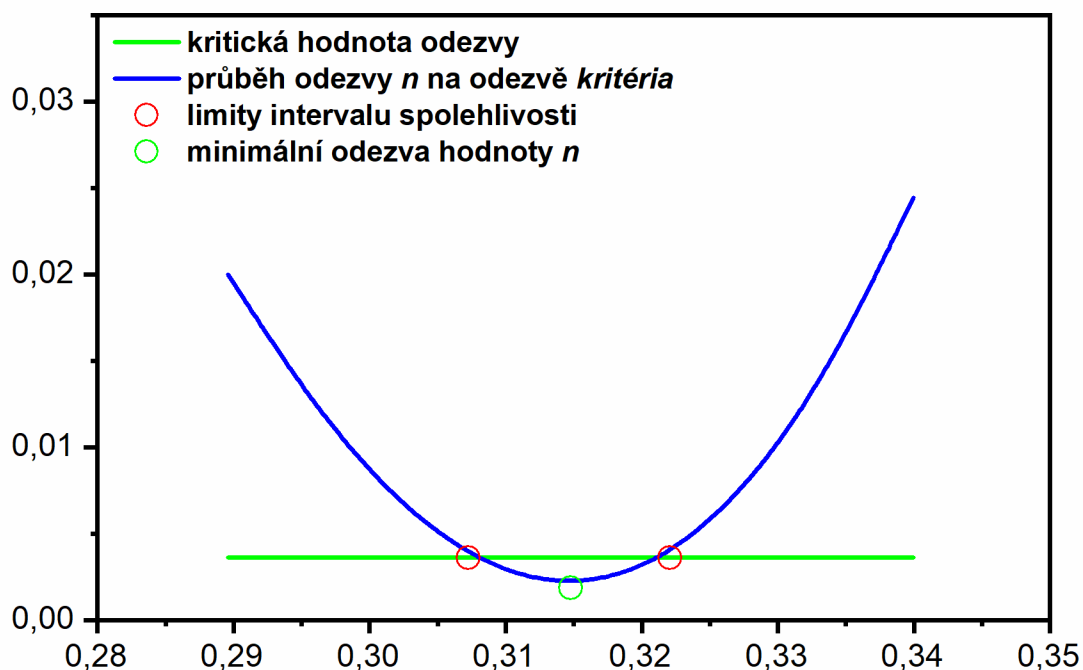
$$\text{„zbytek“} = \Sigma(\text{limitní hodnota odezvy } k \cdot t^n - \text{reálná průměrná hodnota naměřených hodnot})^2 - R_c$$

Pozn. V případě výpočtu „zbytků“ pro odezvu exponentu uvolňování n byly použity ve vzorci limitní hodnoty odezvy n .

Následně byly přepočítány pomocí funkce *řešitel* horní a dolní limitní hodnoty pro daný parametr. V případě, že hodnota čísla „zbytku“ se blížila k nekonečně malému číslu, byl proces ověření vhodnosti nového regresního modelu za ukončený a jednotlivé závislosti byly vyneseny do grafů [140].



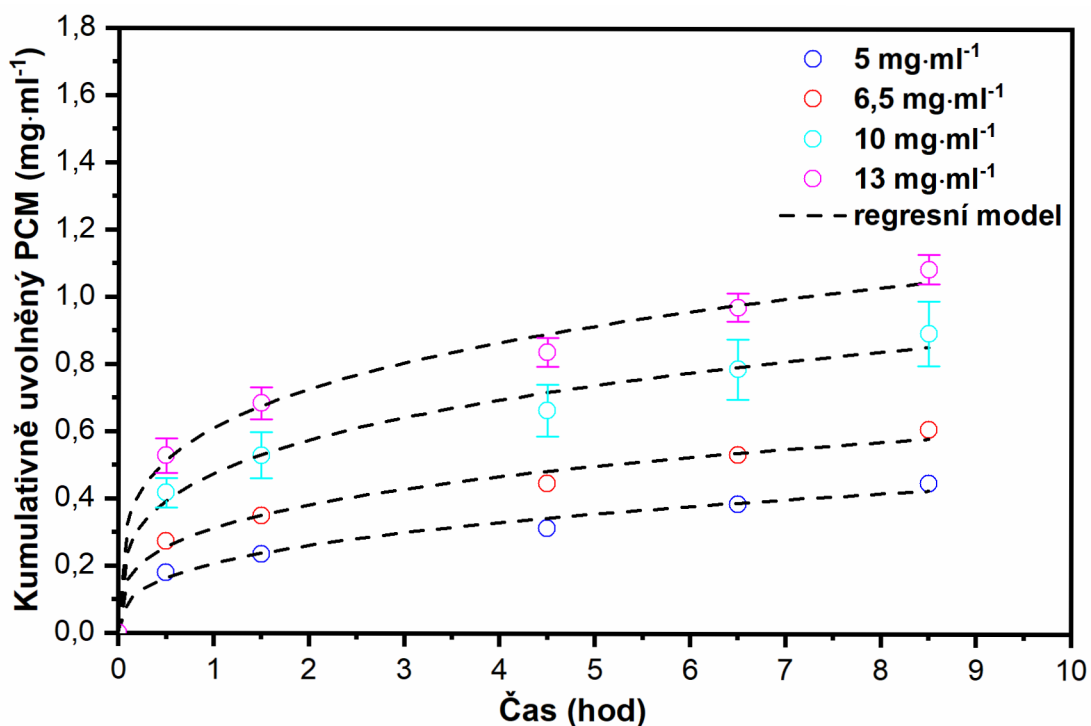
Obrázek 31 – Zobrazení průběhu odezvy rychlostní konstanty k na odezvě „Kritéria“ pro experiment uvolňování $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu



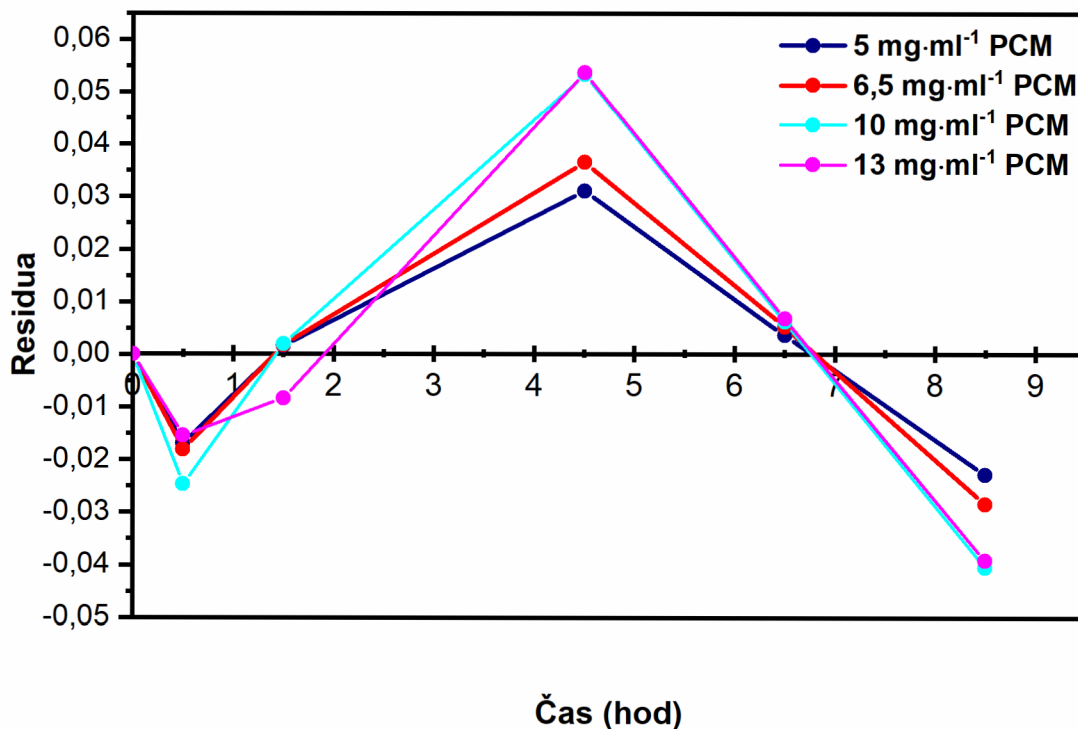
Obrázek 32 – Zobrazení průběhu odezvy parametru uvolňování n na odezvě „Kritéria“ pro experiment uvolňování $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu

Korsmeyer-Peppasův model se ukázal jako vhodný model pro popis uvolňování hydrofobního léčiva sulfathiazolu z hydrogelů připravených z obou typů kopolymerů (ABA i ITA/ABA/ITA) a dále pak pro nízké koncentrace paracetamolu uvolňované z ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného v Milli-Q vodě. Tento model se ukázal jako velmi vhodný pro uvolňování všech testovaných koncentrací paracetamolu z ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného v PBS.

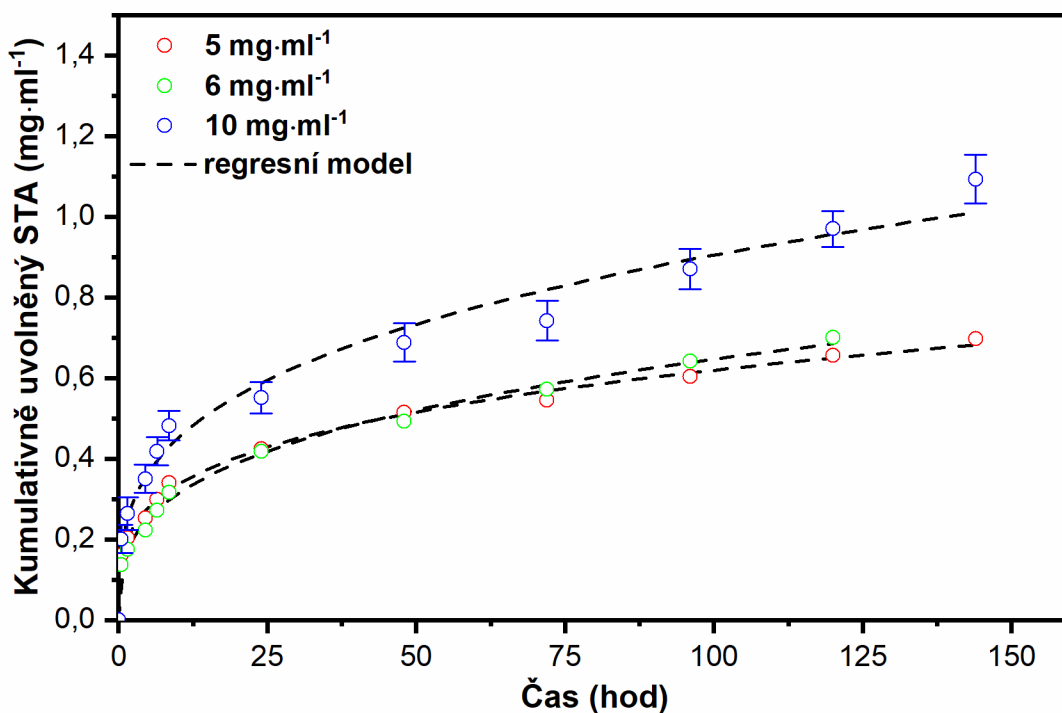
Na obrázcích 33, 34, 35 a 36 jsou graficky zobrazena naměřená experimentální data s Korsmeyer-Peppasovým modelem a jejich residua.



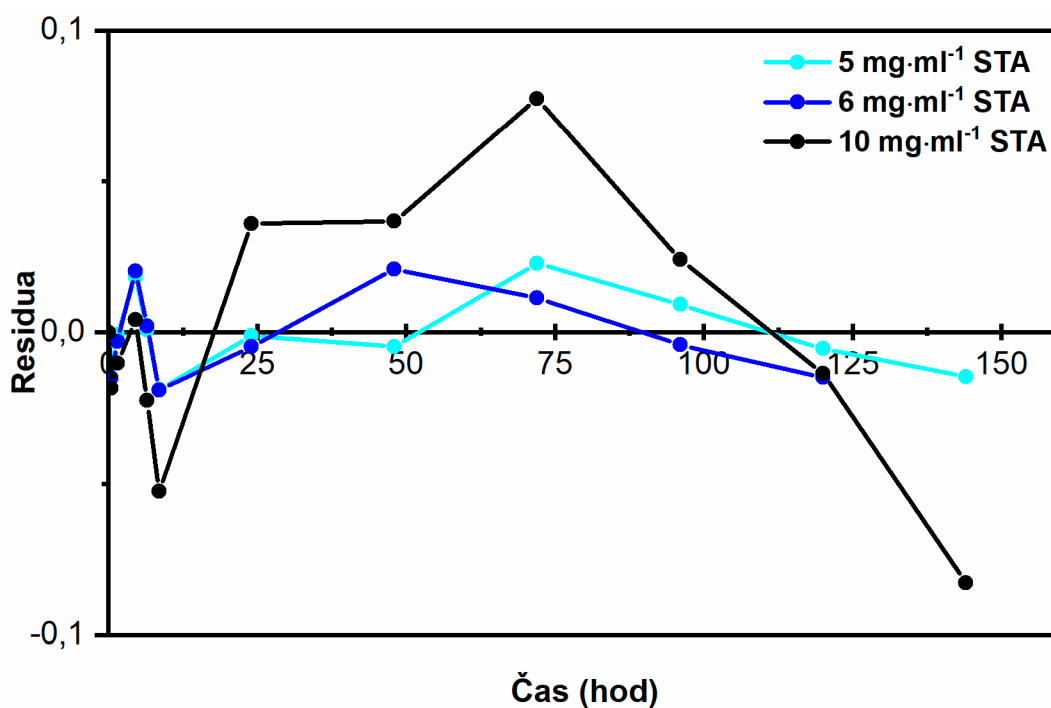
Obrázek 33 – Uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA v PBS a proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem



Obrázek 34 – Zobrazení residuí pro Korsmeyer-Peppasův model pro systém uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA v PBS



Obrázek 35 – Uvolňování sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem



Obrázek 36 – Zobrazení reziduí daného modelu z obrázku 35 pro jednotlivé testované koncentrace sulfathiazolu

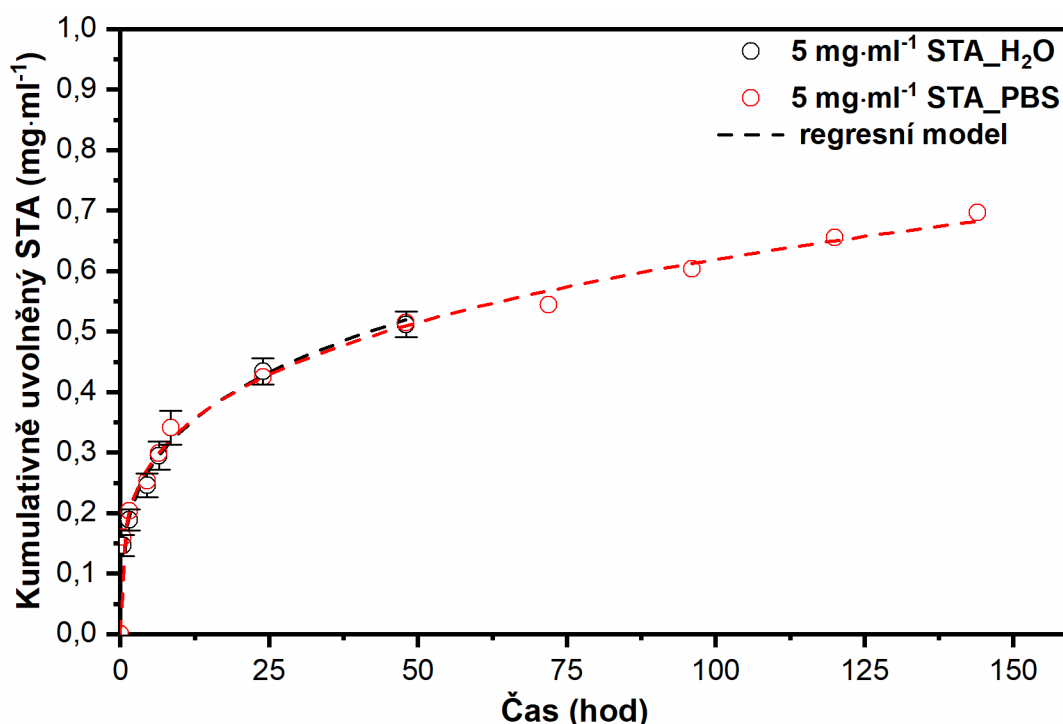
V *tabulce 15* jsou uvedeny vypočítané exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k pro léčivo sulfathiazol. Exponenty uvolňování n uvedené v této tabulce nejsou větší než hodnota 0,5 (viz *tabulka 3*), z toho důležitého poznatku vyplývá, že uvolňování sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z ABA kopolymeru ve vodě i v PBS probíhalo Fickovou difúzí.

Tabulka 15: Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z Korsmeyer-Peppasova modelu pro sulfathiazol uvolňovaný z ABA hydrogelu.

$C_{\text{kopolymer}}$ (hm./obj.%)	$C_{\text{teor.}}$ sulfathiazol (mg·ml ⁻¹)	Prostředí	Exponent uvolňování n	k (hod ⁻¹)	Stabilita hydrogelu (hod)
22	5	H ₂ O	0,41	0,0069	48
22	5	PBS	0,37	0,1142	48
12	5	H ₂ O	0,28	0,1736	48
12	5	PBS	0,27	0,1823	144
12	6	PBS	0,31	0,1517	120
12	10	PBS	0,30	0,2247	144

Porovnáme-li uvolňování sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% roztoku ABA kopolymeru (poměr PLGA/PEG = 2,0) v Milli-Q vodě a v PBS, tak z hodnot rychlostních konstant k je evidentní, že sulfathiazol o stejné teoretické koncentraci 5 mg·ml⁻¹ se uvolňoval rychleji z hydrogelu připraveného v PBS. Vyšší rychlost uvolňování STA z hydrogelu připraveného v PBS je způsobena přesycením systému ionty PBS rozpuštědla, které omezují vznik micelárních struktur fyzikálního gelu. Další ABA kopolymer, který byl testován, měl jiný poměr PLGA/PEG (PLGA/PEG = 2,4) a vykazoval při koncentraci 22 hm./obj.% za laboratorní teploty vysokou tuhost. Z tohoto důvodu byla pro další testování uvolňování sulfathiazolu zvolena nižší koncentrace kopolymeru (12 hm./obj.%). V případě použité nižší koncentrace kopolymeru a otestování ve vodě i v PBS se stejnou koncentrací sulfathiazolu lze opět z vypočtených hodnot rychlostních konstant k uvedených v *tabulce 16* tvrdit, že léčivá látka sulfathiazol se rychleji uvolňovala z matrice hydrogelu připraveného v PBS, avšak rozdíly vypočtených rychlostních konstant nejsou tak výrazné, jako v případě 22 hm./obj.%.

Při testování uvolňování sulfathiazolu o koncentraci 5 mg·ml⁻¹ je patrné z *obrázku 37*, že hydrogel připravený v PBS má vyšší stabilitu (140 hodin), než systém připravený v Milli-Q vodě (48 hodin). Uvolňování sulfathiazolu je v obou případech postupné. Nižší stabilita 12 hm./obj.% ABA kopolymeru připraveného v Milli-Q vodě je z největší pravděpodobnosti zapříčiněna kyselou hydrolýzou, neboť sulfathiazol je látka kyselého povahy (pKa₁ = 2,2; pKa₂ = 7,24) a při měření pH takto připraveného systému byla hodnota pH 2,9. Systém obsahující sulfathiazol připravený v PBS měl hodnotu pH 4,2.



Obrázek 37 – Uvolňování $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru v PBS a v Milli-Q vodě a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem

Exponenty uvolňování n uvedené v tabulce 16 nepřesahují hodnotu 0,5, z toho vyplývá, že uvolňování léčivých látek z matrice hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru v PBS probíhalo opět Fickovou difúzí.

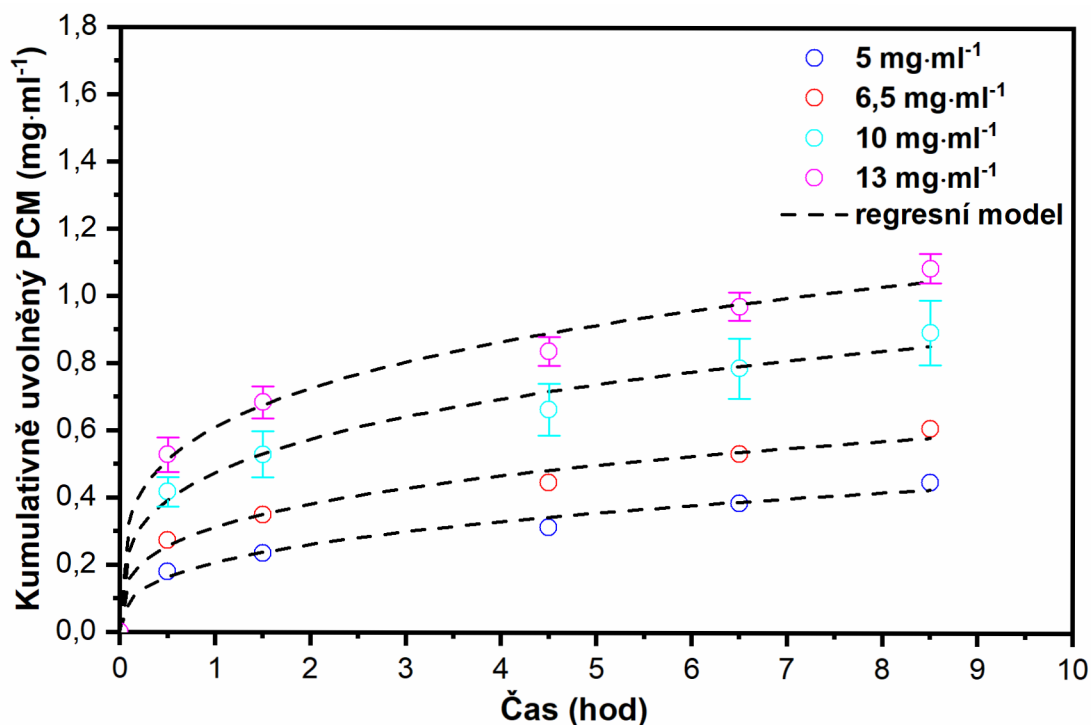
Tabulka 16: Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z Korsmeyer-Peppasova modelu pro léčiva uvolňovaná z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru v PBS.

léčivo	$C_{\text{teor.}} \text{ léčiva}$ ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	exponent uvolňování n	k (hod^{-1})	Stabilita hydrogelu (hod)
PCM	5	0,34	0,2064	8,5
	6,5	0,29	0,3117	8,5
	10	0,27	0,4748	8,5
	13	0,25	0,6096	8,5
STA	5	0,32	0,1252	24
	11	0,49	0,4921	48

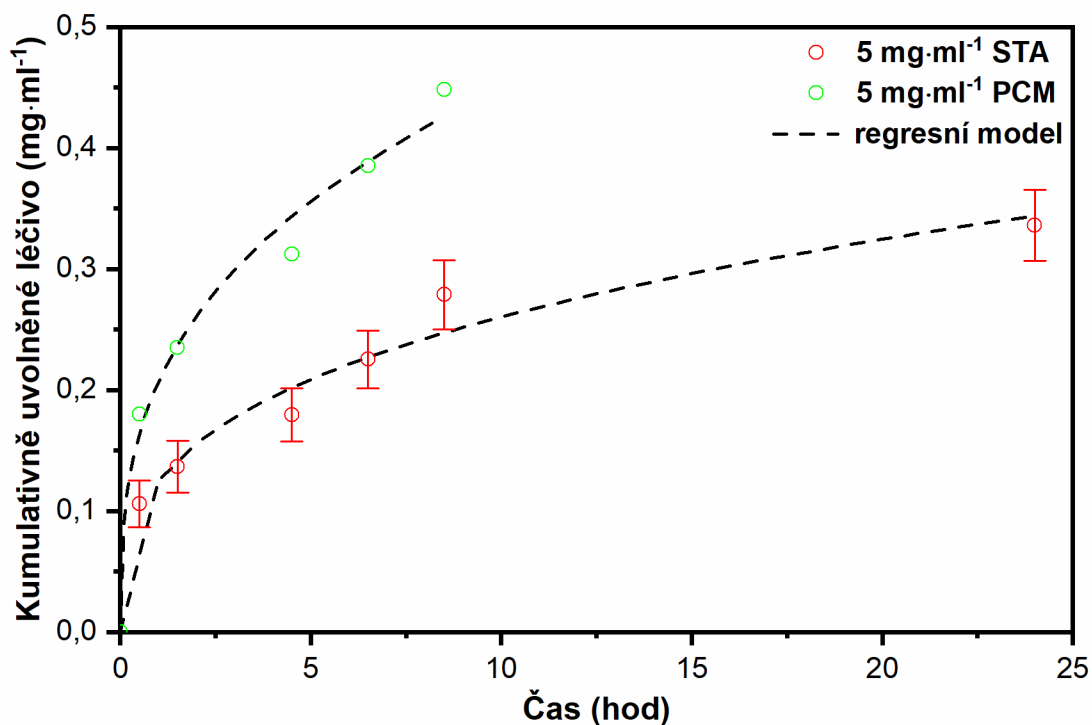
Stabilita ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného v PBS po přidání paracetamolu byla prokázána v časovém horizontu 8,5 hodiny. Rychlost uvolňování paracetamolu z matrice hydrogelu byla nejvyšší v případě testované koncentrace paracetamolu $13 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rychlost uvolňování paracetamolu se zmenšuje se snižující se použitou koncentrací léčivé látky (viz obrázek 38). Tento trend byl potvrzen i v případě hydrofobního léčiva sulfathiazol (viz hodnoty v tabulce 16), i když stabilita hydrogelu kopolymeru ITA/ABA/ITA byla v tomto případě vyšší (24 až 48 hodin).

Hodnota pH ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného v PBS s paracetamolem i sulfathiazolem, byla shodná ($\text{pH} = 3,8$). Nižší stabilita ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného

v PBS s paracetamolem je pravděpodobně zapříčiněna vyšší fluktuací hydrofilního paracetamolu z ITA/ABA/ITA hydrogelu do inkubačního média a tím rychlejší degradací hydrogelového systému; viz *obrázek 39*. Kopolymer 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA připravený v PBS s paracetamolem nebyl proměřen pomocí dynamické reologické analýzy, neboť jeho konzistence byla velmi tuhá a nebyla vhodná pro toto měření.



Obrázek 38 – Kumulativní uvolňování PCM zhydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem



Obrázek 39 – Uvolňování 5 mg·ml⁻¹ sulfathiazolu a paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem

Exponenty uvolňování n uvedené v tabulce 17 opět nejsou větší než hodnota 0,5, z toho opět vyplývá, že uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z ITA/ABA/ITA kopolymeru ve vodě probíhalo Fickovou difúzí. Hodnota rychlostních konstant k se opět zvyšuje se zvyšující se použitou koncentrací paracetamolu.

Tabulka 17: Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z Korsmeyer-Peppasova modelu pro PCM uvolňovaný z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelův Milli-Q vodě.

léčivo	$C_{\text{teor.}} \text{ léčiva}$ (mg·ml ⁻¹)	exponent uvolňování n	k (hod ⁻¹)	Stabilita hydrogelu (hod)
PCM	5	0,19	0,3539	96
	6,5	0,15	0,4574	96

5.2.2 Návrh matematického modelu pro profil uvolňování léčiv

Vzhledem k nízké těsnosti Korsmeyer-Peppasova modelu pro uvolňování paracetamolu z hydrogelů tvořených ABA kopolymerem i ABA kopolymerem s nHAp a dále pak rovněž uvolňování sulfathiazolu z hydrogelu tvořeného ABA kopolymerem s nHAp, bylo nezbytné navrhnout jiný model, který by popisoval uvolňování léčiv z hydrogelů ve výše uvedených případech. Při bližším prozkoumání rovnice popisující Korsmeyer-Peppasův model připomíná tento model nápadně svým tvarem i popisem rovnici Freundlichovu adsorpční izotermu, která popisuje adsorpci z roztoků na pevných látkách.

Freundlichova adsorpční izoterma:

$$a = k \cdot c^{\frac{1}{n}} \quad (5)$$

kde:

k a **n** jsou parametry závislé na teplotě a charakteristické pro danou trojici látek tj. rozpouštědlo, rozpuštěnou látku a adsorbát;

a je množství rozpuštěné látky (adsorbátu) adsorbované jednotkovou hmotností adsorbentu;

c je rovnovážná koncentrace rozpuštěné látky [141].

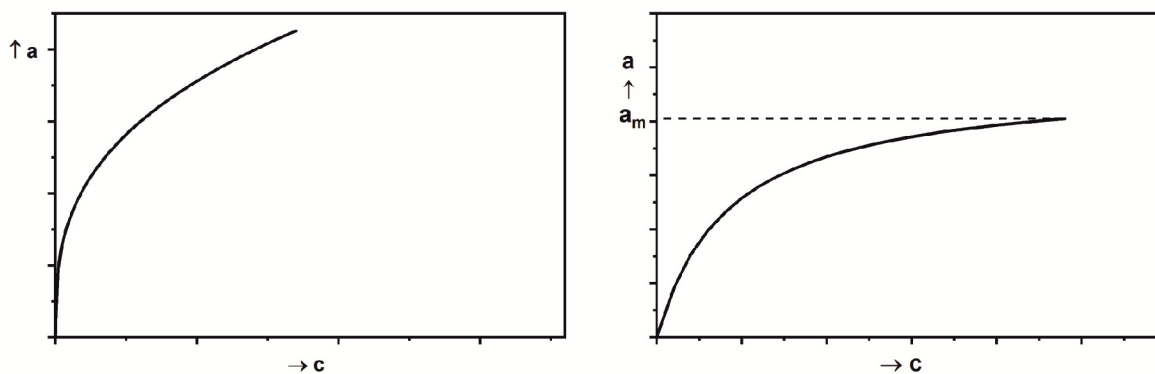
Korsmeyer-Peppasův model: $\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$; kde

k a **n** jsou konstantami;

$\frac{M_t}{M_\infty}$ je poměr uvolněného léčiva v čase **t**, tento poměr lze nahradit i aktuální koncentrací **c**

pro daný časový úsek **t**.

Rovnice Freundlichovy adsorpční izotermu je rovnicí empirickou, a proto lze vyslovit hypotézu, že Korsmeyer-Peppasův model je pouze matematickým opisem Freundlichovy adsorpční izotermu lišící se v nezávislé proměnné. V případě Korsmeyer-Peppasova modelu je nezávisle proměnnou čas, pro rovnicí Freundlichovy adsorpční izotermu je to koncentrace rozpuštěné látky. Parametry **k** a **n** jsou v obou rovnicích konstantami. V případě Freundlichovy izotermu je množství rozpuštěné látky a závisle proměnná na rovnovážné koncentraci **c** rozpuštěné látky, v případě Korsmeyer-Peppasova modelu je poměr M_t/M_∞ závisle proměnná na čase **t**. Čas **t** (pro Korsmeyer-Peppasův model) a rovnovážná koncentrace rozpuštěné látky **c** (pro Freundlichovu adsorpční izotermu) jsou proto nezávisle proměnnými [141].



Obrázek 40 – Zleva: Freundlichova a Langmuirova adsorpční izoterma

Na základě této dedukce je v této práci navrhnout model, který je matematickým opisem Langmuirovy adsorpční izotermy. Langmuirova adsorpční izoterma je popsána rovnicí (6).

$$a = a_{\max} \cdot \frac{b \cdot c}{1 + b \cdot c} \quad (6)$$

kde:

a_{\max} a b jsou parametry závislé na teplotě a charakteristické pro danou trojici látek tj. rozpouštědlo, rozpuštěnou látku a adsorbát; a_{\max} a b jsou v rovnici konstantami;
 a je množství rozpuštěné látky (adsorbátu) adsorbované jednotkovou hmotností adsorbentu;
 a je závisle proměnná na rovnovážná koncentrace rozpuštěné látky c
 c je rovnovážná koncentrace rozpuštěné látky a je nezávisle proměnnou v rovnici [141].

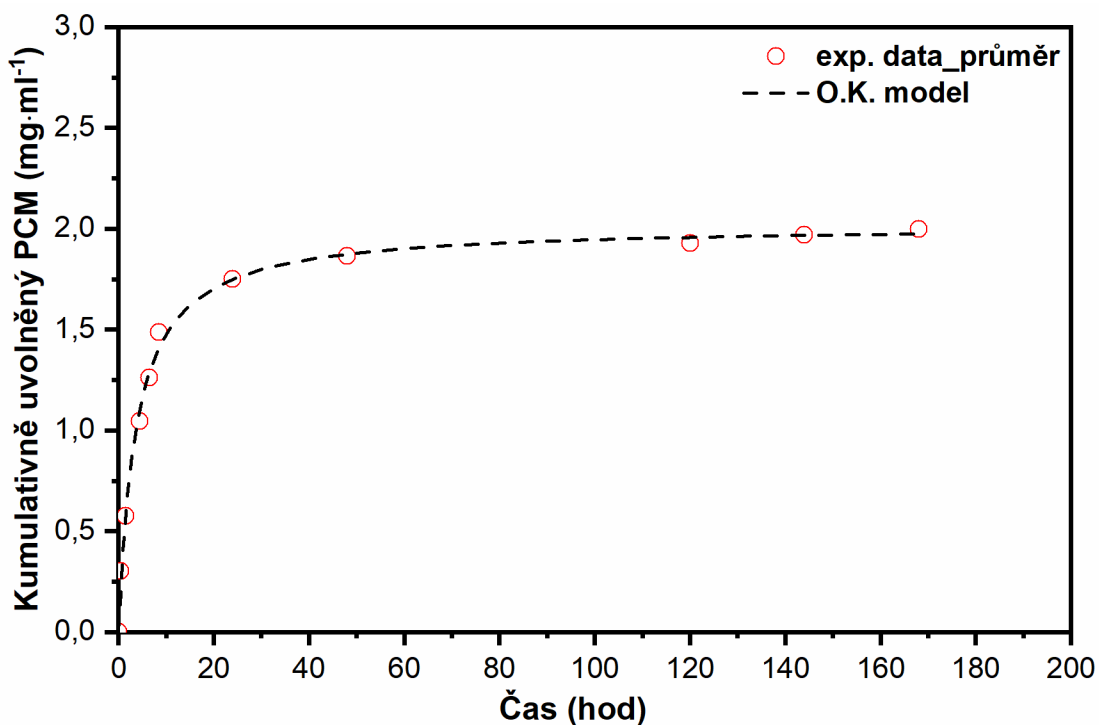
Pro popis uvolňování převážně hydrofilního léčiva paracetamolu z hydrogelu připraveného z ABA kopolymeru je proto navrhnout matematický model, který je v této práci označován jako O.K. model a popisuje ho rovnice (7).

$$c_t = k \cdot \frac{n \cdot t}{1 + n \cdot t} \quad (7)$$

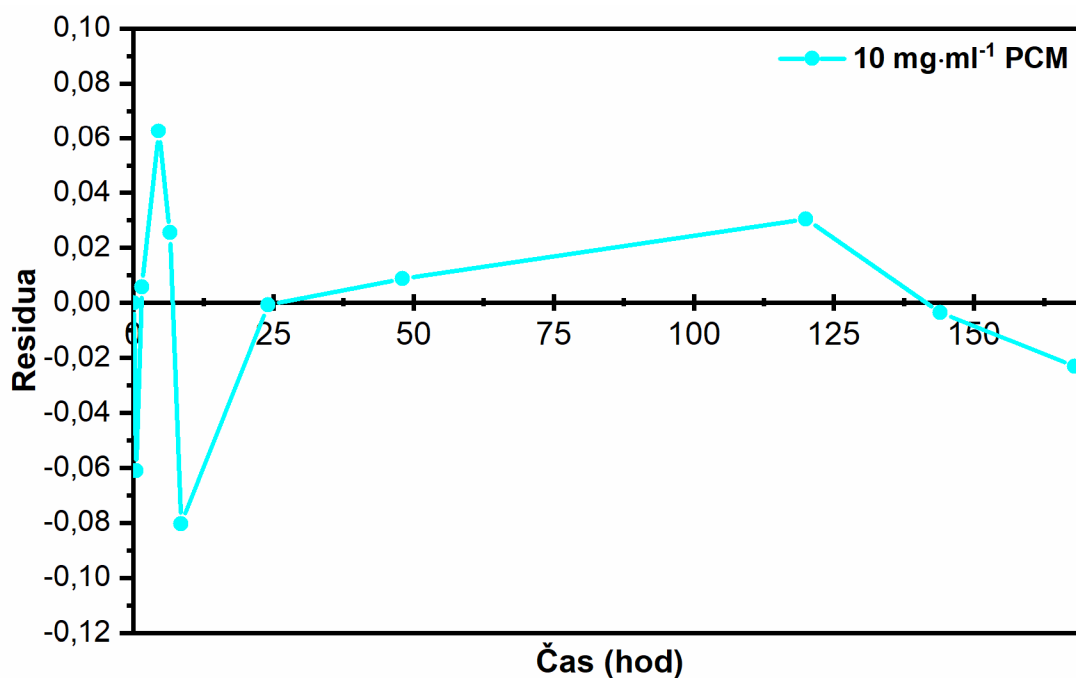
kde:

k je rychlostní konstanta;
 n je exponent uvolňování, v rovnici O.K modelu je konstantou;
 t je čas, nezávisle proměnná v rovnici O.K. modelu
 c_t je koncentrace uvolněného léčiva v čase t , v rovnici O.K modelu je závislou proměnnou.

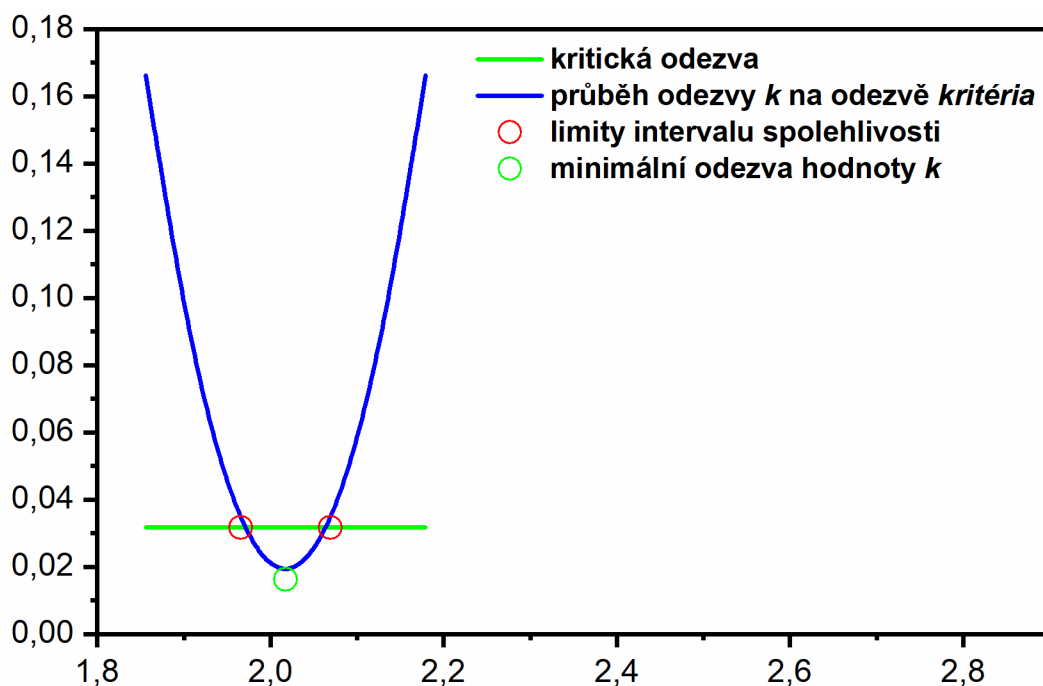
Nově navrženým matematickým O.K modelem byla opět vyšetřena všechna naměřená data stejným postupem jako v kapitole 5.2.1.



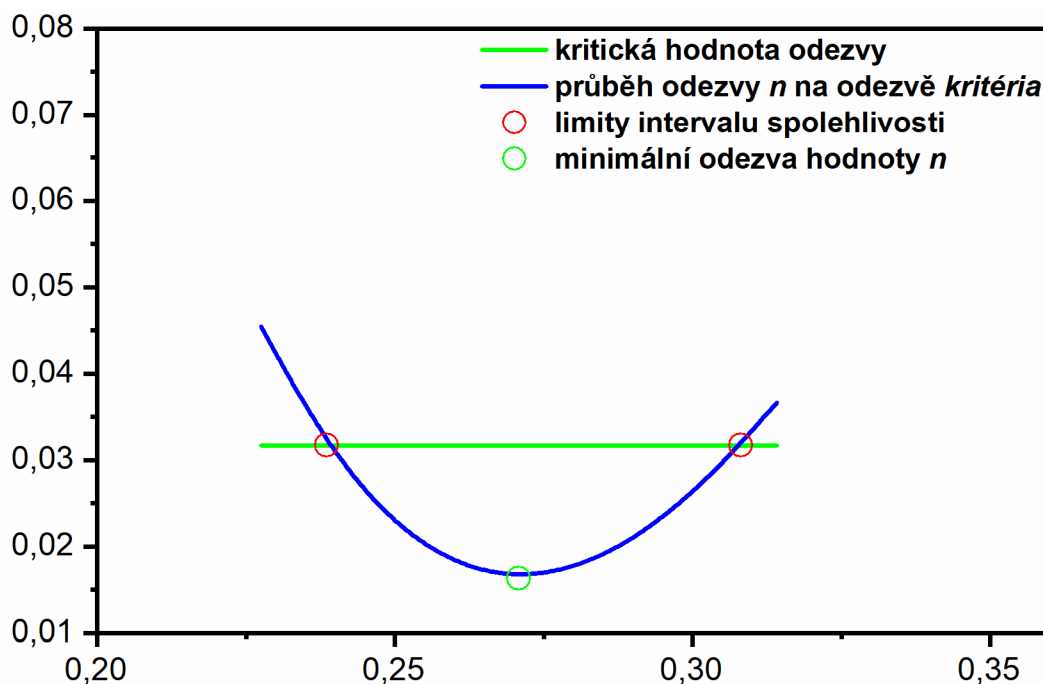
Obrázek 41 – Uvolňování $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ paracetamolu (PCM) z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě. Ukázkové proložení experimentálních dat O.K. modelem



Obrázek 42 - Zobrazení residuí pro O.K. model pro systém uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% kopolymeru ABA v Milli-Q vodě



Obrázek 43 - Zobrazení průběhu odezvy rychlostní konstanty k na odezvě kritéria pro systém $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ paracetamolu uvolněného z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě



Obrázek 44 - Zobrazení průběhu odezvy parametru uvolňování n na odezvě kritéria pro systém $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ paracetamolu uvolněného z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě

V tabulkách 18 a 19 jsou uvedeny vypočtené hodnoty F_c a F_{exp} pro Korsmeyer-Peppasův model (K.P. model) a O.K. model pro všechny testované systémy. Vyšší hodnota F_{exp} poukazuje na vyšší těsnost daného modelu k naměřeným experimentálním hodnotám.

Z tabulky 18 je patrné, že uvolňování paracetamolu popisuje těsněji nově navržený O.K. model, výjimku tvoří pouze hydrogely připravené z ITA/ABA/ITA kopolymeru v rozpouštědle PBS a v Milli-Q vodě. V případě nízkých testovaných koncentrací PCM (5 a 6,5 mg·ml⁻¹), které se uvolňovaly z hydrogelu připraveného z ITA/ABA/ITA kopolymeru v Milli-Q vodě, tento proces těsněji popisuje Korsmeyer-Peppasův model.

Tabulka 18: Přehled vypočtených F_c a F_{exp} hodnot pro Korsmeyer-Peppasův model a nově navržený O.K. model pro uvolňování paracetamolu.

Kopolymer	$C_{paracetamol}$ (mg·ml ⁻¹)	Prostředí	F_c	F_{exp}	
				K.P. model	O.K. model
ABA	5	PBS	5,8	71,3	941,0
	7,4			62,0	165,1
	10			120,8	298,9
	14,7			139,7	263,2
ABA	5	H ₂ O	4,3	44,7	1517,7
	7,4			47,2	1904,5
	10			41,1	1444,8
	14,7			40,7	1464,1
ITA/ABA/ITA	5	H ₂ O	4,5	437,4	72,3
	6,5			540,1	63,0
	10			4,8	73,2
	13			3,6	860,8
ITA/ABA/ITA	5	PBS	6,9	143,5	36,4
	6,5			187,7	41,9
	10			197,2	43,6
	13			317,3	59,0
ABA + nHAp	3,5	PBS	4,0	178,3	149,0
	5		3,7	161,3	239,9
	7		3,7	174,6	212,9
ABA	3,5	PBS	4,5	67,2	429,3
	5			66,2	418,4
	7			111,5	130,1

Z tabulky 19 je patrné, že uvolňování sulfathiazolu popisuje těsněji Korsmeyer-Peppasův model. Výjimku v tomto případě tvoří uvolňování $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z ITA/ABA/ITA kopolymeru v Milli-Q vodě. Další výjimka je tvořena $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ STA, který se uvolňoval z kompozitního systému ABA+nHAp, v tomto případě vykazuje vyšší těsnost O.K. model. V případě uvolňování $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (2x ekvimolární množství) sulfathiazolu vyšší těsnost vykazuje opět K.P. model.

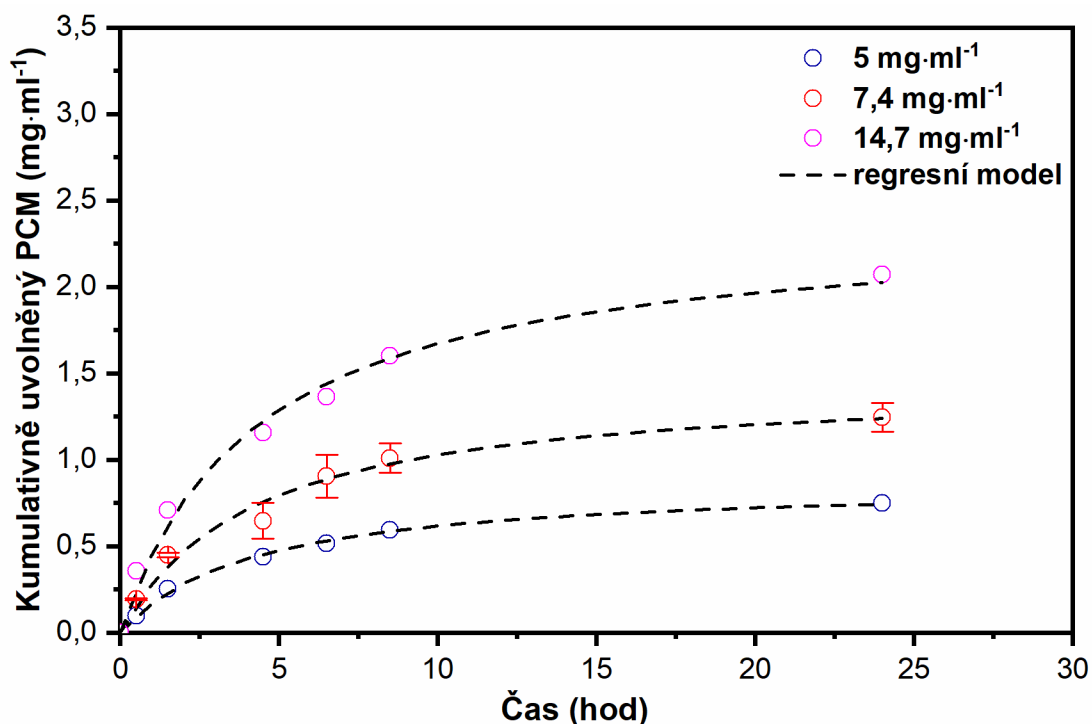
Tabulka 19: Přehled vypočtených F_c a F_{exp} hodnot pro Korsmeyer-Peppasův model a nově navržený O.K. model pro uvolňování sulfathiazolu.

Kopolymer	$C_{\text{sulfathiazol}}$ ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Prostředí	F_c	F_{exp}	
				K.P. model	O.K. model
ITA/ABA/ITA	5	H_2O	4,3	5,4	46,1
	11		5,1	472,9	79,0
	5	PBS	5,8	114,0	38,5
	11		5,1	472,9	79,0
ABA	5	H_2O	5,1	522,5	50,1
	6			473,1	45,5
ABA	5	PBS	4,1	1584,1	73,8
	6		4,3	1226,9	76,7
	10		4,1	300,3	51,3
ABA + nHAp	5	PBS	3,6	183,1	236,9
	6			223,8	170,9

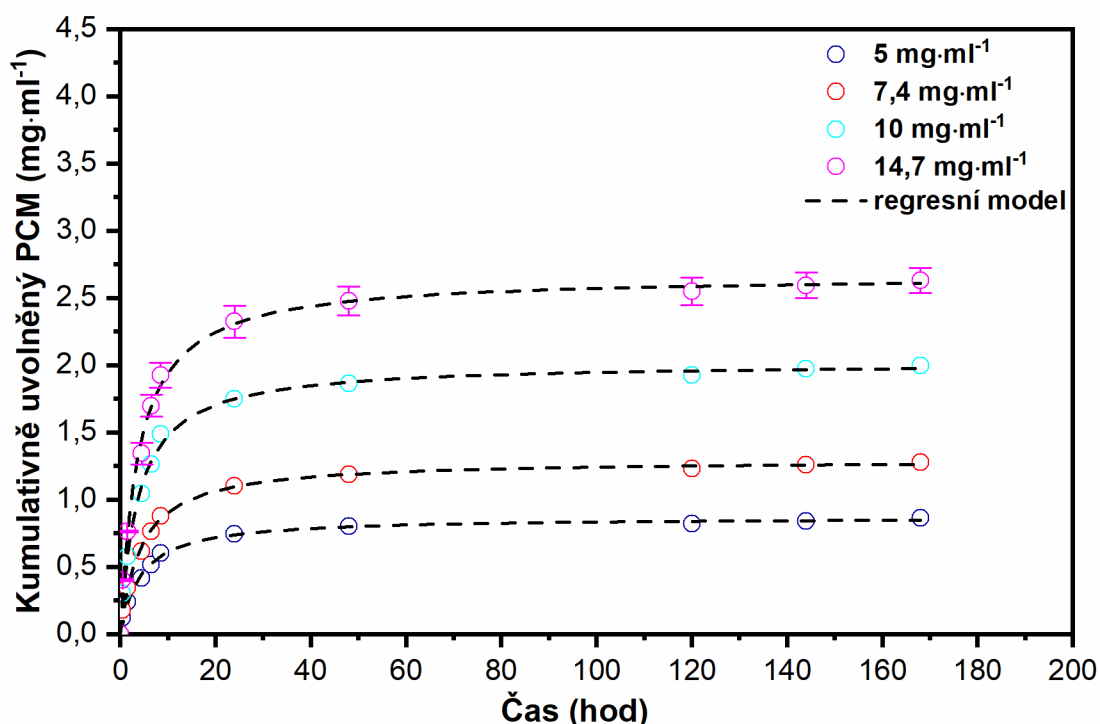
Tabulka 20: Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z O.K. modelu pro paracetamol uvolňovaný z 22 hm./obj.% ABA hydrogelu.

$C_{\text{teor. paracetamol}}$ ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	prostředí	exponent uvolňování n	k (hod^{-1})	Stabilita hydrogelu (hod)
5	H_2O	0,24	0,8683	168
7,4		0,23	1,2956	168
10		0,27	2,0174	168
14,7		0,27	2,6666	168
5	PBS	0,24	0,8721	24
7,4		0,24	1,4522	24
14,7		0,24	2,3816	24

Z hodnot rychlostních konstant k uvedených v tabulce 20 lze opět pozorovat trend jako u předchozích experimentů, tzn., se zvyšující se koncentrací paracetamolu se zvyšuje hodnota rychlostní konstanty k v obou testovaných rozpouštědlech, resp. inkubačních médiích. Z tvarů křivek kumulativního uvolňování paracetamolu z 22 hm./obj.% ABA hydrogelu připraveného v PBS na obrázku 45 se jedná o návalové uvolňování. Nižší stabilita hydrogelu připraveného v PBS s paracetamolem je způsobena nižší tuhostí hydrogelu připraveného v PBS s hydrofilním léčivem.



Obrázek 45 – Kumulativní uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat O.K. modelem



Obrázek 46 – Kumulativní uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě a jeho proložení naměřených experimentálních dat O.K. modelem

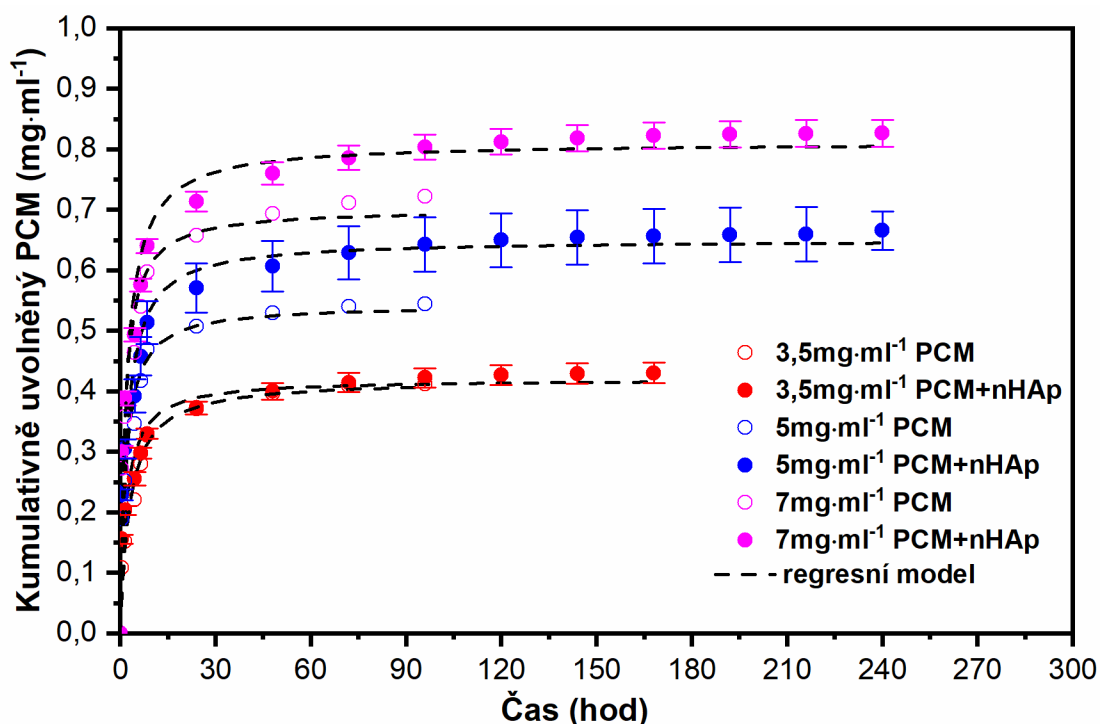
Na obrázku 46 je zobrazeno kumulativní uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě. Z tvarů křivek se opět jedná o návalové uvolňování léčiva s rychlou druhou fází. Po uplynutí časového úseku 24 hodin je veškeré léčivo uvolněné do inkubačního média a další uvolněné množství paracetamolu je již v zanedbatelném množství. 22 hm./obj.% ABA hydrogel připravený v Milli-Q vodě zůstává i přes to stabilní až 168 hodin díky vyšší tuhosti hydrogelového systému, která byla ověřena pomocí dynamické reologické analýzy; viz obrázek 24.

Tabulka 21: Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z O.K. modelu pro léčiva uvolňovaná z 12 hm./obj.% ABA hydrogelu a kompozitu ABA s nHAp v PBS.

Typ kopolymeru (+nHAp)	Léčivo	$C_{\text{teor.}} \text{ léčiva (mg·ml}^{-1}\text{)}$	Exponent uvolňování n	$k \text{ (hod}^{-1}\text{)}$	Stabilita hydrogelu (hod)
ABA	PCM	3,5	0,35	0,4190	96
ABA		5	0,60	0,5428	96
ABA		7	0,70	0,7015	96
ABA+ nHAp	PCM	3,5	0,53	0,4199	168
ABA+ nHAp		5	0,49	0,6502	240
ABA+ nHAp		7	0,52	0,8111	240
ABA+ nHAp	STA	5	0,06	0,5944	648

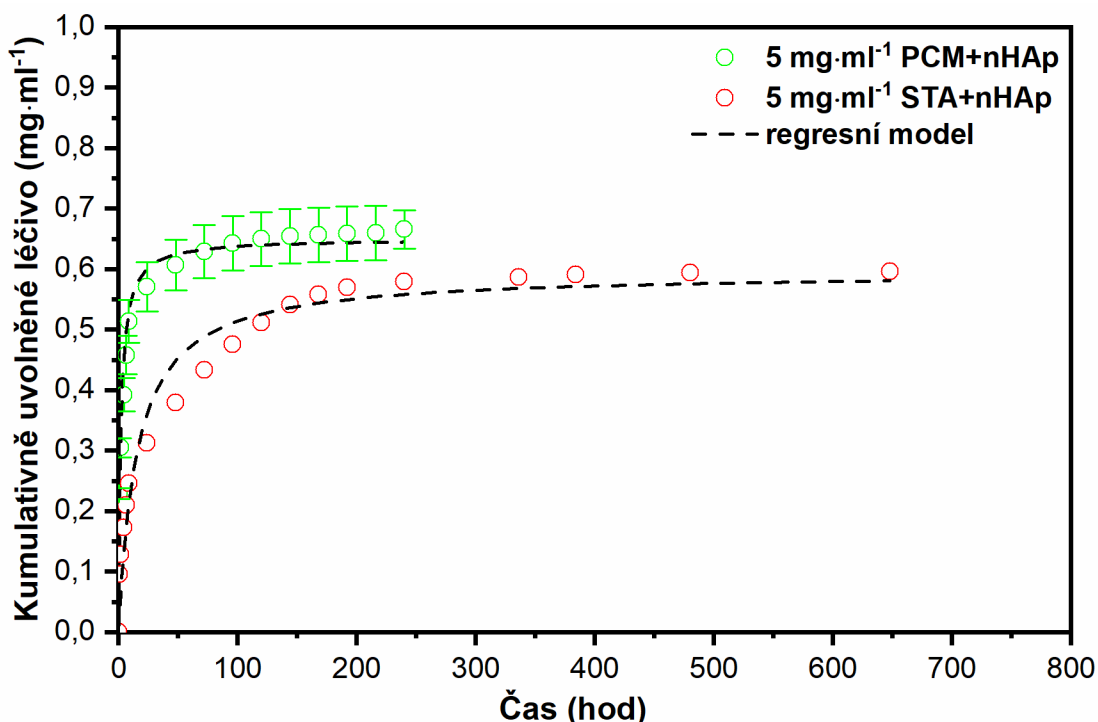
Z hodnot rychlostních konstant k uvedených v tabulce 21 lze opět prokázat trend jako u předchozích experimentů, tzn., že se zvyšující se koncentrací paracetamolu se zvyšuje hodnota rychlostní konstanty k . Po přidání nHAp do systému je rychlost uvolňování

paracetamolu ještě vyšší, zejména u koncentrací, kdy $c_{\text{teor.}}$ je 5 a 7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z tvarů křivek popisujících uvolňování paracetamolu na *obrázku 47* vyplývá, že se opět jedná o návalové uvolňování během prvních 24 hodin. Další uvolněný paracetamol je již v zanedbatelných koncentracích. Stabilita 12 hm./obj.% ABA hydrogelu připraveného v PBS s paracetamolem o $c_{\text{teor.}}$ 3,5; 5 a 7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ trvala 96 hodin, přidavek nHAp o koncentraci 0,5 hm.% prodlužoval stabilitu gelového systému na 168 až 240 hodin. Vyšší stabilita gelového systému obsahující nHAp je způsobena tím, že nanočástice HAp jsou „umístěny“ v jádru micely, což zvýšilo tuhost celého systému. Dále je z tvarů křivek také zřejmé, že systém obsahující nHAp je schopen pojmout vyšší množství paracetamolu a zpětně jej uvolnit. Vyšší schopnost hydrogelového systému s nHAp pojmout paracetamol může být způsobena, tím že rozpuštěné léčivo se může sorbovat na povrch částic nHAp.



Obrázek 47 – Grafické znázornění uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru s nHApem a bez nanočástic HAp v PBS

Porovnáme-li uvolňování 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ paracetamolu a sulfathiazolu ze systému 12 hm./obj.% ABA hydrogelu s nHAp v prostředí PBS (*obrázek 48*), je evidentní, že paracetamol má mnohem rychlejší průběh návalového uvolňování (během 24 hodin), v porovnání s hydrofobním sulfathiazolem, který se uvolňuje během 240 hodin. Stabilita hydrogelu se sulfathiazolem a nanohydroxyapatitem trvala až 648 hodin tj. 27 dní.

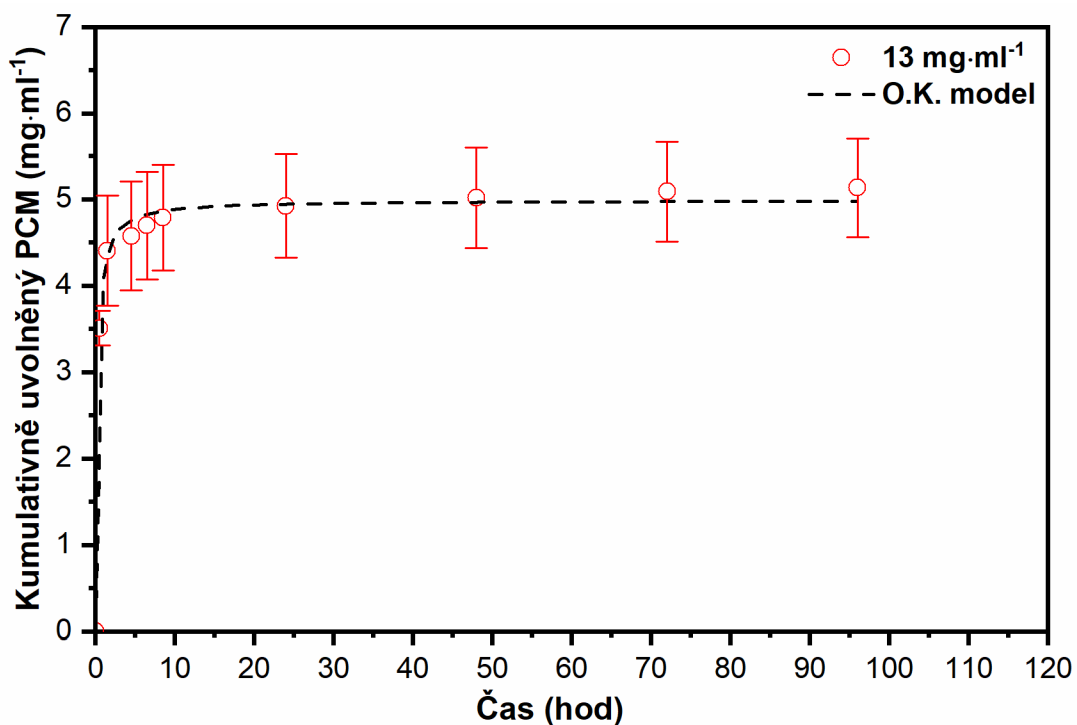


Obrázek 48 – Grafické znázornění uvolňování 5 mg·ml⁻¹ paracetamolu a sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru s nHAp v prostředí PBS

Z hodnot rychlostních konstant k uvedených v tabulce 22 je opět potvrzeno, že se zvyšující se použitou koncentrací hydrofilního léčiva paracetamolu se zvyšuje rychlost jeho uvolňování do inkubačního média. Vyšší těstnost k O.K. modelu v případě vyšších koncentrací hydrofilního léčiva může být způsobena tím, že značná část léčiva může být nasorbována na povrchu hydrogelu a po přidání inkubačního média (Milli-Q vody) se téměř okamžitě uvolní do tohoto prostředí.

Tabulka 22: Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z O.K. modelu pro paracetamol uvolňovaný z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu v Milli-Q vodě.

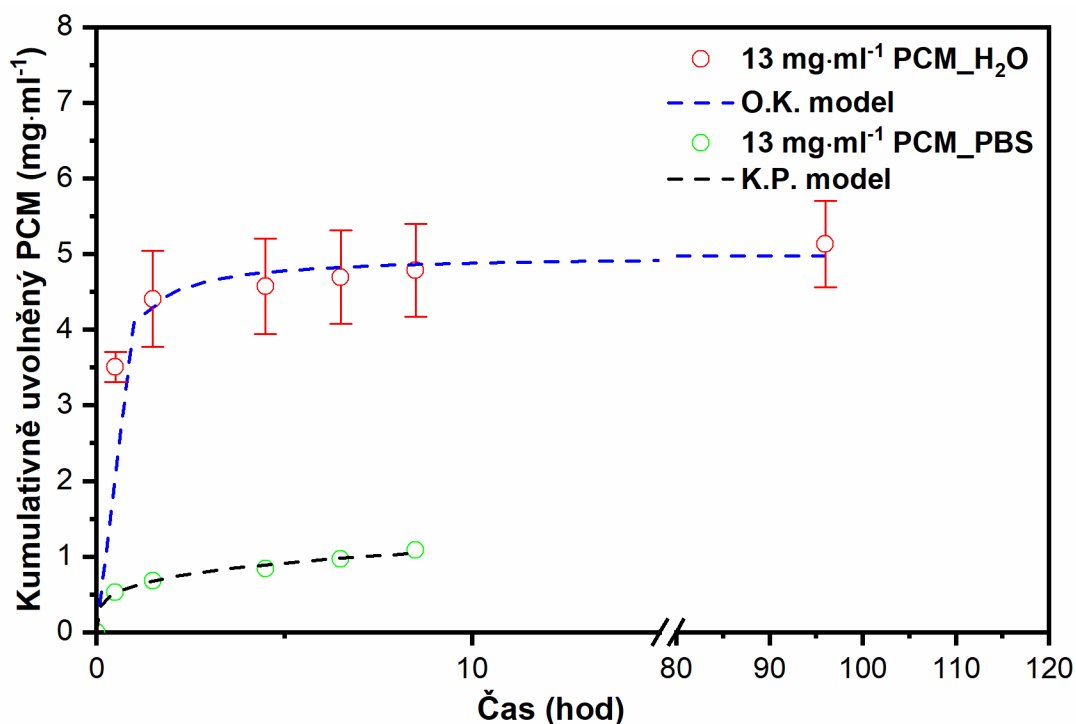
kopolymer	léčivo	$C_{\text{teor.}}^{\text{léčiva}}$ (mg·ml ⁻¹)	exponent uvolňování n	k (hod ⁻¹)	Stabilita hydrogelu (hod)
ITA/ABA/ITA	PCM	10	1,39	1,348	96
ITA/ABA/ITA	PCM	13	4,58	4,987	96



Obrázek 49 - Grafické znázornění uvolňování $13 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ paracetamolu z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného ve vodě

Z grafického znázornění průběhu uvolňování paracetamolu v teoretické koncentraci $13 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ na obrázku 49 lze vydedukovat, že 22 hm./obj.% hydrogel připravený z ITA/ABA/ITA kopolymeru ve vodě se chová silně hydrofobně. Veškerý paracetamol se téměř nárazově uvolnil během prvních 24 hodin, i když byl hydrogel stabilní 96 hodin, další uvolněný paracetamol byl již v téměř zanedbatelném množství.

Na *obrázku 50* je zobrazen odlišný průběh uvolňování paracetamolu z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného v Milli-Q vodě a v PBS. V případě hydrogelu připraveného v PBS je zřetelně vidět, že hydrogel má nižší kapacitu pojmout rozpuštěné léčivo, než hydrogel připravený ve vodě. Zároveň je stabilita hydrogelu připraveného v PBS výrazně nižší, pouhých 8,5 hodiny. Proto lze usuzovat na to, že rychlost uvolňování paracetamolu je přímo doprovázena rozpadem samotného hydrogelu. ITA/ABA/ITA hydrogel připravený v Milli-Q vodě má vyšší schopnost pojmout hydrofilní léčivo a také jeho stabilita byla vyšší (96 hodin), avšak uvolňování paracetamolu se děje prostou difúzí podle koncentračního spádu gradientu. Rozpad hydrogelu má v tomto případě na uvolňování léčiva téměř minimální vliv.



Obrázek 50 – Porovnání kumulativního uvolňování 13 mg·ml⁻¹ paracetamolu z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného ve vodě a v PBS

6 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce byla zaměřena na řízené uvolňování léčiv z biodegradabilních hydrogelů založených na bázi poly(mléčné) a poly(glykolové) kyseliny a polyethylenglykolu (PLGA-PEG-PLGA, ABA) a jeho modifikace anhydridem kyseliny itakonové ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA (ITA/ABA/ITA).

V první experimentální části této práce byly vybrány kopolymery s charakteristickým poměrem PLGA/PEG rovnu hodnotám 2,0 a 2,4, které tvořily gel při teplotě 37 °C. Pro uvolňování léčiv z hydrogelových systémů byly vybrány hydrofilní analgetikum paracetamol a hydrofobní sulfonamidové antibiotikum sulfathiazol. Léčivé látky byly přidávány do kopolymery v jeho nízko viskózní fázi (sol fázi) a měly významný vliv na výslednou tuhost a stabilitu hydrogelu. Vliv na tuhost a následnou stabilitu systému hydrogel-léčivo mělo i použití různých rozpouštědel. Maximální tuhost gelu, vyjádřená modulem pružnosti ve smyku (G'_{max}) hydrogelů připravených v Milli-Q vodě bez přídavku léčiva byla nižší, než s přídavkem léčivé látky díky tvorbě vodíkových můstků mezi $-NH$, $-NH_2$ funkčními skupinami léčiv a $-C=O$ skupinou poly(mléčné) kyseliny. Naopak 22 hm./obj.% hydrogely připravené v PBS vykazovaly maximální tuhost bez přídavku léčiva. Snížení tuhosti hydrogelu připraveného v PBS po přidání léčiv bylo způsobeno přesycením hydrogelového systému ionty rozpouštědla PBS a samotného léčiva, které omezují vznik micelárních struktur fyzikálního gelu. Pro zvýšení stability ABA hydrogelů v prostředí PBS byl do gelujícího systému přidán nanohydroxyapatit (nHAp) o koncentraci 0,5 hm.%. Pomocí dynamické reologické analýzy bylo zjištěno, že přídavek nHApu o koncentraci 0,5 hm.% do 12 hm./obj.% ABA hydrogelu připraveného spolu s paracetamolem, nemá již výrazný vliv na hodnotu G'_{max} . Výraznější vliv na hodnotu G'_{max} 12 hm./obj.% ABA hydrogelů v prostředí PBS měla zvyšující se koncentrace hydrofilního léčiva paracetamolu. V případě hydrofobního léčiva sulfathiazolu a ABA hydrogelu měl přídavek nHAp výrazný vliv na maximální tuhost gelu připraveného v PBS.

V druhé experimentální části této práce byl ověřen Korsmeyer-Peppasův kinetický model pro uvolňování hydrofobního léčiva sulfathiazolu z 12 hm./obj.% ABA kopolymery připraveného v PBS a také v Milli-Q vodě. Pomocí F-rozdělení se Korsmeyer-Peppasův model ukázal být vhodným i pro popis uvolňování paracetamolu z ITA/ABA/ITA kopolymery připraveného v PBS. Pro porovnání uvolňování hydrofilního léčiva paracetamolu z ITA/ABA/ITA kopolymery byl testován i ABA kopolymer. Pomocí F-rozdělení bylo prokázáno, že Korsmeyer-Peppasův model není vhodný pro popis uvolňování nízkomolekulárního hydrofilního léčiva paracetamolu z hydrofobního ABA kopolymery, a proto byl navržen nový regresní model. Tento nový regresní model, označený v této práci jako O.K. model byl ověřen, jako velmi vhodný pro popis profilu uvolňování paracetamolu z ABA hydrogelu, a to pro obě testovaná prostředí (PBS, Milli-Q voda). O.K. model se ukázal jako velmi těsný i pro popis uvolňování paracetamolu i sulfathiazolu z kompozitního systému ABA/nHAp. Jeho vhodnost se ukázala i pro ITA/ABA/ITA hydrogel uvolňující vyšší koncentrace paracetamolu v Milli-Q vodě.

Pouhým fyzikálním zamýcháním léčiva a nanočástic hydroxyapatitu do roztoku ABA kopolymery se podařilo připravit kompozitní systémy, které byly dlouhodobě stabilní a uvolňovaly léčivou látku pomocí Fickovy difúze. Hydrofilní léčivo (paracetamol) se uvolňovalo až po dobu 96 hodin a hydrofobní léčivo (sulfathiazol) až po dvojnásobný časový úsek. Nově

připravený kompozitní systém (ABA/nHAp) lze tedy úspěšně využít i pro dlouhodobé uvolňování nízkomolekulárních léčivých látek hydrofilního charakteru, které nebylo možné jen ze samotného hydrogelového systému tvořeného ABA kopolymerem v prostředí o hodnotě pH 7,4 simulující hodnotu pH lidského těla.

Modifikace ABA kopolymeru anhydridem kyseliny itakonové neměla zásadní vliv na profil uvolňování nízkomolekulárního hydrofilního léčiva paracetamolu z ITA/ABA/ITA hydrogelu, neboť profil uvolňování tohoto léčiva měl návalový profil.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] WANG, P. X., CHU, W., ZHUO, X. Z., ZHANG, Y., a kol. Modified PLGA-PEG-PLGA thermosensitive hydrogels with suitable thermosensitivity and properties for use in a drug delivery system. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, roč. 5, č. 8, str. 1551-1565.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c6tb02158a>
- [2] GAJENDIRAN, M., GOPI, V., ELANGO VAN, V., MURALI, R. V., a kol. Isoniazid loaded core shell nanoparticles derived from PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymers: In vitro and in vivo drug release. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2013, roč. 104, str. 107-115.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.008>
- [3] GAO, Y., REN, F. Z., DING, B. Y., SUN, N. Y., a kol. A thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for sustained release of docetaxel. *Journal of Drug Targeting*, 2011, roč. 19, č. 7, str. 516-527.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/1061186x.2010.519031>
- [4] GAO, Y. A., SUN, Y., REN, F. Z., GAO, S. PLGA-PEG-PLGA hydrogel for ocular drug delivery of dexamethasone acetate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2010, roč. 36, č. 10, str. 1131-1138.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/03639041003680826>
- [5] CHANG, G. T., CI, T. Y., YU, L., DING, J. D. Enhancement of the fraction of the active form of an antitumor drug topotecan via an injectable hydrogel. *Journal of Controlled Release*, 2011, roč. 156, č. 1, str. 21-27.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.008>
- [6] CHOI, S., KIM, S. W. Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer depot in ZDF rats. *Pharmaceutical Research*, 2003, roč. 20, č. 12, str. 2008-2010.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000008050.99985.5c>
- [7] KHODAVERDI, E., HADIZADEH, F., TEKIE, F. S. M., JALALI, A., a kol. Preparation and analysis of a sustained drug delivery system by PLGA-PEG-PLGA triblock copolymers. *Polymer Bulletin*, 2012, roč. 69, č. 4, str. 429-438.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0747-5>
- [8] LI, K., YU, L., LIU, X. J., CHEN, C., a kol. A long-acting formulation of a polypeptide drug exenatide in treatment of diabetes using an injectable block copolymer hydrogel. *Biomaterials*, 2013, roč. 34, č. 11, str. 2834-2842.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.013>
- [9] UP, P. Tomáš Etrych - Polymerní léky proti rakovině. *Současná chemie*, Olomouc, 2014,
Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=FXpusSIHiW0>
- [10] GUPTA, P., VERMANI, K., GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, 2002, roč. 7, č. 10, str. 569-579.
Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02255-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02255-9)

- [11] LIOW, S. S., DOU, Q. Q., KAI, D., KARIM, A. A., a kol. Thermogels: In Situ Gelling Biomaterial. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2016, roč. 2, č. 3, str. 295-316. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00515>
- [12] MICHLOVSKA, L., VOJTOVA, L., HUMPA, O., KUCERIK, J., a kol. Hydrolytic stability of end-linked hydrogels from PLGA-PEG-PLGA macromonomers terminated by alpha,omega-itaconyl groups. *Rsc Advances*, 2016, roč. 6, č. 20, str. 16808-16816. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c5ra26222d>
- [13] MICHLOVSKA, L., VOJTOVA, L., MRAVCOVA, L., HERMANOVA, S., a kol. Functionalization Conditions of PLGA-PEG-PLGA Copolymer with Itaconic Anhydride. In CimrovaRypacek eds. *New Frontiers in Macromolecular Science*. Weinheim: Wiley-V C H Verlag GmbH, 2010, roč. 295, str. 119.
- [14] OBORNA, J., MRAVCOVA, L., MICHLOVSKA, L., VOJTOVA, L., a kol. The effect of PLGA-PEG-PLGA modification on the sol-gel transition and degradation properties. *Express Polymer Letters*, 2016, roč. 10, č. 5, str. 361-372. Dostupné z: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.34>
- [15] CHAMRADOVA, I., VOJTOVA, L., CASTKOVA, K., DIVIS, P., a kol. The effect of hydroxyapatite particle size on viscoelastic properties and calcium release from a thermosensitive triblock copolymer. *Colloid and Polymer Science*, 2017, roč. 295, č. 1, str. 107-115. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00396-016-3983-7>
- [16] RABÍŠKOVÁ, Miloslava. Od Galéna k lékovým systémům. *Remédia: Internetové stránky českého farmakoterapeutického dvouměsíčníku* [online]. 2006 [cit. 2018-06-02]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Od-Galena-k-lekovym-systemum/6-H-gB.magarticle.aspx>
- [17] RINGSDORF, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium*, 1975, , č. 51, str. 135-153.
- [18] WARD, M. A., GEORGIU, T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers*, 2011, roč. 3, č. 3, str. 1215-1242. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym3031215>
- [19] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Edtion ed.: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [20] ALEXANDER, A., AJAZUDDIN, KHAN, J., SARAF, S., a kol. Poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 2013, roč. 172, č. 3, str. 715-729. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.006>
- [21] CALO, E., KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 2015, roč. 65, str. 252-267. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>

- [22] SCHNEIDER, C., LANGER, R., LOVEDAY, D., HAIR, D. Applications of ethylene vinyl acetate copolymers (EVA) in drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 2017, roč. 262, str. 284-295.
Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.004>
- [23] RANADE, V. V. Drug delivery systems: 3A Role of polymers in drug delivery. *Journal of Clinical Pharmacology*, 1990, roč. 30, č. 1, str. 10-23.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1990.tb03432.x>
- [24] KOSTKOV, H., SCHINDLER, L., a kol. Star Polymer-Drug Conjugates with pH-Controlled Drug Release and Carrier Degradation. *Journal of Nanomaterials*, 2017, roč. 2017, str. 10.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/8675435>
- [25] SHOKRI, J., ADIBKIA, K. *Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries*. edited by VanDeVenGodbout. Edtion ed. Rijeka: Intech Europe, 2013. 47-66 s. ISBN 978-953-51-1191-7.
- [26] KANEKO, Y., SAKAI, K. Temperature-responsive hydrogels as intelligent materials. In Okano ed. *Biorelated polymers and gels: controlled release and application*. USA: Academic Press, 1998, str. 29-71.
- [27] BAE, Y. H., KWON, I. C. Stimuli-sensitive polymers for modulated drug release. In Okano ed. *Biorelated polymers and gels: controlled release and application*. USA: Academic Press, 1998, str. 93-134.
- [28] PEPPAS, N. A., BURES, P., LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, roč. 50, č. 1, str. 27-46.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4)
- [29] HOARE, T. R., KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 2008, roč. 49, č. 8, str. 1993-2007.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>
- [30] GUTOWSKA, A., JEONG, B., JASIONOWSKI, M. Injectable gels for tissue engineering. *Anatomical Record*, 2001, roč. 263, č. 4, str. 342-349.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ar.1115>
- [31] QIU, Y., PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Triggering in Drug Delivery Systems*, 2001, roč. 53, č. 3, str. 321-339.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00203-4)
- [32] MAHLUMBA, P., CHOONARA, Y. E., KUMAR, P., DU TOIT, L. C., a kol. Stimuli-Responsive Polymeric Systems for Controlled Protein and Peptide Delivery: Future Implications for Ocular Delivery. *Molecules*, 2016, roč. 21, č. 8, str. 21.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules21081002>
- [33] CHITKARA, D., SHIKANOV, A., KUMAR, N., DOMB, A. J. Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience*, 2006, roč. 6, č. 12, str. 977-990.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mabi.200600129>

- [34] KLOUDA, L., MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, roč. 68, č. 1, str. 34-45.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.02.025>
- [35] VADGAMA, P. *Surfaces and Interfaces for Biomaterials*. Edition ed. Cambridge: CRC Press, 2005. ISBN 1-85573-930-5.
- [36] HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, roč. 64, str. 18-23.
Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>
- [37] PETERKOVA, P., LAPCIK, L. Collagen - Properties, modifications and applications. *Chemické Listy*, 2000, roč. 94, č. 6, str. 371-379.
- [38] KUMAR, M. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 2000, roč. 46, č. 1, str. 1-27.
- [39] ALLCOCK, H. R., KUGEL, R. L. Synthesis of high polymeric alkoxy- and aryloxphosphonitriles. *Journal of the American Chemical Society*, 1965, roč. 87, č. 18, str. 4216-&.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja01096a056>
- [40] ALLCOCK, H. R., KWON, S., RIDING, G. H., FITZPATRICK, R. J., a kol. Hydrophilic polyphosphazenes as hydrogels - radiation cross-linking and hydrogel characteristics of poly bis(methoxyethoxyethoxy)phosphazene, *Biomaterials*, 1988, roč. 9, č. 6, str. 509-513.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(88\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(88)90046-4)
- [41] MINH, K. N., LEE, D. S. Injectable Biodegradable Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*, 2010, roč. 10, č. 6, str. 563-579.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mabi.200900402>
- [42] VINSOVA, J., KASAFIREK, E. Biologically active depsipeptides. *Chemické Listy*, 1998, roč. 92, č. 3, str. 197-208.
- [43] YANG, L. Q., HE, B., MENG, S., ZHANG, J. Z., a kol. Biodegradable cross-linked poly(trimethylene carbonate) networks for implant applications: Synthesis and properties. *Polymer*, 2013, roč. 54, č. 11, str. 2668-2675.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.03.059>
- [44] JEONG, B., BAE, Y. H., KIM, S. W. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules*, 1999, roč. 32, č. 21, str. 7064-7069.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma9908999>
- [45] JEONG, B., KIBBEY, M. R., BIRNBAUM, J. C., WON, Y. Y., a kol. Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA. *Macromolecules*, 2000, roč. 33, č. 22, str. 8317-8322.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma000638v>
- [46] JEONG, B., BAE, Y. H., KIM, S. W. Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 1999, roč. 16, č. 1-4, str. 185-193.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0927-7765\(99\)00069-7](https://doi.org/10.1016/s0927-7765(99)00069-7)

- [47] WU, Y. F., ZHU, D. W., GUO, Z. R., FENG, Y. J. Rheology and phase behavior of thermo-reversible pentablock terpolymer hydrogel. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 2013, roč. 51, č. 18, str. 1335-1342.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/polb.23343>
- [48] JEONG, B., BAE, Y. H., KIM, S. W. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Journal of Controlled Release*, 2000, roč. 63, č. 1-2, str. 155-163.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00194-7](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00194-7)
- [49] ZENTNER, G. M., RATHI, R., SHIH, C., MCREA, J. C., a kol. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *Journal of Controlled Release*, 2001, roč. 72, č. 1-3, str. 203-215.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00276-0](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00276-0)
- [50] SHIM, M. S., LEE, H. T., SHIM, W. S., PARK, I., a kol. Poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid) triblock copolymer and thermoreversible phase transition in water. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, roč. 61, č. 2, str. 188-196.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.10164>
- [51] JEONG, J. H., LIM, D. W., HAN, D. K., PARK, T. G. Synthesis, characterization and protein adsorption behaviors of PLGA/PEG di-block co-polymer blend films. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2000, roč. 18, č. 3-4, str. 371-379.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0927-7765\(99\)00162-9](https://doi.org/10.1016/s0927-7765(99)00162-9)
- [52] CHAMRADOVA, I., VOJTOVA, L., MICHLOVSKA, L., POLACEK, P., a kol. Rheological properties of functionalised thermosensitive copolymers for injectable applications in medicine. *Chemical Papers*, 2012, roč. 66, č. 10, str. 977-980.
Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/s11696-012-0210-y>
- [53] FREDENBERG, S., WAHLGREN, M., RESLOW, M., AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, roč. 415, č. 1-2, str. 34-52.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>
- [54] GUNATILLAKE, P. A., ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 2003, roč. 5, str. 1-16.
- [55] DE JONG, S. J., ARIAS, E. R., RIJKERS, D. T. S., VAN NOSTRUM, C. F., a kol. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus. *Polymer*, 2001, roč. 42, č. 7, str. 2795-2802.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0032-3861\(00\)00646-7](https://doi.org/10.1016/s0032-3861(00)00646-7)
- [56] FORCINO, R. G., JONNALAGADDA, S. The effect of fabrication methods on the mechanical and thermal properties of poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, roč. 104, č. 2, str. 944-949.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.25753>
- [57] PARK, T. G. Degradation of poly(D,L- Lactic acid) microspheres - effect of molecular weight. *Journal of Controlled Release*, 1994, roč. 30, č. 2, str. 161-173.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90263-1](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90263-1)

- [58] SANABRIA-DELONG, N., AGRAWAL, S. K., BHATIA, S. R., TEW, G. N. Controlling hydrogel properties by crystallization of hydrophobic domains. *Macromolecules*, 2006, roč. 39, č. 4, str. 1308-1310.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma052243n>
- [59] BALA, I., HARIHARAN, S., KUMAR, M. PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2004, roč. 21, č. 5, str. 387-422.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i5.20>
- [60] GRAYSON, A. C. R., CIMA, M. J., LANGER, R. Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials*, 2005, roč. 26, č. 14, str. 2137-2145.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.033>
- [61] GRIZZI, I., GARREAU, H., LI, S., VERT, M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(D,L -Lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*, 1995, roč. 16, č. 4, str. 305-311. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93258-f](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93258-f)
- [62] PARK, T. G. Degradation of poly(Lactic-co-Glycolic acid) microspheres - effect of copolymer composition. *Biomaterials*, 1995, roč. 16, č. 15, str. 1123-1130.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93575-x](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93575-x)
- [63] GILDING, D. K., REED, A. M. Biodegradable polymers for use in surgery - poly(ethylene oxide) poly(ethylene-terephthalate) (PEO-PET) copolymers *Polymer*, 1979, roč. 20, č. 12, str. 1454-1458.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(79\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0032-3861(79)90008-9)
- [64] FRUIJTIER-POLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, 2005, roč. 214, č. 1-2, str. 1-38.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.001>
- [65] FOX, S. A. A new type of surgical PEG. *American Journal of Ophthalmology*, 1946, roč. 29, č. 5, str. 586-587.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(46\)91519-x](https://doi.org/10.1016/0002-9394(46)91519-x)
- [66] KINAHAN, I. M., SMYTH, M. R. High-performance liquid-chromatographic determination of PEG-600 in human urine. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 1991, roč. 565, č. 1-2, str. 297-307.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80391-o](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80391-o)
- [67] CORLEY, R. A., SAGHIR, S. A., BARTELS, M. J., HANSEN, S. C., a kol. Extension of a PBPK model for ethylene glycol and glycolic acid to include the competitive formation and clearance of metabolites associated with kidney toxicity in rats and humans. *Toxicology and applied pharmacology*, 2011, roč. 250, č. 3, str. 229-244.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.10.011>
- [68] EWASCHUK, J. B., ZELLO, G. A., NAYLOR, J. A., BROCKS, D. R. Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002, roč. 781, č. 1-2, str. 39-56.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00500-7](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00500-7)

- [69] TAYLOR, M. S., DANIELS, A. U., ANDRIANO, K. P., HELLER, J. 6 Bioabsorbable polymers - in-vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *Journal of Applied Biomaterials*, 1994, roč. 5, č. 2, str. 151-157.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jab.770050208>
- [70] *Glycolic acid: Sigma-Aldrich* [online]. 2018 [cit. 2018-06-02] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/124737?lang=en@ion=CZ>
- [71] *Glycolic Acid Tech Grade* [online]. Chemours, 2017 [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: https://www.chemours.com/Glycolic_Acid/en_US/products/prod_pgs/grade_pgs/tech_grade.html
- [72] DING, A. G., SCHWENDEMAN, S. P. Determination of water-soluble acid distribution in poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, roč. 93, č. 2, str. 322-331.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.10524>
- [73] *Itaconic acid: Itaconic acid ≥ 99%* [online]. Sigma-Aldrich [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/i29204?lang=en@ion=CZ>
- [74] WILLKE, T., VORLOP, K. D. Biotechnological production of itaconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, roč. 56, č. 3-4, str. 289-295.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s002530100685>
- [75] KLEMENT, T., MILKER, S., JAGER, G., GRANDE, P. M., a kol. Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microbial Cell Factories*, 2012, roč. 11, str. 13.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-43>
- [76] CHEN, K. S., KU, Y. A., LIN, H. R., YAN, T. R., a kol. Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels. *Materials Chemistry and Physics*, 2005, roč. 91, č. 2-3, str. 484-489.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2004.12.037>
- [77] TOMIC, S. L., SULJOVRUJIC, E. H., FILIPOVIC, J. M. Biocompatible and bioadhesive hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate, monofunctional poly(alkylene glycol)s and itaconic acid. *Polymer Bulletin*, 2006, roč. 57, č. 5, str. 691-702.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00289-006-0606-3>
- [78] KRUSIC, M. K., FILIPOVIC, J. Copolymer hydrogels based on N-isopropylacrylamide and itaconic acid. *Polymer*, 2006, roč. 47, č. 1, str. 148-155.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.11.002>
- [79] CAYKARA, T., OZYUREK, C., KANTOGLU, O. Investigation of thermal behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) networks. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, roč. 103, č. 3, str. 1602-1607.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.24522>
- [80] DASH, S., MURTHY, P. N., NATH, L., CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2010, roč. 67, č. 3, str. 217-223.

- [81] ROSTAMIZADEH, K., MANAFI, M., NOSRATI, H., MANJILI, H. K., a kol. Methotrexate-conjugated mPEG-PCL copolymers: a novel approach for dual triggered drug delivery. *New Journal of Chemistry*, 2018, roč. 42, č. 8, str. 5937-5945.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c7nj04864e>
- [82] SALAMANCA, C. H., YARCE, C. J., MORENO, R. A., PRIETO, V., a kol. Natural gum-type biopolymers as potential modified nonpolar drug release systems. *Carbohydrate Polymers*, 2018, roč. 189, str. 31-38.
Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.011>
- [83] KHALID, I., AHMAD, M., MINHAS, M. U., BARKAT, K. Preparation and characterization of alginate-PVA-based semi-IPN: controlled release pH-responsive composites. *Polymer Bulletin*, 2018, roč. 75, č. 3, str. 1075-1099.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2079-y>
- [84] KHALID, I., AHMAD, M., USMAN MINHAS, M., BARKAT, K. Synthesis and evaluation of chondroitin sulfate based hydrogels of loxoprofen with adjustable properties as controlled release carriers. *Carbohydrate Polymers*, 2018, roč. 181, str. 1169-1179.
Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.092>
- [85] AL HANBALI, O. A., HAMED, R., ARAFAT, M., BAKKOUR, Y., a kol. Formulation and evaluation of diclofenac controlled release matrix tablets made of HPMC and Poloxamer 188 polymer: An assessment on mechanism of drug release. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, roč. 31, č. 1, str. 345-351.
- [86] OYAFUSO, M. H., CARVALHO, F. C., TAKESHITA, T. M., DE SOUZA, A. L. R., a kol. Development and In Vitro Evaluation of Lyotropic Liquid Crystals for the Controlled Release of Dexamethasone. *Polymers*, 2017, roč. 9, č. 8, str. 16.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym9080330>
- [87] YARCE, C. J., ECHEVERRI, J. D., PALACIO, M. A., RIVERA, C. A., a kol. Relationship between Surface Properties and In Vitro Drug Release from Compressed Matrix Containing Polymeric Materials with Different Hydrophobicity Degrees. *Pharmaceuticals*, 2017, roč. 10, č. 1, str. 20.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph10010015>
- [88] BAHRAM, M., HOSEINPOUR, F., MOHSENI, N., NAJAFI-MOGHADDAM, P. Kinetic Study of Ibuprofen Release from a pH- and Temperature-Sensitive Hydrogel, Based on Poly(styrene-alt-maleic anhydride) Copolymer. *Chiang Mai Journal of Science*, 2017, roč. 44, č. 1, str. 224-236.
- [89] KIM, K. K., PACK, D. W. *Microspheres for Drug Delivery. Biological and Biomedical Nanotechnology*. Boston: Springer, 2006, str. 19-50.
- [90] KING, T. W., PATRICK, C. W. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, roč. 51, č. 3, str. 383-390.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<383::Aid-ibm12>3.0.Co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<383::Aid-ibm12>3.0.Co;2-d)

- [91] ROSCA, I. D., WATARI, F., UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal of Controlled Release*, 2004, roč. 99, č. 2, str. 271-280.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.007>
- [92] MAKADIA, H. K., SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 2011, roč. 3, č. 3, str. 1377-1397.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
- [93] ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules 2. Polyactides and related polyesters. *Journal of Controlled Release*, 1991, roč. 17, č. 1, str. 1-21.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90126-x](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90126-x)
- [94] HO, M. L., FU, Y. C., WANG, G. J., CHEN, H. T., a kol. Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite. *Journal of Controlled Release*, 2008, roč. 128, č. 2, str. 142-148.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.012>
- [95] MORA-HUERTAS, C. E., FESSI, H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, roč. 385, č. 1-2, str. 113-142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- [96] TOORISAKA, E., ONO, H., ARIMORI, K., KAMIYA, N., a kol. Hypoglycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, roč. 252, č. 1-2, str. 271-274.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00674-9](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00674-9)
- [97] HAMPL, F., PALEČEK, J. Analgetika. *Farmakochemie*. Praha: VŠCHT Praha, 2002, str. 79-101, ISBN 80-7080-495-5.
- [98] HAMPL, F., PALECEK, J. Sulfonamidy. *Farmakochemie*. Praha: VŠCHT Praha, 2002, str. 304-309, ISBN 80-7080-495-5.
- [99] HYNIE, S. Sulfonamidy. *Farmakologie v kostce*. Praha: Triton, 2001, str. 520, ISBN 80-7254-181-1.
- [100] SHERVINGTON, L. A., SAKHNINI, N. A quantitative and qualitative high performance liquid chromatographic determination of acetaminophen and five of its para-substituted derivatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000, roč. 24, č. 1, str. 43-49.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(00\)00396-4](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(00)00396-4)
- [101] ABU-QARE, A. W., ABOU-DONIA, M. B. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, roč. 26, č. 5-6, str. 939-947.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(01\)00448-4](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(01)00448-4)
- [102] PISTOS, C., STEWART, J. T. Assay for the simultaneous determination of acetaminophen-caffeine-butalbital in human serum using a monolithic column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, roč. 36, č. 4, str. 737-741.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.07.042>

- [103] LANGLOIS, M. H., VEKRIS, A., BOUSSES, C., MORDELET, E., a kol. Development of a solvent-free analytical method for paracetamol quantitative determination in Blood Brain Barrier in vitro model. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2015, roč. 988, str. 20-24.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.02.019>
- [104] GARCIA, A., RUPEREZ, F. J., MARIN, A., DE LA MAZA, A., a kol. Poly(ethyleneglycol) column for the determination of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2003, roč. 785, č. 2, str. 237-243.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00904-2](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00904-2)
- [105] RAVISANKAR, S., VASUDEVAN, M., GANDHIMATHI, M., SURESH, B. Reversed-phase HPLC method for the estimation of acetaminophen, ibuprofen and chlorzoxazone in formulations. *Talanta*, 1998, roč. 46, č. 6, str. 1577-1581.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(98\)00043-5](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(98)00043-5)
- [106] ALTUN, M. L., ERK, N. The rapid quantitative analysis of phenprobamate and acetaminophen by RP-LC and compensation technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, roč. 25, č. 1, str. 85-92.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(00\)00490-8](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(00)00490-8)
- [107] KAWABATA, K., SUGIHARA, K., SANOH, S., KITAMURA, S., a kol. Ultraviolet-photoproduct of acetaminophen: Structure determination and evaluation of ecotoxicological effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2012, roč. 249, str. 29-35.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.07.018>
- [108] MARIN, A., GARCIA, E., GARCIA, A., BARBAS, C. Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, roč. 29, č. 4, str. 701-714.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00124-3](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00124-3)
- [109] ASPERGER, D., TISLER, V., ZRNCIC, M., PAVLOVIC, D. M., a kol. HPLC-DAD-FLD Determination of Veterinary Pharmaceuticals in Pharmaceutical Industry Wastewater with Precolumn Derivatization Using Fluorescamine. *Chromatographia*, 2014, roč. 77, č. 15-16, str. 1059-1066.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2685-x>
- [110] REEVES, V. B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1999, roč. 723, č. 1-2, str. 127-137.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(98\)00548-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(98)00548-9)
- [111] CHIAVARINO, B., CRESTONI, M. E., DI MARZIO, A., FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. *Journal of Chromatography B*, 1998, roč. 706, č. 2, str. 269-277.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00568-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00568-9)

- [112] SAITO, T., YAMAGIWA, T., KISHIYAMA, I., MIYAZAKI, S., a kol. Monolithic Spin Column Extraction and GC-MS for Simultaneously Detecting Nine Cold Medication Compounds and the Drug Bromoisovaleryl Urea in Human Serum. *Chromatographia*, 2009, roč. 70, č. 3-4, str. 519-526.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1204-y>
- [113] BISCEGLIA, K. J., YU, J. T., COELHAN, M., BOUWER, E. J., a kol. Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2010, roč. 1217, č. 4, str. 558-564.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.062>
- [114] NAGAMATSU, K., KUDO, K., USUMOTO, Y., TSUJI, A., a kol. Rapid screening of 18 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) using novel NAGINATA (TM) gas chromatography-mass spectrometry software. *Forensic Toxicology*, 2012, roč. 30, č. 1, str. 11-18.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11419-011-0121-6>
- [115] YU, J. T., BISCEGLIA, K. J., BOUWER, E. J., ROBERTS, A. L., a kol. Determination of pharmaceuticals and antiseptics in water by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry: analysis via pentafluorobenzoylation and stable isotope dilution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, roč. 403, č. 2, str. 583-591. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5846-5>
- [116] TRETTIN, A., ZOERNER, A. A., BOHMER, A., GUTZKI, F. M., a kol. Quantification of acetaminophen (paracetamol) in human plasma and urine by stable isotope-dilution GC-MS and GC-MS/MS as pentafluorobenzyl ether derivative. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, roč. 879, č. 23, str. 2274-2280.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.012>
- [117] TARBIN, J. A., CLARKE, P., SHEARER, G. Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1999, roč. 729, č. 1-2, str. 127-138.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(99\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(99)00142-5)
- [118] GOMEZ, M. J., BUENO, M. J. M., LACORTE, S., FERNANDEZ-ALBA, A. R., a kol. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 2007, roč. 66, č. 6, str. 993-1002.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.051>
- [119] DU, H. Q., ZHANG, C., MAO, K., WANG, Y. M. A star-shaped poly(2-methyl-2-oxazoline)-based antifouling coating: Application in investigation of the interaction between acetaminophen and bovine serum albumin by frontal analysis capillary electrophoresis. *Talanta*, 2017, roč. 170, str. 275-285.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.012>
- [120] ZHAO, S. L., BAI, W. L., YUAN, H. Y., XIAO, D. Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 2006, roč. 559, č. 2, str. 195-199.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.071>

- [121] AHRER, W., SCHERWENK, E., BUCHBERGER, W. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2001, roč. 910, č. 1, str. 69-78.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)01187-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)01187-0)
- [122] GIBBONS, S. E., WANG, C., MA, Y. F. Determination of pharmaceutical and personal care products in wastewater by capillary electrophoresis with UV detection. *Talanta*, 2011, roč. 84, č. 4, str. 1163-1168.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.030>
- [123] HEITMEIER, S., BLASCHKE, G. Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, roč. 721, č. 1, str. 93-108.
- [124] YANG, X. J., CHEN, Z. G., LIU, C., LI, O. L. Electromagnetic induction detector for capillary electrophoresis and its application in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 2010, roč. 82, č. 5, str. 1935-1942.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.013>
- [125] BOHNENSTENGEL, F., KROEMER, H. K., SPERKER, B. In vitro cleavage of paracetamol glucuronide by human liver and kidney β -glucuronidase: determination of paracetamol by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999, roč. 721, č. 2, str. 295-299.
Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00464-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00464-2)
- [126] KUNKEL, A., GÜNTER, S., WÄTZIG, H. Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment improvement of precision. *Journal of Chromatography A*, 1997, roč. 768, č. 1, str. 125-133.
Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00071-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00071-X)
- [127] CHU, Q. C., JIANG, L. M., AN, X. H., YE, J. N. Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 2008, roč. 606, č. 2, str. 246-251.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.015>
- [128] LIU, X. M., LIU, L. H., CHEN, H. L., CHEN, X. G. Separation and determination of four active components in medicinal preparations by flow injection-capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, roč. 43, č. 5, str. 1700-1705.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.002>
- [129] BUI, D. A., HAUSER, P. C. Absorbance detector for capillary electrophoresis based on light-emitting diodes and photodiodes for the deep-ultraviolet range. *Journal of Chromatography A*, 2015, roč. 1421, str. 203-208.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.005>

- [130] TONG, F. H., ZHANG, Y., CHEN, F., LI, Y., a kol. Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for trace analysis of sulfonamide compounds. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2013, roč. 942, str. 134-140.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.10.038>
- [131] CASLAVSKA, J., LIENHARD, S., THORMANN, W. Comparative use of 3 electrokinetic capillary methods for the determination of drugs in body-fluids - Prospects for rapid-determination of intoxications. *Journal of Chromatography*, 1993, roč. 638, č. 2, str. 335-342.
Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83446-y](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83446-y)
- [132] AZHAGVUEL, S., SEKAR, R. Method development and validation for the simultaneous determination of cetirizine dihydrochloride, paracetamol, and phenylpropanolamine hydrochloride in tablets by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, roč. 43, č. 3, str. 873-878.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.08.028>
- [133] PEREZ-RUIZ, T., MARTINEZ-LOZANO, C., TOMAS, V., GALERA, R. Migration behaviour and separation of acetaminophen and p-aminophenol in capillary zone electrophoresis: Analysis of drugs based on acetaminophen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, roč. 38, č. 1, str. 87-93.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.12.014>
- [134] CAPELLA-PEIRO, M. E., BOSE, D., RUBERT, M. F., ESTEVE-ROMERO, J. Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2006, roč. 839, č. 1-2, str. 95-101.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.023>
- [135] LI, T., SHI, Z. G., ZHENG, M. M., FENG, Y. Q. Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *Journal of Chromatography A*, 2008, roč. 1205, č. 1-2, str. 163-170.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.017>
- [136] FONT, G., JUAN-GARCIA, A., PICO, Y. Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat. *Journal of Chromatography A*, 2007, roč. 1159, č. 1-2, str. 233-241.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.062>
- [137] ULLSTEN, S., DANIELSSON, R., BACKSTROM, D., SJOBERG, P., a kol. Urine profiling using capillary electrophoresis-mass spectrometry and multivariate data analysis. *Journal of Chromatography A*, 2006, roč. 1117, č. 1, str. 87-93.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.048>
- [138] PIEST'ANSKY, J., MARAKOVA, K., KOVAL, M., MIKUS, P. Comparison of hydrodynamically closed isotachopheresis-capillary zone electrophoresis with hydrodynamically open capillary zone electrophoresis hyphenated with tandem mass spectrometry in drug analysis: Pheniramine, its metabolite and phenylephrine in human urine. *Journal of Chromatography A*, 2014, roč. 1358, str. 285-292.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.083>

- [139] Phosphate buffered saline. *Protocols Online* [online]. October 3, 2016 [cit. 2018-07-02].
Dostupné z: <https://www.protocolsonline.com/recipes/phosphate-buffered-saline-pbs/>
- [140] ŠŤASTNÝ, M. Nelineární regrese. *Matematické a statistické výpočty v Microsoft Excel*. Brno: Compute Press, 1999, str. 254, ISBN 80-7226-141-X.
- [141] LÁZNÍČKOVÁ, A., KUBÍČEK, V. Rovnováhy na fázových rozhraních. In *Základy fyzikální chemie*. Praha: Karolinum, 2008, str. 53-54, ISBN 978-80-246-1511-0.
- [142] COOK, S. F., KING, A. D., VAN DEN ANKER, J. N., WILKINS, D. G. Simultaneous quantification of acetaminophen and five acetaminophen metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Method validation and application to a neonatal pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2015, roč. 1007, str. 30-42.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.013>
- [143] POZDNYAKOV, I. P., ZHANG, X., MAKSIMOVA, T. A., YANSHOLE, V. V., a kol. Wavelength-dependent photochemistry of acetaminophen in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2014, roč. 274, str. 117-123. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.10.006>
- [144] MODICK, H., SCHUTZE, A., PALMKE, C., WEISS, T., a kol. Rapid determination of N-acetyl-4-aminophenol (paracetamol) in urine by tandem mass spectrometry coupled with on-line clean-up by two dimensional turbulent flow/reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2013, roč. 925, str. 33-39.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.023>
- [145] BARFIELD, M., SPOONER, N., LAD, R., PARRY, S., a kol. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008, roč. 870, č. 1, str. 32-37.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.05.025>
- [146] HEWAVITHARANA, A. K., LEE, S., DAWSON, P. A., MARKOVICH, D., a kol. Development of an HPLC-MS/MS method for the selective determination of paracetamol metabolites in mouse urine. *Analytical Biochemistry*, 2008, roč. 374, č. 1, str. 106-111.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.11.011>
- [147] TONOLI, D., VAREGIO, E., HOPFGARTNER, G. Quantification of acetaminophen and two of its metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography-low and high resolution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, roč. 904, str. 42-50.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.009>
- [148] ZHANG, Y., MEHROTRA, N., BUDHA, N. R., CHRISTENSEN, M. L., a kol. A tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, phenytoin, ranitidine, and theophylline in small volume pediatric plasma specimens. *Clinica Chimica Acta*, 2008, roč. 398, č. 1-2, str. 105-112.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.08.023>

- [149] MALDANER, L., JARDIM, I. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2012, roč. 100, str. 38-44.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.006>
- [150] DING, Y. J., ZHANG, W. H., GU, C., XAGORARAKI, I., a kol. Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2011, roč. 1218, č. 1, str. 10-16.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.112>
- [151] GROS, M., PETROVIC, M., BARCELO, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, 2006, roč. 70, č. 4, str. 678-690.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>
- [152] WANG, C. A., SHI, H. L., ADAMS, C. D., GAMAGEDARA, S., a kol. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Research*, 2011, roč. 45, č. 4, str. 1818-1828.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.043>
- [153] KIM, S. D., CHO, J., KIM, I. S., VANDERFORD, B. J., a kol. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 2007, roč. 41, č. 5, str. 1013-1021.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>
- [154] ESTERHUIZEN-LONDT, M., SCHWARTZ, K., BALSANO, E., KUHN, S., a kol. LC-MS/MS method development for quantitative analysis of acetaminophen uptake by the aquatic fungus *Mucor hiemalis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, roč. 128, str. 230-235.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.029>
- [155] BUENO, M. J. M., GOMEZ, M. J., HERRERA, S., HERNANDO, M. D., a kol. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring. *Environmental Pollution*, 2012, roč. 164, str. 267-273.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.038>
- [156] YI, S., CHUNG, Y. J., KIM, T. E., SHIN, H. S., a kol. Pharmacokinetics of Extended-Release Versus Conventional Tramadol/Acetaminophen Fixed-Dose Combination Tablets: An Open-Label, 2-Treatment, Multiple-Dose, Randomized-Sequence Crossover Study in Healthy Korean Male Volunteers. *Clinical Therapeutics*, 2011, roč. 33, č. 6, str. 728-737.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2011.04.023>
- [157] LOU, H. G., YUAN, H., RUAN, Z. R., JIANG, B. Simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine, dextrophan and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010, roč. 878, č. 7-8, str. 682-688.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.01.005>

- [158] SORENSEN, L. K. Determination of acidic and neutral therapeutic drugs in human blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Forensic Science International*, 2011, roč. 206, č. 1-3, str. 119-126.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.016>
- [159] KOSMA, C. I., LAMBROPOULOU, D. A., ALBANIS, T. A. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 2014, roč. 466, str. 421-438.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.044>
- [160] PAPAGEORGIOU, M., KOSMA, C., LAMBROPOULOU, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Science of the Total Environment*, 2016, roč. 543, str. 547-569.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.047>
- [161] TAN, Q. Y., ZHU, R. H., LI, H. D., WANG, F., a kol. Simultaneous quantitative determination of paracetamol and its glucuronide conjugate in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, roč. 893, str. 162-167.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.027>
- [162] KOMESLI, O. T., BAKIRDERE, S., BAYOREN, C., GOKCAY, C. F. Simultaneous determination of selected endocrine disrupter compounds in wastewater samples in ultra trace levels using HPLC-ES-MS/MS. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, roč. 184, č. 8, str. 5215-5224.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2334-x>
- [163] TRETTIN, A., JORDAN, J., TSIKAS, D. LC-MS/MS analysis of uncommon paracetamol metabolites derived through in vitro polymerization and nitration reactions in liquid nitrogen. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2014, roč. 966, str. 171-178.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.055>
- [164] TRETTIN, A., MODUN, D., MADUNIC, S., VUKOVIC, J., a kol. LC-MS/MS and GC-MS/MS measurement of plasma and urine di-paracetamol and 3-nitro-paracetamol: Proof-of-concept studies on a novel human model of oxidative stress based on oral paracetamol administration. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2014, roč. 959, str. 71-81.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.031>
- [165] BRAGA, R. C., TORRES, A. C. B., PERSIANO, C. B., ALVES, R. O., a kol. Determination of the cardioactive prototype LASSBio-294 and its metabolites in dog plasma by LC-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, roč. 55, č. 5, str. 1024-1030.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.02.031>
- [166] BOIX, C., IBANEZ, M., SANCHO, J. V., RAMBLA, J., a kol. Fast determination of 40 drugs in water using large volume direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2015, roč. 131, str. 719-727.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.005>

- [167] LUQUE-ESPINAR, J. A., NAVAS, N., CHICA-OLMO, M., CANTARERO-MALAGON, S., a kol. Seasonal occurrence and distribution of a group of ECs in the water resources of Granada city metropolitan areas (South of Spain): Pollution of raw drinking water. *Journal of Hydrology*, 2015, roč. 531, str. 612-625.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.10.066>
- [168] PEREIRA, C. D. S., MARANHO, L. A., CORTEZ, F. S., PUSCEDDU, F. H., a kol. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment*, 2016, roč. 548, str. 148-154.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.051>
- [169] CONLEY, J. M., SYMES, S. J., SCHORR, M. S., RICHARDS, S. M. Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. *Chemosphere*, 2008, roč. 73, č. 8, str. 1178-1187.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.062>
- [170] ROBLES-MOLINA, J., GILBERT-LÓPEZ, B., GARCÍA-REYES, J. F., MOLINA-DÍAZ, A. Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Science of the Total Environment*, 2014, roč. 479-480, str. 247-257.
Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.121>
- [171] HIBA, A., CARINE, A., HAIFA, A. R., RYSZARD, L., a kol. Monitoring of twenty-two sulfonamides in edible tissues: Investigation of new metabolites and their potential toxicity. *Food Chemistry*, 2016, roč. 192, str. 212-227.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.093>
- [172] GRANELLI, K., BRANZELL, C. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2007, roč. 586, č. 1-2, str. 289-295.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.12.014>
- [173] DUBREIL-CHENEAU, E., PIROTAIS, Y., VERDON, E., HURTAUD-PESSEL, D. Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: Validation according to European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 2014, roč. 1339, str. 128-136.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.003>
- [174] PAMREDDY, A., HIDALGO, M., HAVEL, J., SALVADO, V. Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2013, roč. 1298, str. 68-75.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.014>
- [175] D'ORAZIO, G., ROCCHI, S., FANALI, S. Nano-liquid chromatography coupled with mass spectrometry: Separation of sulfonamides employing non-porous core-shell particles. *Journal of Chromatography A*, 2012, roč. 1255, str. 277-285.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.032>

- [176] ECONOMOU, A., PETRAKI, O., TSIPI, D., BOTITSI, E. Determination of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in honey and validation according to Commission Decision 2002/657/EC for banned compounds. *Talanta*, 2012, roč. 97, str. 32-41.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.058>
- [177] LE-MINH, N., STUETZ, R. M., KHAN, S. J. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2012, roč. 89, str. 407-416.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.053>
- [178] MONTEIRO, S. H., FRANCISCO, J. G., CAMPION, T. F., PIMPINATO, R. F., a kol. Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Aquaculture*, 2015, roč. 447, str. 37-43.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.002>
- [179] FORTI, A. F., SCORTICHINI, G. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2009, roč. 637, č. 1-2, str. 214-219.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.007>
- [180] LU, K. H., CHEN, C. Y., LEE, M. R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 2007, roč. 72, č. 3, str. 1082-1087.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.022>
- [181] DIAZ-CRUZ, M. S., DE ALDA, M. J. L., BARCELO, D. Determination of antimicrobials in sludge from infiltration basins at two artificial recharge plants by pressurized liquid extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006, roč. 1130, č. 1, str. 72-82.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.076>
- [182] STOOB, K., SINGER, H. P., STETTLER, S., HARTMANN, N., a kol. Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, 2006, roč. 1128, č. 1-2, str. 1-9.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.048>
- [183] MSAGATI, T. A. M., NINDI, M. M. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*, 2004, roč. 64, č. 1, str. 87-100.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.038>
- [184] GARCIA-GALAN, M. J., DIAZ-CRUZ, S., BARCELO, D. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2013, roč. 1275, str. 32-40.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.004>

- [185] KIM, S. C., DAVIS, J. G., TRUMAN, C. C., ASCOUGH, J. C., a kol. Simulated rainfall study for transport of veterinary antibiotics - mass balance analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, roč. 175, č. 1-3, str. 836-843.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.086>
- [186] PAILLER, J. Y., KREIN, A., PFISTER, L., HOFFMANN, L., a kol. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*, 2009, roč. 407, č. 16, str. 4736-4743.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.042>
- [187] MCDONALD, M., MANNION, C., RAFTER, P. A confirmatory method for the simultaneous extraction, separation, identification and quantification of Tetracycline, Sulphonamide, Trimethoprim and Dapsone residues in muscle by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry according to Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 2009, roč. 1216, č. 46, str. 8110-8116.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.092>
- [188] TETZNER, N. F., MANIERO, M. G., RODRIGUES-SILVA, C. AND RATH, S. On-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils. *Journal of Chromatography A*, 2016, roč. 1452, str. 89-97.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.034>
- [189] RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, C. E., GARCIA-GALAN, M. J., BLANQUEZ, P., DIAZ-CRUZ, M. S., a kol. Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, roč. 213, str. 347-354.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.008>
- [190] SHELVER, W. L., HAKK, H., LARSEN, G. L., DESUTTER, T. M., a kol. Development of an ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-residue sulfonamide method and its application to water, manure slurry, and soils from swine rearing facilities. *Journal of Chromatography A*, 2010, roč. 1217, č. 8, str. 1273-1282.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.034>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Seznam textových zkratk

ACN	acetonitril
ABA	označení blokového kopolymeru typu PLGA-PEG-PLGA
BAB	označení blokový kopolymeru typu PEG-PLGA-PEG
BSTFA	bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CGC	(z angl. Critical Gel Concentration) kritická gelační koncentrace
CGT	(z angl. Critical Gel Temperature) kritická gelační teplota
DAD	(z angl. Diode Array Detector) detektor diodového pole
ESI	(z angl. Electrospray Ionization) ionizace elektrosprejem
FLD	(z angl. Fluorescence Detector) fluorescenční detektor
GA	(z angl. Glycolide nebo Glycolic Acid) glykolid nebo kyselina glykolová
GC-MS	(z angl. Gas Chromatography Mass Spectrometry) plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GC-MS/MS	plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPLC	(z angl. High- Pressure Liquid Chromatography) vysokúčinná kapalinová chromatografie
ITA	(z angl. Itaconic Anhydride) anhydrid kyseliny itakonové
K.P. model	Korsmeyer-Peppasův model
LA	(z angl. Lactide nebo Lactic Acid) laktid nebo kyselina mléčná
LC/MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LIT	(z angl. Linear Ion Trap) lineární iontová past
LIT-Orbitrap	spojení lineární iontové pasti a Orbitrapu
LOD	(z angl. Limit of Detection) limit detekce
LOQ	(z angl. Limit of Quantification) limit kvantifikace
MRM	(z angl. Multi Reaction Monitoring) několikanásobný reakční monitoring
MS	(z angl. Mass Spectrometry) hmotnostní spektrometrie
MTBSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -terc-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid
nHAp	nanohydroxyapatit
p.a.	pro analýzu
PAE	poly(β -aminoester)
PBS	(z angl. Phosphate Buffered Saline) pufovaný fyziologický roztok
PCL	(z angl. poly(ϵ -caprolactone)) poly(ϵ -kaprolakton)
PCM	paracetamol

Seznam textových zkratk pokračuje na následující straně.

PDI	(z angl. Polydispersity Index) index polydisperzity
PEG	polyethylenglykol
PFB-Br	pentafluorbenzylbromid
PGA	(z angl. Poly(Glycolic Acid)) poly(glykolová kyselina)
PHEMA/ITA	poly(2-hydroxyethylmethakrylitakonová kyselina)
PLA	(z angl. Poly(Lactic Acid)) poly(mléčná kyselina)
PLGA	(z angl. Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) kopolymer na bázi poly(mléčné) a poly(glykolové) kyseliny
PLLA	(z angl. poly(L-Lactic Acid) poly(L-mléčná kyselina)
PMAA	(z angl. Poly(methacrylic acid)) kyselina polymethakrylová
PNIPAM	poly(N-isopropylakrylamid)
PNIPAM/ITA	poly(N-isopropylakrylamiditakonová kyselina)
PNVP/ITA	poly(N-vinyl-2-pyrrolidonitakonová kyselina)
PTMC	(z angl. poly(trimethylene carbonate)) poly(trimethylkarbonát)
Qq-TOF	spojení kvadrupólového analyzátoru a analyzátoru doby letu
QQQ	(z angl. Triple Quadrupole) označení pro trojitý kvadrupól
QQQ-LIT	kombinace trojitého kvadrupólu a lineární iontové pasti
R ²	koeficient determinace
STA	sulfathiazol
TBDMCS	terc-butyldimethylchlorsilan
TMCS	trimethylchlorsilan
TOF	(z angl. Time of Flight) průletový analyzátor
UHPLC	(z angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography) ultra účinná kapalinová chromatografie
UV	(z angl. Ultraviolet electromagnetic spectrum) oblast ultrafialového záření
VIS	(z angl. Visible electromagnetic spectrum) oblast viditelného záření

Seznam zkratk fyzikálně-chemických veličin

G'	modul pružnosti ve smyku	[Pa]
M_n	střední číselná molekulová hmotnost polymeru	[g·mol ⁻¹]
M_w	průměrná hmotnostní molekulová hmotnost polymeru	[g·mol ⁻¹]
pKa	disociační konstanta kyselin	

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Schématické znázornění fluktuace koncentrace léčiva při konvenčním podávání v porovnání s kontrolovaným a prodlužovaným uvolňováním.....	12
Obrázek 2	Uvolňování léčiva pomocí difúze ze zásobníku tvořeného polymerem.....	14
Obrázek 3	Uvolňování léčiva ze systému kontrolovatelného pomocí osmózy	15
Obrázek 4	Vznik micel.....	17
Obrázek 5	Schématické znázornění mechanismu uvolňování léčiva z hydrogelu pomocí aplikace vnějšího elektrického pole.....	18
Obrázek 6	Strukturní vzorec polyfosfazenů.....	20
Obrázek 7	Ukázkové znázornění sol-gel fázového diagramu.....	22
Obrázek 8	Strukturní vzorec triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA	23
Obrázek 9	Strukturní vzorec triblokového kopolymeru ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA.....	25
Obrázek 10	Schématické znázornění mechanismu uvolňování léčiva z polymerní matrice	26
Obrázek 11	Faktory ovlivňující uvolňování léčiva z PLGA polymeru	27
Obrázek 12	Schéma mechanismu degradace PLGA.....	28
Obrázek 13	Struktura polyethylenglykolu.....	29
Obrázek 14	Schéma metabolismu ethylenglykolu.....	30
Obrázek 15	Struktura D a L izomeru kyseliny mléčné.....	31
Obrázek 16	Vzorec kyseliny glykolové.....	31
Obrázek 17	Vzorec kyseliny itakonové	32
Obrázek 18	Profily uvolňování skládající se z různých fází	33
Obrázek 19	Strukturní vzorec paracetamolu	36
Obrázek 20	Strukturní vzorec sulfathiazolu.....	36
Obrázek 21	HPLC Agilent 1100 Series s DAD detektorem a hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series	45
Obrázek 22	HPLC Waters 2695LC s hmotnostním spektrometrem Quatro Micro™ API	46
Obrázek 23	Zobrazení posunu gelační teploty a změny hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 22 hm./obj. % kopolymer typu ABA připraveného v PBS s přidavkem paracetamolu (PCM) a bez přidavku léčiva	48
Obrázek 24	Porovnání posunu hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 10 hm./obj. % kopolymer typu ABA připraveného v Milli-Q vodě s přidavkem paracetamolu (PCM) a bez přidavku léčiva	49
Obrázek 25	Zobrazení posunu gelační teploty v maximu tuhosti a změny hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 22 hm./obj. % kopolymer typu ITA/ABA/ITA připraveného v Milli-Q vodě s přidavkem sulfathiazolu a bez přidavku léčiva	50
Obrázek 26	Porovnání hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 12 hm./obj. % roztok kopolymeru typu ABA připraveného v PBS s přidavkem paracetamolu a směsi o stejné koncentraci paracetamolu i s přidavkem nHAp	52
Obrázek 27	Porovnání hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 12 hm./obj. % roztok kopolymeru typu ABA připraveného v PBS s různými koncentracemi paracetamolu.....	53
Obrázek 28	Porovnání hodnot modulu pružnosti ve smyku G' pro 12 hm./obj. % roztok kopolymeru typu ABA připraveného v PBS s přidavkem $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu (ABA + STA) a směsi o stejné koncentraci sulfathiazolu i s přidavkem 0,5 hm.% nanohydroxyapatitu (ABA+STA+nHAp).....	54
Obrázek 29	Proložení naměřených experimentálních dat kumulativně uvolněného sulfathiazolu (STA) $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ s Korsmeyer-Peppasovým modelem.....	56
Obrázek 30	Zobrazení residuí pro Korsmeyer-Peppasův model uvolňování $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ STA.....	56

Obrázek 31	Zobrazení průběhu odezvy rychlostní konstanty k na odezvě „Kritéria“ pro experiment uvolňování $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu	58
Obrázek 32	Zobrazení průběhu odezvy parametru uvolňování n na odezvě „Kritéria“ pro experiment uvolňování $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu	59
Obrázek 33	Uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA v PBS a proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem.....	60
Obrázek 34	Zobrazení residuí pro Korsmeyer-Peppasův model pro systém uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA v PBS	60
Obrázek 35	Uvolňování sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem.....	61
Obrázek 36	Zobrazení residuí daného modelu z Obrázek 35 pro jednotlivé testované koncentrace sulfathiazolu	61
Obrázek 37	Uvolňování $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru v PBS a v Milli-Q vodě a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem.....	63
Obrázek 38	Kumulativní uvolňování PCM z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem	64
Obrázek 39	Uvolňování $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ sulfathiazolu a paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem	65
Obrázek 40	Zleva: Freundlichova a Langmuirova adsorpční izoterma.....	67
Obrázek 41	Uvolňování $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ paracetamolu (PCM) z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě. Ukázkové proložení experimentálních dat O.K. modelem.....	68
Obrázek 42	Zobrazení residuí pro O.K. model pro systém uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% kopolymeru ABA v Milli-Q vodě	68
Obrázek 43	Zobrazení průběhu odezvy rychlostní konstanty k na odezvě kritéria pro systém $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ paracetamolu uvolněného z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě.....	69
Obrázek 44	Zobrazení průběhu odezvy parametru uvolňování n na odezvě kritéria pro systém $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ paracetamolu uvolněného z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě.....	69
Obrázek 45	Kumulativní uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v PBS a jeho proložení naměřených experimentálních dat O.K. modelem.....	72
Obrázek 46	Kumulativní uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ABA kopolymeru v Milli-Q vodě a jeho proložení naměřených experimentálních dat O.K. modelem.....	73
Obrázek 47	Grafické znázornění uvolňování paracetamolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru s nHApem a bez nanočástic HAp v PBS.....	74
Obrázek 48	Grafické znázornění uvolňování $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ paracetamolu a sulfathiazolu z hydrogelu připraveného z 12 hm./obj.% ABA kopolymeru s nHAp v prostředí PBS	75
Obrázek 49	Grafické znázornění uvolňování $13 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ paracetamolu z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného ve vodě.....	76
Obrázek 50	Porovnání kumulativního uvolňování $13 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ paracetamolu z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu připraveného ve vodě a v PBS.....	77

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Přehled komerčně dostupných produktů pro uvolňování léčivých látek pomocí řízeného uvolňování.....	13
Tabulka 2	Přehled léčivých látek testovaných na uvolňování z PLGA-PEG-PLGA.....	23
Tabulka 3	Interpretace difúzního mechanismu uvolňování z polymerní matrice	35
Tabulka 4	Přehled přístrojů použitých k analýze	40
Tabulka 5	Přehled testovaných koncentrací léčiv a kopolymerů.....	42
Tabulka 6	Parametry HPLC stanovení pro chromatograf Agilent 1100.....	44
Tabulka 7	Parametry MS stanovení pro hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series	44
Tabulka 8	Základní metrologické parametry na přístroji Agilent 1100 Series s hmotnostním spektrometrem Agilent 6320 Series.....	44
Tabulka 9	Parametry HPLC stanovení pro chromatograf Waters 2695LC.....	45
Tabulka 10	Parametry MS stanovení pro hmotnostní spektrometr Quatro Micro™ API.....	45
Tabulka 11	Základní metrologické parametry měření na přístroji HPLC Waters 2695LC s hmotnostním spektrometrem Quatro Micro™ API.....	46
Tabulka 12	Přehled stability a hodnot pH 22 hm./obj.% ABA a ITA/ABA/ITA hydrogelů s paracetamolem (PCM) v různých prostředích (rozpouštědlo/inkubační médium).	49
Tabulka 13	Přehled stability a hodnot pH 22 hm./obj.% ABA a ITA/ABA/ITA hydrogelu se sulfathiazolem (STA) v různých prostředích (rozpouštědlech/inkubačních médiích).	51
Tabulka 14	Přehled stability a hodnot pH 12 hm./obj.% ABA hydrogelu připraveného v PBS s přísadkou nanohydroxyapatitu (nHAp) a léčivými látkami.....	51
Tabulka 15	Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z Korsmeyer-Peppasova modelu pro sulfathiazol uvolňovaný z ABA hydrogelu.	62
Tabulka 16	Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z Korsmeyer-Peppasova modelu pro léčiva uvolňovaná z hydrogelu připraveného z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA kopolymeru v PBS.	63
Tabulka 17	Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z Korsmeyer-Peppasova modelu pro PCM uvolňovaný z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu v Milli-Q vodě.	65
Tabulka 18	Přehled vypočtených F_c a F_{exp} hodnot pro Korsmeyer-Peppasův model a nově navržený O.K. model pro uvolňování paracetamolu.....	70
Tabulka 19	Přehled vypočtených F_c a F_{exp} hodnot pro Korsmeyer-Peppasův model a nově navržený O.K. model pro uvolňování sulfathiazolu.....	71
Tabulka 20	Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z O.K. modelu pro paracetamol uvolňovaný z 22 hm./obj.% ABA hydrogelu. ..	72
Tabulka 21	Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z O.K. modelu pro léčiva uvolňovaná z 12 hm./obj.% ABA hydrogelu a kompozitu ABA s nHAp v PBS.....	73
Tabulka 22	Vypočtené exponenty uvolňování n a rychlostní konstanty k vycházející z O.K. modelu pro paracetamol uvolňovaný z 22 hm./obj.% ITA/ABA/ITA hydrogelu v Milli-Q vodě	75

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1	Přehled LC/MS metod pro stanovení paracetamolu	105
Příloha 2	Přehled LC/MS metody pro stanovení sulfathiazolu	107
Příloha 3	Chromatogram paracetamolu	109
Příloha 4	Chromatogram sulfathiazolu	110
Příloha 5	Schematické zobrazení přípravy vzorků	111

PŘÍLOHY

Příloha 1: Přehled LC/MS metod pro stanovení paracetamolu

Mobilní fáze	Kolona	Ionizace	Analyzátor	Literatura
<ul style="list-style-type: none"> 10 mM CH₃COONH₄ (pH=3,5) MeOH 	Poroshell 120 EC C18 (100×2,1 mm; 2,7 μm)	ESI	QQQ	[142]
<ul style="list-style-type: none"> ACN 0,1 % HCOOH 	Zorbax XDB C18 (150×4,6 mm; 5 μm)	ESI	Q-TOF	[143]
<ul style="list-style-type: none"> H₂O MeOH 1 mM CH₃COONH₄ (pH = 6,5 – 6,8) 	Atlantis T3 C18 (150×3,0 mm; 3 μm)	ESI	QQQ	[144]
<ul style="list-style-type: none"> 10 mM HCOONH₄ MeOH 	Polaris Amide C18 (50×3,2 mm; 3 μm)	ESI	QQQ	[145]
<ul style="list-style-type: none"> ACN 0,1 % HCOOH 	Cogent phenyl (50×2,1 mm; 5 μm)	ESI	QQQ	[146]
<ul style="list-style-type: none"> 5 mM CH₃COONH₄ (pH = 4,7) MeOH 	Ultra-HT Hydrosphere C18 (150×2,1 mm; 2 μm)	ESI	QQQ-LIT	[147]
<ul style="list-style-type: none"> H₂O MeOH 0,05 % HCOOH 	Luna C18 (150×3,0 mm; 3 μm)	ESI	QQQ	[148]
<ul style="list-style-type: none"> H₂O MeOH 0,1 % HCOOH 	XTerra MS C18 (100×3,0 mm; 3,5 μm)	ESI	QQQ	[149]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH ACN obsahující 0,1 % HCOOH 	Luna C18 (150×4,6 mm; 3 μm)	ESI	QQQ	[150]
<ul style="list-style-type: none"> ACN: MeOH (2:1) 5 mM CH₃COONH₄ upraven CH₃COOH na pH 4,7 	Purospher Star RP- 18 C18 (125×2,0 mm; 5 μm)	ESI	QQQ	[151]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1% HCOOH v ACN 	Supelco C18 (150×2,1 mm; 5 μm)	ESI	QQQ-LIT	[152]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH MeOH 	Synergi Max-RP C12 (250×4,6 mm; 4 μm)	ESI	QQQ	[153]
<ul style="list-style-type: none"> 0,2 % HCOOH 0,2 % HCOOH v MeOH 	Kinetex C18 (50×2,1 mm; 2,6 μm)	ESI	QQQ	[154]
<ul style="list-style-type: none"> ACN 0,1 % HCOOH 	Zorbax SB C18 (250×3,0 mm; 5 μm)	ESI	QQQ - LIT	[155]

Přehled LC/MS metod pro stanovení paracetamolu pokračuje na následující straně.

Mobilní fáze	Kolona	Ionizace	Analyzátor	Literatura
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH ACN 	Zorbax Eclipse XDB C8 (150×4,6 mm; 5 μm)	ESI	QQQ - LIT	[156]
<ul style="list-style-type: none"> 0,3 % CH₃COOH MeOH 	YMC-ODS-AQ C18 (100×2,0 mm; 3 μm)	ESI	QQQ	[157]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % CH₃COOH 0,1 % CH₃COOH v MeOH 	Synergi Polar-RP C18 (2,0×150 mm; 4 μm)	ESI	QQQ	[158]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1% HCOOH 0,1 % HCOOH v ACN 	Restek C18 (150×4,6 mm; 5 μm)	ESI	LIT – Orbitrap	[159]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH MeOH 	Athena C18 (250×4,6 mm; 5 μm)	ESI	QQQ	[160]
<ul style="list-style-type: none"> 0,08 % HCOOH ACN MeOH 	Ultimate C18 (100×2,1 mm; 3 μm)	ESI	kvadrupól	[161]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 5 mM HCOONH₄ MeOH 	Zorbax SB C8 (100×2,1 mm; 3,5 μm)	ESI	kvadrupól	[162]
<ul style="list-style-type: none"> 2 mM CH₃COONH₄ upraven na pH=3 pomocí 0,1 % HCOOH ACN 	Acquity BEH C18 (100×2,1 mm; 1,7 μm)	ESI	QQQ	[163, 164]
<ul style="list-style-type: none"> MeOH 10 mM CH₃COONH₄ 	Zorbax RRHD SB - C18 (50×2,1 mm; 1,8 μm)	ESI	kvadrupól	[165]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1 % HCOOH v MeOH 	Zorbax Eclipse XDB – C18 (50×4,6 mm; 1,8 μm)	ESI	QQQ-LIT	[166]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH v MeOH ACN 	Acquity BEH C18 (100×2,1 mm; 1,7 μm)	ESI	QQQ	[167]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH ACN 	Zorbax Eclipse XDB – C18 (50×4,6 mm; 1,8 μm)	ESI	QQQ-LIT	[168]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1 % HCOOH v ACN 	Shield RP C18 (50×2,1 mm; 1,7 μm)	ESI	QQQ	[169]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH ACN 	Zorbax Eclipse XDB – C18 (50×4,6 mm; 1,8 μm)	ESI	TOF	[170]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % NH₃ MeOH 	Acquity BEH C18 (50×2,1 mm; 1,7 μm)	ESI	QQQ	[167]

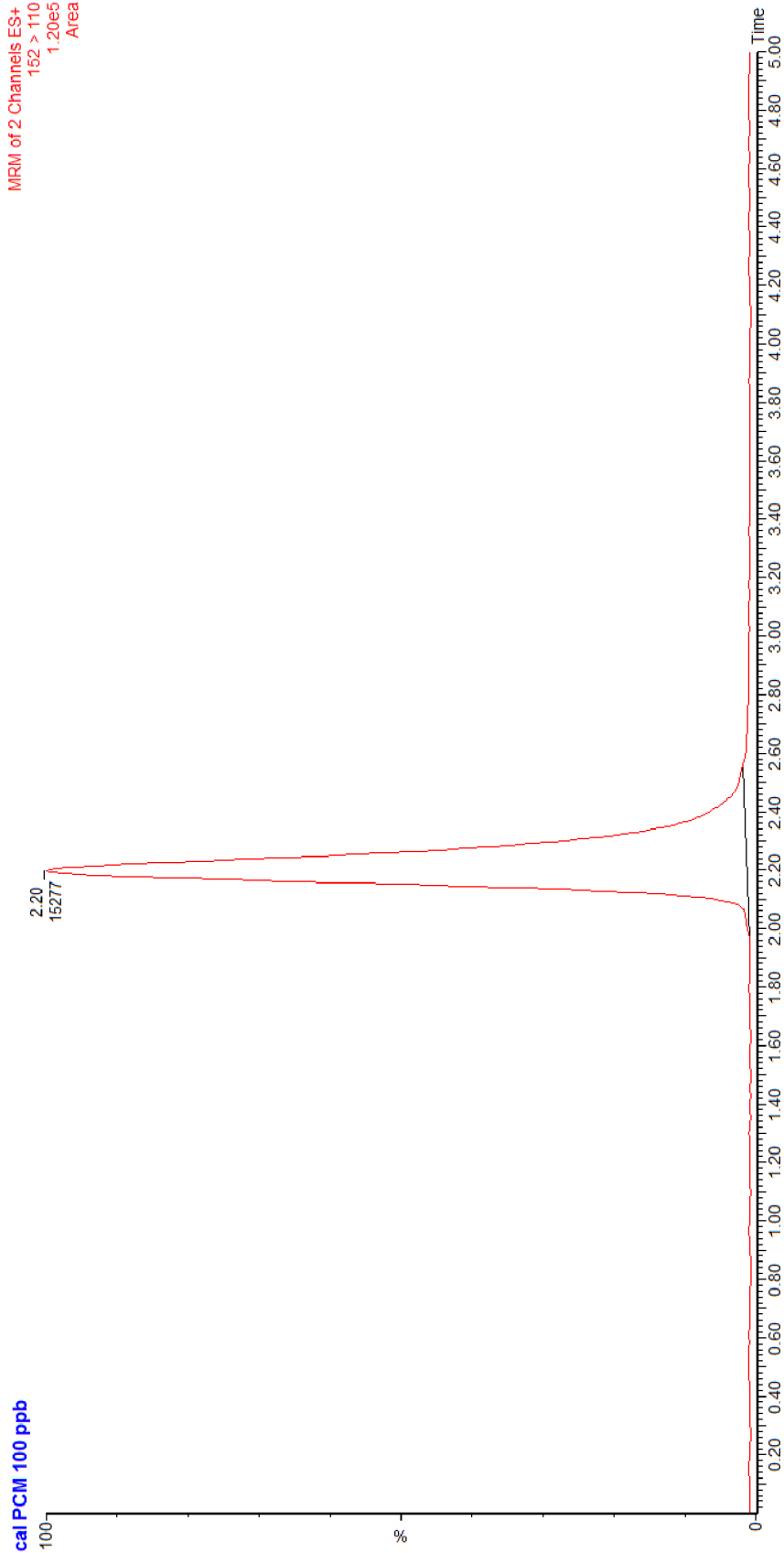
Příloha 2: Přehled LC/MS metody pro stanovení sulfathiazolu

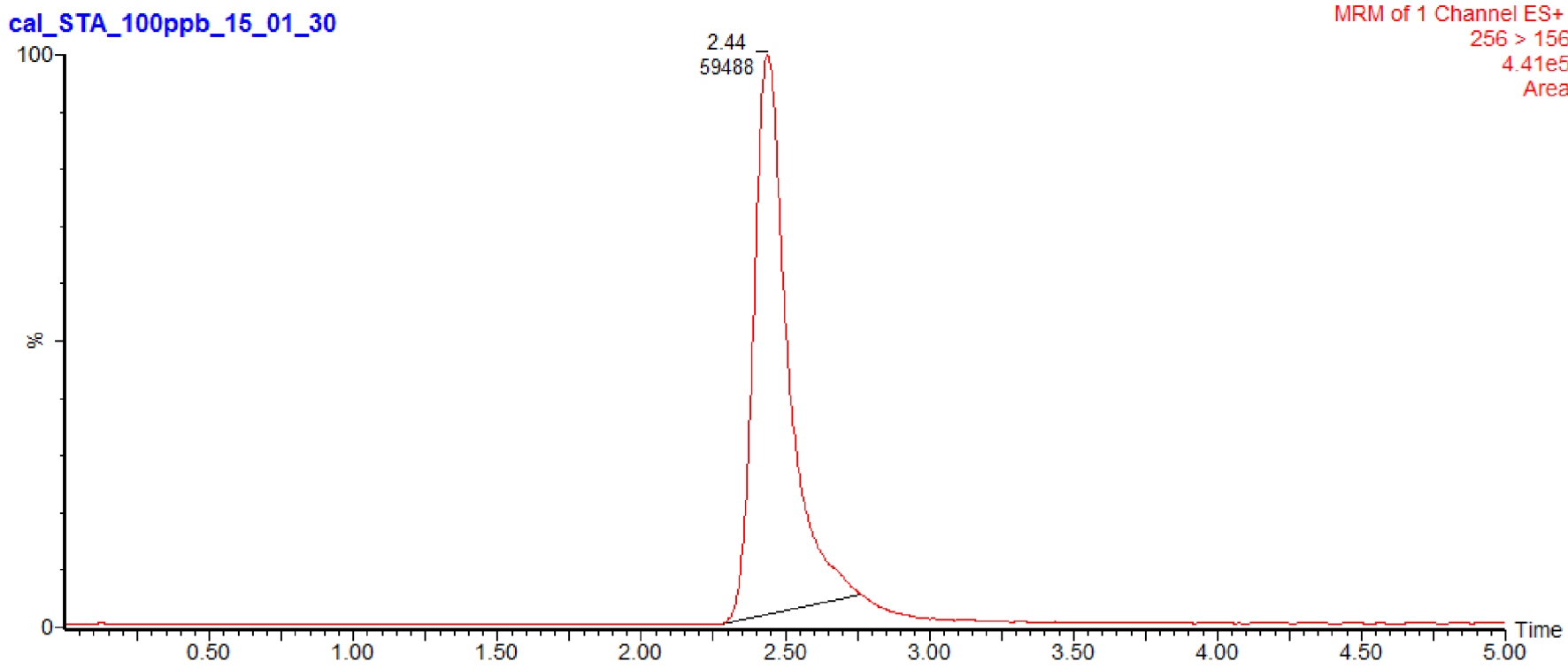
Mobilní fáze	Kolona	Ionizace	Analyzátor	Literatura
<ul style="list-style-type: none"> 0,01 % HCOOH MeOH 	Zorbax Eclipse XDB C8 (100×2,1 mm; 3,5 µm)	ESI	QQQ a LIT- Orbitrap	[171]
<ul style="list-style-type: none"> 0,2 % HCOOH obsahující 0,1 mM (COOH)₂ ACN 	Genesis C18 (50×2,1 mm; 4 µm)	ESI	QQQ	[172]
<ul style="list-style-type: none"> 0,2 % HCOOH ACN 	Symmetry C18 (100×2,1 mm; 3,5 µm)	ESI	QQQ	[173]
<ul style="list-style-type: none"> 1 % CH₃COOH MeOH 	Luna C18 (150×4,6 mm; 5 µm)	ESI	QQQ	[174]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1 % HCOOH v ACN 	Kinetex C18 (100×2,1 mm; 2,6 µm)	nano- ESI	iontová past	[175]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1 % HCOOH v ACN 	Xterra MS C18 (150×2,1 mm; 3,5 µm)	ESI	QQQ	[176]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1 % HCOOH v MeOH 	Luna C18 (150×4,6 mm; 5 µm)	ESI	QQQ-LIT	[177]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1 % HCOOH v ACN 	Zorbax Eclipse Plus C18 (100×3 mm; 3,5 µm)	ESI	QQQ	[178]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH MeOH 5 mM CH₃COONH₄ 	Luna ODS(2) C18 (75×4,6 mm; 3 µm)	ESI	QQQ	[179]
<ul style="list-style-type: none"> H₂O ACN 	Supelco LC-18DB C18 (250×4,6 mm; 5 µm)	ESI	Q-LIT	[180]
<ul style="list-style-type: none"> 1 % HCOOH 1 % HCOOH v ACN 	Atlantis C18 (150×2,1 mm; 3 µm)	ESI	QQQ	[181]
<ul style="list-style-type: none"> 1 mM CH₃COOH 1 mM CH₃COOH v ACN 	Nucleodur Gravity C18 (125×2,0 mm; 5 µm)	ESI	QQQ	[182]
<ul style="list-style-type: none"> 25 mM CH₃COOH 25 mM CH₃COOH v MeOH 	Clipseus Higgins C18 (150×3,0 mm; 5 µm)	ESI	LIT	[183]
<ul style="list-style-type: none"> 10 mM HCOOH 10 mM HCOOH v ACN 	Atlantis C18 (150×2,1 mm; 3 µm)	ESI	Q-LIT	[184]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH ACN 	Xterra MS C18 (50×2,0 mm; 2,5 µm)	ESI	iontová past	[185]
<ul style="list-style-type: none"> 0,1 % HCOOH 0,1 % HCOOH v ACN 	Nucleodur C-18 ISIS (125×2,0 mm; 3 µm)	ESI	QQQ	[186]
<ul style="list-style-type: none"> 0,05 % HCOOH 0,05 % HCOOH v ACN 	Acquity BEH C18 (100×2,1 mm; 1,7 µm)	ESI	QQQ	[187]

Přehled LC/MS metod pro stanovení sulfathiazolu pokračuje na následující straně

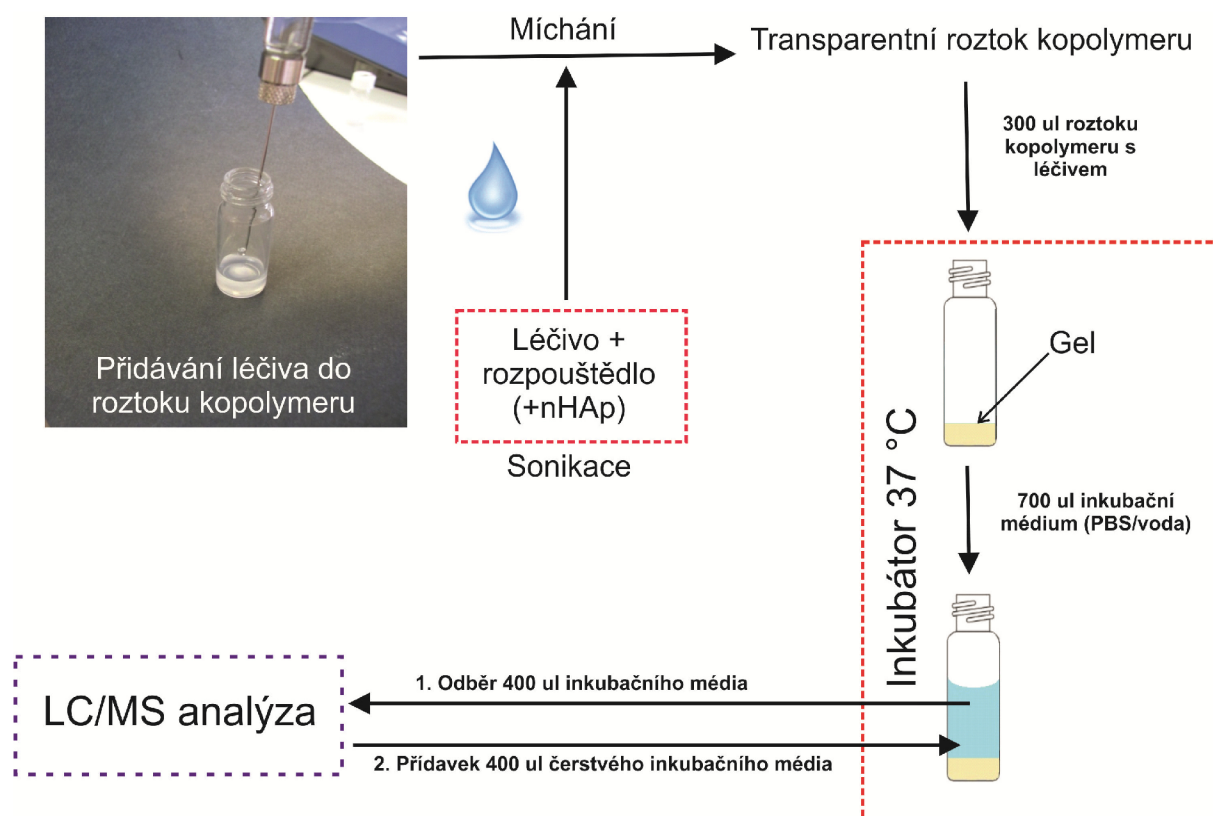
Mobilní fáze	Kolona	Ionizace	Analyzátor	Literatura
<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 % HCOOH • 0,1 % HCOOH v MeOH 	Acquity BEH C18 (50×2,1 mm; 1,7 μm)	ESI	QQQ	[188]
<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM HCOOH • 10 mM HCOOH v ACN 	Acquity BEH C18 (100×2,1 mm; 1,7 μm)	ESI	Qq-TOF	[189]
<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 % HCOOH v H₂O s přídavkem 5% MeOH • 0,2 % HCOOH v MeOH 	Acquity BEH C18 (50×2,1 mm; 1,7 μm)	ESI	QQQ	[190]

Příloha 3: Chromatogram paracetamolu





Příloha 5: Schematické zobrazení přípravy vzorků



ŽIVOTOPIS AUTORA

ING. JANA OBORNÁ

Datum a místo narození: 22. 1. 1987, Brno
Adresa: Měnin 355, 664 57 Měnin
Telefon: + 420 608 430 554
E-mail: jana.oborna@gmail.cz

Pracovní zkušenosti

2/2016 – dosud

Vědecko-výzkumný pracovník

Regionální centrum pro výzkum technologií a materiálů, Olomouc

Odpovědnost za řešení projektů v rámci aplikací inovativních sanačních a dekontaminačních technologií. Vzorkování podzemních vod. Analýza BTEX, chlorovaných ethylenů a chlorbenzenu pomocí GC/FID. Vývoj nanomateriálů na bázi nulamocného železa a pokročilých oxidačních materiálů, jejich testování na modelových i reálných vzorcích vod.

3/2013 – 5/2014

Technicko-hospodářský pracovník

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Realizace vědecké a výzkumné práce na HPLC/DAD/FLD, GPC/RID, LC/MS, UHPLC/DAD přístrojích. Odpovědnost za zpracování vzorků před analýzou. Organizace a výuka instrumentální a strukturní analýzy a environmentální analýzy. Zajištění provozu vybraných laboratoří UCHTOŽP.

6/2012 – 9/2012

Laborant

Asio spol. s r.o., Brno

Odpovědnost za zpracování vzorků odpadních vod a jejich analýzu pro vývoj. Zejména pak testování železa ve vysokých oxidačních stavech a nulamocného železa na vzorcích odpadních vod. Spektrofotometrické stanovení CHSK_Cr a orthofosforečnanů ve vzorcích odpadních vod.

Odborné a zahraniční stáže

9/2016

Pracovní stáž

Dekonta a.s., Praha

Jednoměsíční stáž v rámci řešení projektu „Pokročilé nanotechnologie pro minimalizaci následků úniku nebezpečných chemických látek ohrožujících obyvatelstvo.“ Obeznamení se s praktickými přístupy při zásazích úniků chemikálií do Ž.P. a zaučení zaměstnanců Dekonta a.s. s testováním nanomateriálů na specificky znečištěných vodách.

9/2014 – 5/2015

Zahraniční stáž v rámci doktorského studia

Environmental Research Institute, Skotsko, U.K.

Řešení části dizertační práce a analýza léčiv na přístroji LC/MS.

Vzdělání

2011 – dosud

Doktorské studium

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Dizertační práce: Kontrolované uvolňování léčiv z biodegradabilních hydrogelů

2009 – 2011

Magisterské studium

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Diplomová práce: Studium degradace biokompatibilních kopolymerů

2006 – 2009

Bakalářské studium

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

Obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Bakalářská práce: Studium degradace biokompatibilních polymerů

2002 – 2006

Maturitní studium

Střední průmyslová škola chemická, Brno

Obor: Aplikovaná chemie se zaměřením na analytickou chemii

Přehled absolvovaných odborných škol, kurzů a seminářů

2017

První pomoc – resuscitace dle ERC Guidelines 2015

Jednodenní intenzivní kurz zaměřený na postupy poskytování první pomoci s praktickými ukázkami dle ERC Guidelines 2015.

2014

10th Summer School of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, RECETOX

Pětidenní letní škola zaměřená na: zdroje, transformaci a dálkový transport polutantů v životním prostředí; vzorkovací a analytické techniky; toxické a ekotoxické vlivy na biotu; biotesty a biomonitoring; hodnocení rizik, analýza dat a modelování zahrnující geografický informační systém (GIS)

2013

Nové trendy v instrumentální analýze

Jednodenní seminář zabývající se pokroky v GC, HPLC a IC analýze a hmotnostní spektrometrii. Stopovou anorganickou analýzou pomocí AAS, ICP a ICP-MS. Fyzikálními technikami jako jsou reologie a porozimetrie.

- 2013 Superkritická fluidní chromatografie s hmotnostní detekcí**
Jednodenní seminář zaměřený na spojení superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní detekcí a na HPLC kolony s pevným jádrem.
- 2013 Hmotnostní spektrometrii ve spojení s Fast GC**
Jednodenní seminář zaměřen na spojení hmotnostní spektrometrie s tzv. rychlou plynovou chromatografií
- 2012 Škola hmotnostní spektrometrie a plynové chromatografie**
Třídenní škola zaměřená na hmotnostní spektrometrii s praktickým vyhodnocováním spekter. Praktická problémy v současné MS analýze – aplikace GC/MS.
- 2012 Škola hmotnostní spektrometrie**
Sedmidenní škola zaměřená od úplných základů hmotnostní spektrometrie, přes ionizační techniky a analyzátory. Spojení hmotnostní spektrometrie se separačními technikami a její využití v environmentální, farmaceutické, potravinářské a metabolické analýze. Praktické aspekty měření a vyhodnocení dat v MS.
- 2012 Kurz odběr vzorků**
Třídenní kurz zaměřený na plánování vzorkování různých typů matric, vzorkovací techniky a praktické ukázky vzorkovacích zařízení.
- 2012 Průvodce databází Emerald a publikování ve světových odborných časopisech**
Jednodenní seminář zabývající se databází Emerald a problematikou publikování ve světových odborných časopisech.
- 2012 Čisté životní prostředí jako podmínka pro produkci zdravých potravin**
Jednodenní seminář zabývající se moderními analytickými postupy pro kontrolu životního prostředí i potravin.
- 2011 Kurz organické analýzy**
Třídenní kurz zaměřený na analýzu organických látek v environmentálních matricích, praktická úskalí při analýze jednotlivých polutantů pomocí různých analytických technik.
- 2011 Převod HPLC metody na UPLC**
Jednodenní seminář zabývající se zejména praktickými radami převodu HPLC metody na UPLC.

Patenty a užité vzory

- 2015 Patent č. 305137
Biodegradabilní hydrogel s řízenou dobou života a způsob jeho přípravy.
Autoři: VOJTOVÁ, L.; MICHLOVSKÁ, L.; **OBORNÁ, J.**; JANČÁŘ, J.; VÁVROVÁ, M.
- 2014 Užité vzor č. 26561
Biodegradabilní hydrogel s řízenou dobou života
Autoři: VOJTOVÁ, L.; MICHLOVSKÁ, L.; **OBORNÁ, J.**; JANČÁŘ, J.; VÁVROVÁ, M.

Odborné publikace

Filip Jan, Skácelová Petra, Zajíček Petr, **Oborná Jana**, Petala Eleni, Zbořil Radek. *REDOX PROPERTIES OF IRON-BASED MATERIALS IN WATER TREATMENT TECHNOLOGIES: AN OVERVIEW OF LABORATORY VERSUS FIELD EXPERIENCES*. BREBBIA, C.A. a Z. BOUKALOVA. WIT Transactions on Ecology and the Environment: Water Resources Management IX [online]. 220. WIT Press, Southampton, Boston, 2017, 57 - 68 [cit. 2018-05-01]. ISBN 978-1-78466-205-9. Dostupné z: <https://www.witpress.com/elibrary/wit-transactions-on-ecology-and-the-environment/220/36254>

OBORNÁ, J.; MRAVCOVÁ, L.; MICHLOVSKÁ, L.; VOJTOVÁ, L.; VÁVROVÁ, M. *The Effect of PLGA-PEG-PLGA Modification on the Sol-gel Transition and Degradation Properties*. EXPRESS POLYM LETT, 2016, roč. 10, č. 5, s. 361-372. ISSN: 1788-618X. **[IF 2,983 (2016)]**.

OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; **OBORNÁ, J.**; MÁROVÁ, I. *Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by Cupriavidus necator*. Biotechnology Letters, 2014, roč. 36, č. 4, s. 775-781. ISSN: 0141- 5492. **[IF 1,591 (2014)]**.

JÁROVÁ, K.; VÁVROVÁ, M.; JÍROVÁ, A.; **OBORNÁ, J.** *Assessment of contamination level of aquatic ecosystem in the Svatka and the Svitava rivers (Czech Republic) by selected pharmaceuticals*. Fresenius Environmental Bulletin, 2014, roč. 23, č. 11, s. 3265-3271. ISSN: 1018- 4619. **[IF 0,378 (2014)]**.

OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; PETRIK, S.; **OBORNÁ, J.**; PŘIKRYL, R.; MÁROVÁ, I. *Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds*. PROCESS BIOCHEMISTRY, 2014, roč. 49, č. 9, s. 1409-1414. ISSN: 1359-5113. **[IF 2,516 (2014)]**.

Účast na konferencích

Přednášky

OBORNÁ, J., SKÁCELOVÁ, P., LHOTSKÝ, O., MEDŘÍK, I., KAŠLÍK, J., FILIP, J., STEJSKAL, V. *Field-Scale Performance of Non-stabilized and Surface-Stabilized nZVI Particles for CHCs – contaminated Groundwater Treatment*. In: Book of Abstracts. 14th International Conference on Sustainable Use and Management of Soil, Sediment and Water Resources. Lyon, France, 2017, s. 199.

OBORNÁ, J.; CHAMRADOVÁ, I.; TAGGART, M.; VOJTOVÁ, L.; VÁVROVÁ, M. *Acetaminophen and sulphathiazole release from biodegradable copolymers*. Book of Abstracts "16th European Meeting on Environmental Chemistry". Torino, Italy: 2015. s. 23-23. ISBN: 9788894116809.

Plakátová sdělení

OBORNÁ, J., SKÁCELOVÁ, P., LHOTSKÝ, O., STEJSKAL, V., MEDŘÍK, I., KAŠLÍK, J., FILIP, J., *Pilotní aplikace nanočástic nulamocného železa za účelem odstranění chlorovaných uhlovodíků z podzemních vod: Kompletní posouzení vlivu na životní prostředí.*: Abstrakt ve sborníku: Sanační technologie XX, Uherské Hradiště, 2017, ISBN 978-80-88238-01-0.

OBORNÁ, J., LHOTSKÝ, O., MEDŘÍK, I., CÁDROVÁ, L., STEINOVÁ, J., FILIP, J.. *Removal of Chlorinated Ethenes from Groundwater Using Iron-Based Nanomaterial: Laboratory Analysis Results and Pilot Applications*. In: Book of Abstracts: 17th European Meeting on Environmental Chemistry. Inverness, Scotland, 2016, p. 72.

JÁROVÁ, K.; VÁVROVÁ, M.; **OBORNÁ, J.** *Optimization of analytical methods for the determination of residues of selected pharmaceuticals in the aquatic environment*. 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. Brno, Czech Republic: 2014. s. 262-265. ISBN: 978-80-904959-2- 0.

OBORNÁ, J.; VÁVROVÁ, M.; CHAMRADOVÁ, I.; VOJTOVÁ, L. *Release of hydrophilic drugs and alpha- hydroxy acids from biocompatible copolymers*. Book of abstracts 14th European Meeting on Environmental Chemistry. Monte Negro: 2013.p. 136-136. ISBN: 978-9940-9059-1- 0.

MICHLOVSKÁ, L.; VOJTOVÁ, L.; **OBORNÁ, J.**; JANČÁŘ, J. *Chemical crosslinking of functionalized PLGA-PEG-PLGA copolymers and its influence on swelling behavior*. Regenerative Medicine. London: Regenerative Medicine, 2013. s. 193-193. ISSN: 1746- 0751.

OBORNÁ, J.; VÁVROVÁ, M.; MRAVCOVÁ, L.; MICHLOVSKÁ, L. *Monitoring degradation of biocompatible copolymers using high performance liquid chromatography and gel permeation chromatography.* In EMEC13 - 13th European Meeting on Environmental Chemistry. Russia: 2012. p. 106-106. ISBN: 978-5-89513-295- 1.

LACINA, P.; DVOŘÁKOVÁ, P.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; **OBORNÁ, J.**; NEVRLÁ, J.; ŠKARKOVÁ, P.; VÁVROVÁ, M. *Study of bioaccumulation of selected pharmaceuticals in terrestrial organism.* In 13th European Meeting on Environmental Chemistry. Russia: 2012. p. 101-101. ISBN: 978-5-89513-295- 1.

MICHLOVSKÁ, L.; VOJTOVÁ, L.; CHAMRADOVÁ, I.; **OBORNÁ, J.**; JANČÁŘ, J. *Effect of PLGA-PEG- PLGA Purification Method on Copolymer Chemical Structure and Gelation Behavior.* In Studentská konference Chemie je život 2012. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 381-386. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

Projektová spolupráce

Číslo projektu	Název projektu	Doba trvání
VI20162019017	Pokročilé nanotechnologie pro minimalizaci následků úniku nebezpečných chemických látek ohrožujících obyvatelstvo.	2016 – 2019
TE01020218	Ekologicky šetrné nanotechnologie a biotechnologie pro čištění vod a půd.	2012 – 2019
FCH-S-15-2869	Posouzení vstupu nových kontaminantů do složek životního prostředí.	2015
FCH-S-14-2487	Hodnocení znečištění životního prostředí metodami environmentální analýzy a ekotoxikologie.	2014
FCH/FSI-J-14-2364	Kontaminace produktů spalování a zplyňování biomasy a odpadů organickými polutanty.	2014
FCH-S-13-2087	Zatížení ekosystémů prioritními polutanty a možnosti jejich eliminace.	2013
FCH-S-12-4	Posouzení úrovně kontaminace vodního a terestrického ekosystému.	2012

Oponované vysokoškolské práce

Bakalářská práce

Název: Problematika výskytu penicilinových antibiotik ve vodách
Autor: Pavlína Landová
Rok: 2014
Instituce: Vysoké učení v Brně, Fakulta Chemická