



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Studium kinetiky uvolňování antibakteriálních látek z nanovláken

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: Nanomateriály

Autor práce: **Hlib Lyshchuk**

Vedoucí práce: Ing. Nikifor Asatiani





Zadání bakalářské práce

Studium kinetiky uvolňování antibakteriálních látek z nanovláken

Jméno a příjmení: Hlib Lyshchuk
Osobní číslo: M17000212
Studijní program: B3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály
Zadávací katedra: Katedra chemie
Akademický rok: 2019/2020

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma (inkorporace léčiv do nanovláken pro řízené uvolňování).
2. Návrh a realizace laboratorního experimentu, umožňujícího inkorporaci vybraných aktivních látek do polymerních nanovláken.
3. Vyhodnocení efektivity inkorporace a kinetiky uvolňování vybraných aktivních látek z nanovláken.
4. Závěr a zhodnocení dosažených výsledků.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
40-60 stran
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. SIEPMANN, Jurgen, Ronald Alan SIEGEL a Michael J. Rathbone. *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. New York: Controlled Release Society, c2012. Advances in delivery science and technology. ISBN 1461408814.
2. CRANK, John. *The mathematics of diffusion*. 2nd ed., 1979. Oxford: Oxford University Press, c1975. Oxford science publications. ISBN 0198534116.
3. RAMAKRISHNA, Seeram. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific, c2005. ISBN 9812564543.

Vedoucí práce:

Ing. Nikifor Asatiani
Katedra chemie

Konzultant práce:

Ing. Petr Mikeš, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání práce:

7. října 2019

Předpokládaný termín odevzdání: 18. května 2020

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

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

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

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

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem. Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

Poděkování

Chtěl bych tímto poděkovat svému vedoucímu Ing. Nikiforu Asatiani za odborné rady, připomínky a trpělivost v průběhu zpracování bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Petru Mikešovi, Ph. D. za odborné rady a konzultaci. Také chci poděkovat své rodině za podporu a víru.

Abstrakt

V dnešní době roste potřeba v personalizované medicíně pro zlepšení efektivity léčení a pohodlí pacienta. Jeden ze způsobů, jak toho dosáhnout je vývoj systému s řízenou dopravou a uvolňováním inkorporovaného léčiva v cílovém místě. Zároveň se stále hledají možnosti vyvíjení látek, které by byly schopné nahradit antibiotika. Cílem této práce je studium kinetiku uvolňování nové antibakteriální látky z nanovláken v podmínkách *in vitro*. Morfologie vrstev před a po experimentu byla analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Ke zjištění přítomnosti inkorporované látky kinetiky jeho uvolňování byla použita metoda HPLC. Přesto, že látka byla úspěšně inkorporována, předpoklad o rychlém uvolňování mechanismem prosté difuze zatím nebyl potvrzen.

Klíčová slova: kinetika uvolňování léčiv, polycaprolakton, surfaktant.

Abstract

Today, there is a growing need in personalized medicine to improve treatment effectiveness and patient comfort. One way to achieve this is to develop a system with controlled delivery and release of the incorporated drug at the target site. At the same time, there are still opportunities to develop substances that would be able to replace antibiotics. The aim of this work is to study the release kinetics of a new antibacterial substance from nanofibers in *in vitro* conditions. The morphology of the layers before and after the experiment was analyzed by scanning electron microscopy. An HPLC method was used to determine the presence and release kinetics of the incorporated substance. Although the substance has been successfully incorporated, the assumption of rapid release by a simple diffusion mechanism has not yet been confirmed.

Key words: drug release kinetics, polycaprolactone, surfactant.

Obsah

Poděkování	5
Abstrakt	6
Seznám zkratk	8
Úvod	9
1. Literární rešerše.....	10
1.1 Nanovláknna jako nosiče léčiva.....	10
1.1.1 Výhody použití nanovláken	10
1.1.2 Proces elektrostatického zvlákňování.....	11
1.1.3 Inkorporace léčiva	13
1.2 Mechanismy uvolňování léčiva.....	16
1.2.1 Difuze	16
1.2.2 Eroze a degradace.....	17
1.2.3 Osmóza	18
1.3 Interakce mezi surfaktantem a polymerem	19
1.3.1 Surfaktant	19
1.3.2 Použití surfaktantu	20
1.3.3 Interakce surfaktantu s polymerním roztokem	21
2. Praktická část.....	24
2.1 Použité materiály.....	24
2.2 Použité metody.....	25
2.3 Výsledky a diskuze	28
2.3.1 Morfologická analýza nanovláken	28
2.3.2 Výsledky uvolňování látek z nanovláknenného materiálu.....	34
2.3.3 Morfologická analýza vlákna s přídavkem antibakteriální látky po experimentu	36
2.3.4 Měření sorpce	38
2.3.5 Výsledky z měření velikosti částic	40
2.4 Závěr	42
Seznám použité literatury	43
Seznám obrázků.....	47
Seznám tabulek	49

Seznám zkratek

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. High Performance Liquid Chromatography)

PBS – fosfátový pufr (angl. phosphate-buffered saline)

PCL – polykaprolakton (angl. polycaprolactone)

CMC – kritická micelární koncentrace (angl. critical micelle concentration)

CAC – kritická asociativní koncentrace (angl. critical associative concentration)

PLA – polymléčná kyselina (angl. polylactic acid)

DLS – dynamický rozptyl světla (angl. dynamic light scattering)

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (angl. Food and Drug Administration)

ACN – acetonitril (též methylkyanid)

Antib – vybraná antibakteriální látka

Ala – alaptid

MTC – minimální toxická koncentrace (angl. minimum toxic concentration)

MEC – minimální efektivní koncentrace (angl. minimum effective concentration)

Úvod

V současné době je velká potřeba personalizované medicíny, která bude zaměřená na pohodlí pacienta a efektivnost léčení. Systémy s řízeným uvolňováním umožňují snížit frekvenci a množství dodávky léčiva bez ztráty efektivnosti. Takový systém by měl mít za úkol udržování koncentraci léčivé látky ve plazmě člověka v požadovaném rozmezí, tj. dostatečně vysoko, aby měla terapeutický účinek, ale i dostatečně nízko, aby byla netoxická. (Vediappan 2015)

Neméně důležitá je doprava léčiva do cílového místa, což by mohlo zmenšit zatížení organismu a množství léčivé látky, potřebné pro dosažení terapeutického účinku. V dnešní době velkého významu dostává použití polymerních nanovláken pro systémy s řízeným uvolňováním. Způsob jejich výroby pomocí elektrostatického zvlákňování je levný, jednoduchý a umožňuje inkorporování léčivých látek. Také polymerní vlákna mohou zajistit potřebu v ochraně léčiva do cílového místa a řízené biodegradaci na netoxické látky. (Liu et al. 2019) Existuje hodně biodegradabilních polymerů a použitím kopolymerů lze kombinovat vlastnosti, čímž lze ovlivňovat kinetiku uvolňování. (Hillery a Park 2017)

K uvolňování léčiva z biologicky rozložitelných dodávacích systémů dochází kombinací difuze léčiva, osmózy a degradace polymeru. Obvykle během uvolňovacího procesu působí více než jeden mechanismus, ale ve většině systémů s řízeným uvolňováním difuze je dominantním procesem. K difuzi látky dochází při koncentračním gradientu mezi léčivem a disolučním systémem. (Crank 1975; Siepmann et al. 2012)

Motivací této bakalářské práce je vývoj nových druhů léčiv, které by mohly efektivně působit proti grampozitivním a negativním bakteriím a způsobů jejich efektivní dopravy do těla. Je to odůvodněno tím, že bakterií čím dál tím více vyvíjí rezistenční vlastnosti oproti dnešním antibiotikům. Tato práce je zaměřená na studium kinetiky uvolňování a vlivu inkorporované látky v nanovláčenném materiálu. Jako inkorporované léčivo bylo vybrán antibakterikum, který strukturně má charakter surfaktantu. Cílem této práce je snaha o pochopení hlavních mechanismu uvolňování, zkoumání vlivu a interakci začleňené látky a polymeru, což ovlivňuje kinetiku uvolňování.

1. Literární rešerše

1.1 Nanovláknna jako nosiče léčiva

1.1.1 Výhody použití nanovláken

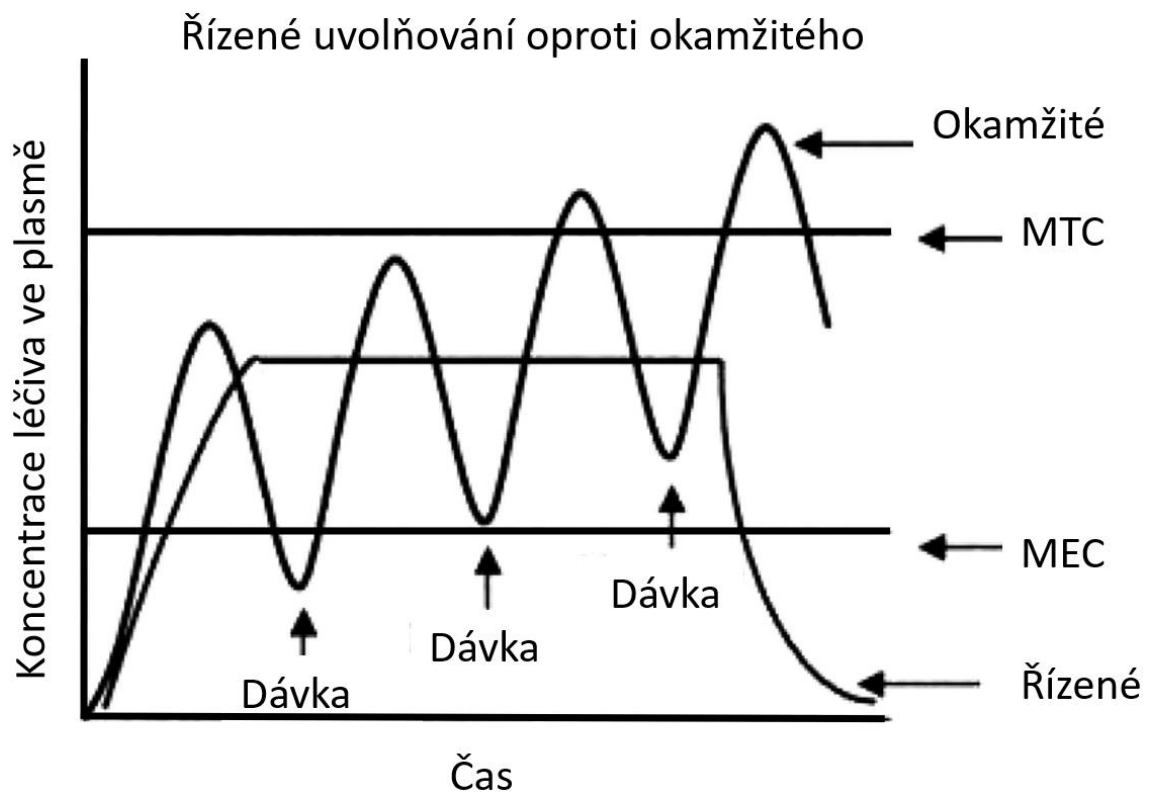
Vzhledem ke stálému vyvíjení různých typů bakterií a virů existuje potřeba k vynalezení nových typů léčiv a způsobů jejich řízené dopravy a uvolňování. Nanovláknenné materiály se osvědčily jako dobrý dopravní prostředek. Obrovský měrný povrch nanovláken může být využit pro podání léčiv ke zprostředkování rychlého kontaktu účinné látky s disolučním médiem či přímo absorpční plochou. Léčiva v této podobě mohou být inkorporována do lékových forem a jako jejich součást zlepšovat vlastnosti konkrétních formulací či přípravků. Díky takovým výhodným vlastnostem nanovláknenné membrány našly využití v různých odvětvích, například filtrační a textilní technologie, kosmetický průmysl, chemické senzory, elektronika, tkáňové inženýrství a další. (Agarwal et al. 2008) Podrobněji o medicinském použití a tkáňovém inženýrství je znázorněno níže.

V oblasti nanovláknenných materiálů pro tkáňové inženýrství jsou vyvíjeny především funkční tkáňové nosiče (tzv. scaffoldy) pro různé typy tkání, podložky pro růst tkání a povrchové úpravy stávajících lékařských protetik. Předpokládá se, že nanovláknna by měla sloužit jako náhrada poškozené tkáně, transplantace orgánů (např. bypass), podpora růstu kostních buněk a urychlení regenerace kožních tkání. (Růžičková 2016)

Největší výhodou použití nanovláknenných materiálu je možnost rychlé řízené dodávky léčiva do cílové buňky, což by umožnilo odstranit potřebu v orálním použití a jiných způsobů léčení. V následku to značně sníží dávku potřebného lékařského preparátu a zatížení organismu v celku, protože odstraní nežádoucí intoxikaci necílového místa.

Taky existuje potřeba personalizované medicíny, která by se měla zaměřit na pohodlí pacienta a rovnováhu mezi účinností léčiva a její toxicitou. Největší potřeba je ve správném modelování nosiče léčiva na řízené uvolňování, které by mělo za úkol udržování požadované úrovně léčiva v organismu člověka během celé doby šetření. Každá molekula léčiva potřebuje matrici jako nosič pro řízené, prodloužené a místně specifické dodání se zlepšenou účinností po podání pacientovi. Tradiční způsoby dopravy byly dosaženy za použití různých typů lékových forem, jako jsou tablety, krémy, masti, aerosoly, injekce a čípky. Však to všechno je zaměřeno na okamžité uvolňování léčiva s malou nebo žádnou kontrolou nad kinetikou uvolňování, což může vést k tomu, že hladina léčiva v plazmě

překračuje minimální toxickou koncentraci *MTC* vedoucí ke vedlejším účinku nebo klesne pod minimální účinnou koncentraci *MEC*, která končí nedostatkem zamýšleného terapeutického prospěchu pro pacienta. Jak je vidět z obrázku 1 okamžité uvolňování má krátký terapeutický účinek a potřebuje opakované dávky, což může vést k překročení minimální toxické koncentrace, když řízené uvolňování udržuje koncentraci léčiva ve plazmě na hodnotě efektivního terapeutického účinku po celou dobu léčení pacienta. (Vediappan 2006)

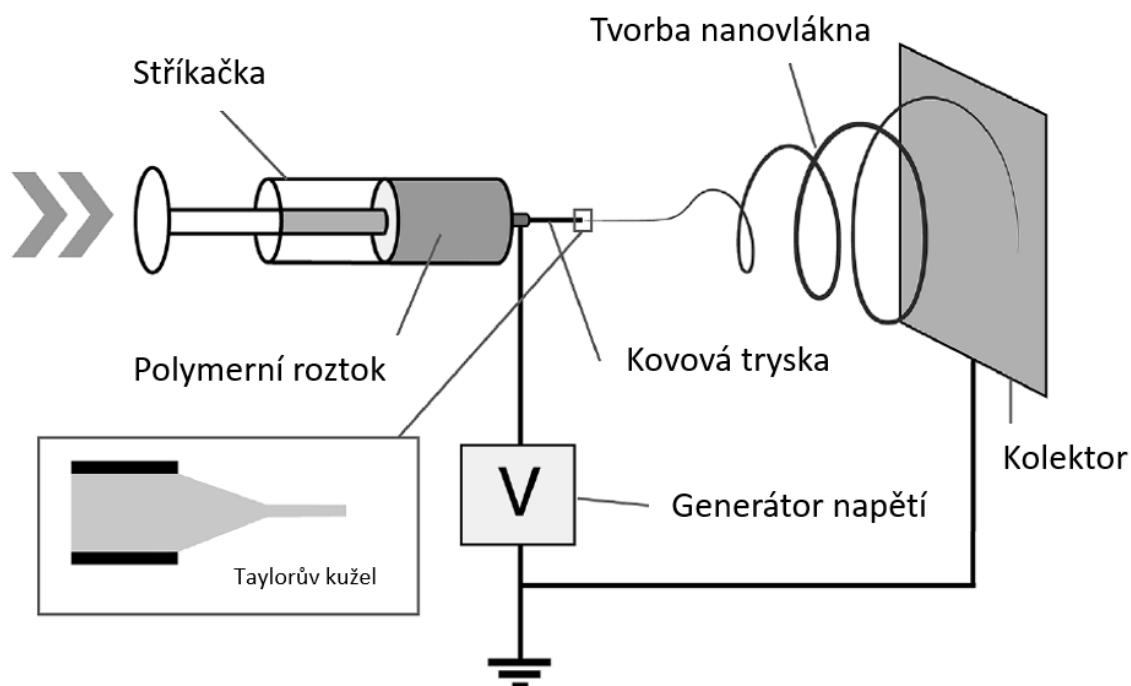


Obrázek 1 Graf závislosti koncentraci léčiva ve plasmě člověka na čase. Porovnání řízeného uvolňování s rychlým uvolňováním (Vediappan 2015)

1.1.2 Proces elektrostatického zvlákňování

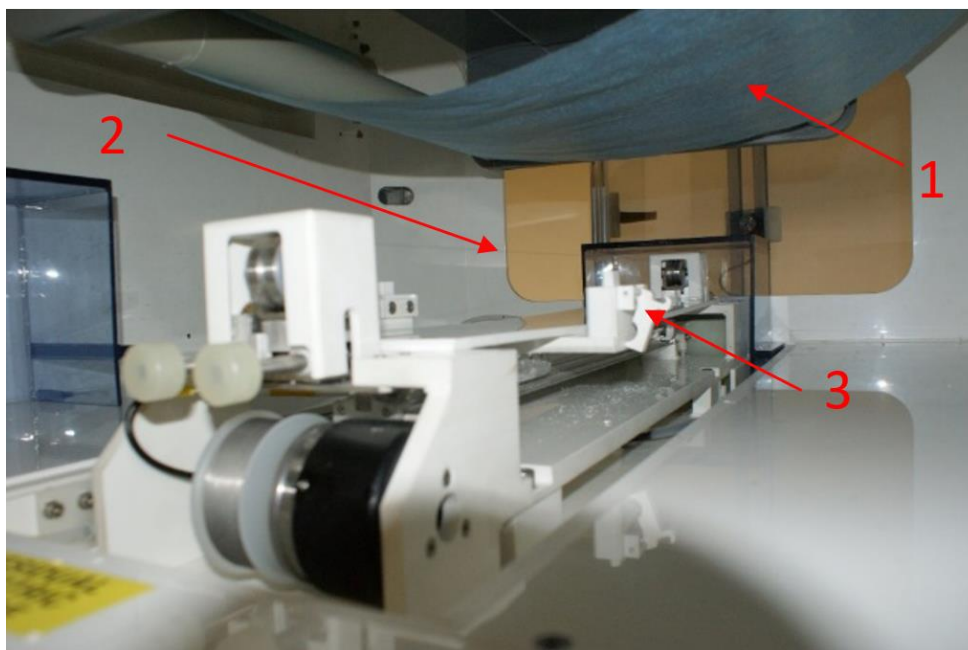
Technika elektrostatického zvlákňování je poměrně jednoduchá metoda pro tvorbu nanovláknenného materiálu. Základní konstrukce pro elektrostatické zvlákňování se skládá z elektrovedivé kapiláry, skrz kterou je čerpán roztok polymerů, zdroje vysokého napětí a uzemněného kolektoru. Zdroj vysokého napětí vytváří elektrostatické pole, které formuje elektricky nabitý proud polymerního roztoku. Polymerní roztok na hrotu kapiláry je udržován povrchovým napětím a s rostoucí intenzitou deformuje na Taylorův kužel. Jakmile síla elektrického pole bude větší, než prahová hodnota dojde k překonání povrchového napětí a jedna nebo více nabitých kapalinových trysek roztoku budou vyhozené

z kovové trubice směrem k uzemněnému kolektoru (protielektrodě). Během fáze letu kapalinové trysky ke kolektoru polymerní proud postupně napíná a dochází k vytvoření ultrajemných vláken. Rozpouštědlo se během tohoto procesu odpařuje. Na obrázku 2 je znázorněno jednoduchá konstrukce tohoto typu. (Ramakrishna 2005; Zeng et al. 2005)



Obrázek 2 Schematické znázornění procesu elektrostatického zvlákňování (Kajdič et al. 2019)

Existují taky modernější metody přípravy nanovláken. Jednou z nich je příprava nanovláken na zařízení NANOSPIDER™. Ve zvlákňovací komoře se nachází dvě struny, které jsou připojené ke zdroji vysokého napětí. Na dolní struně je umístěná projíždějící hlava, která nanáší na strunu roztok. Mezi strunami prochází podklad, na kterém bude formovat zvlákněný polymerní roztok. Pomocí válců se navíjený podklad může pohybovat s požadovanou rychlostí pro dosažení určitých charakteristik. Na obrázku 3 je znázorněna zvlákňovací komora s natáhnutým podkladem typu spunbond. Pomocí tohoto zařízení je možné připravit vlákna o požadované hmotnosti ve velkém měřítku. Pro účely mé bakalářské práce bylo použito zařízení tohoto typu.



Obrázek 3 Zvlákňovací komora přístrojů NANOSPIDER™. 1 – podklad, 2 – struna, 3 - místo umístění pohybovací hlavy s roztokem (Technická univerzita v Liberci)

1.1.3 Inkorporace léčiva

Tato kapitola stručně popisuje tři hlavní metody inkorporace léčiva do polymerní nanovláknenné matrice. Existují také jiné technologie, jako např. úpravy povrchu a různé možnosti elektrosprejingu, ale v této práci nebudou uvedeny. Každý z níže uvedených příkladů má své výhody a nevýhody a může být použit pro konkrétní účely. Rovněž je třeba mít na paměti, že materiály používané pro systém dodávání léčiv musí odpovídat řadě požadavků jako např. biokompatibilita, biologicky degradovatelnost a také kompatibilita s inkorporovaným léčivem.

Použití polymerní směsi s léčivem pro elektrostatické zvlákňování

Metoda použití polymerní směsi s léčivem pro elektrostatické zvlákňování je jednou z nejjednodušších a stejným způsobem byly léky inkorporované pro praktickou část mé bakalářské práce. Podstatou této metody je rozpouštění nebo dispergování léčiva v roztoku polymeru před procesem elektrostatického zvlákňování. Je to schematicky znázorněno na obrázku 4 A. Rychlé uvolňování léčiva může být vyvoláno nedostatečnou rozpustností léčiva v polymerním roztoku, kde molekuly léčiva mohou během procesu elektrostatického zvlákňování migrovat na vlákna poblíž povrchu, což může způsobit tzv. „burst effect“, který bude popsán v následující kapitole. (Cornejo Bravo et al. 2016) Takovým způsobem lze připravit systém dodávky léčiva typu monolit. To znamená, že látka je inkorporovaná přímo v polymerní matrici, která chrání léčivo a funguje jako

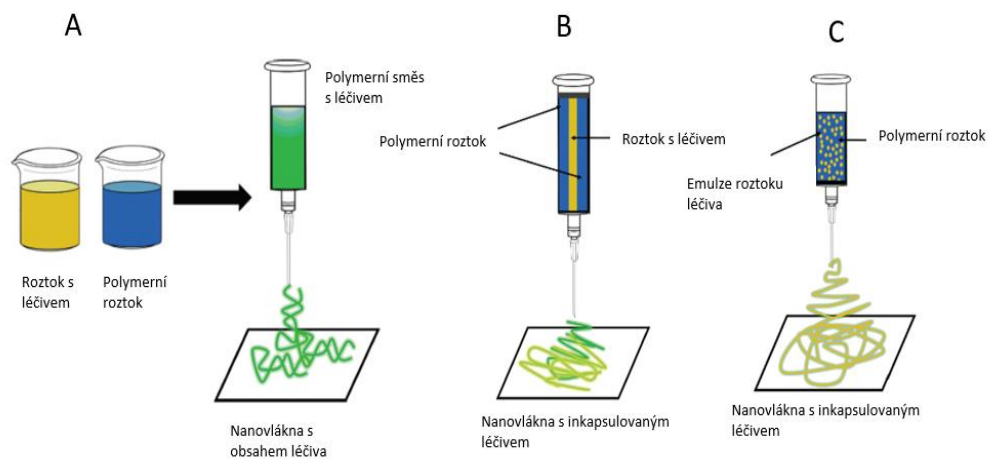
zprostředkovatel difuze. Lék je obvykle inkorporován rovnoměrně do polymerní matrici a uvolňování je řízeno difuzí skrz materiál matrice monolitu nebo přes póry. Taký systém typu monolit je typické explozivní uvolňování neboli „burst effect“. (Siepmann et al. 2012)

Koaxiální elektrostatické zvlákňování

Hlavním účelem koaxiálního elektrostatického zvlákňování je získávání vláken se strukturou jádro-obal (angl. core-shell structure). Tato technika může být použita pro získávání vláken s inkorporovaným léčivem v jádře vláken, což vede k prodlouženému a řízenému uvolňování léčiva. Jednou z hlavních výhod této techniky je, že struktura jádro-obal poskytuje ochranu inkorporované sloučenině a biologická aktivita léčiva zůstává neporušená. Díky tomu, že začleněná látka nachází uvnitř trysky polymerního roztoku, má ochranu ve formě polymeru. Schematicky je znázorněno na obrázku 4 B. (Lu et al. 2016) V takovém případě je vytvořen systém typu reservoár.

Použití emulze pro elektrostatické zvlákňování

Emulzní elektrostatické zvlákňování je flexibilní a potenciální metoda pro inkorporace několika léků do nanovláken a je jednou z nejdůležitějších metod pro výrobu nanovláken se strukturou léčiva jádro-obal. V tomto způsobu je možné měnit rychlost uvolňování léčiva regulováním lipofilní fáze a vodní fáze. Lipofilní fáze je tvořená emulzí léčiva. Výhodou emulzního elektrostatického zvlákňování oproti použití polymerní směsi pro elektrostatické zvlákňování je odstranění potřeby ve společném rozpouštědle, protože léčivo a polymer se samostatně rozpustí ve vhodném rozpouštědle. Schematicky je znázorněno na obrázku 4 C. (Cornejo Bravo et al. 2016)



Obrázek 4 Schematické znázornění základních způsoby inkorporování léčiva do nanovláken
 A) Použití polymerní směsi s léčivem
 B) Koaxiální elektrostatické zvláknění
 C) Použití emulze
 (Cornejo Bravo et al. 2016)

1.2 Mechanismy uvolňování léčiva

Systémy s řízeným uvolňováním jsou potřebné k dosažení rovnováhy mezi rychlostí dodávání, toxicitou pro organismus a pohodlím pacienta. Tato oblast se neustále vyvíjí, protože je nutnost v personalizované pod konkrétní účely řízené dodávky léčiva. Při vývoji takových systémů s řízeným uvolňováním je nutné identifikovat a pochopit mechanismy, které se na uvolňování podílejí. Takovým způsobem lze předpovědět kinetiku uvolňování a navrhnout matematický model, který správně její popíše. Často se může jednat o několik mechanismů, které dominují na různých stádiích podávání léku. Taky pro hydrofilní polymer je častým mechanismem bobtnání. V rámci této bakalářské práce byl použit PCL, který je velice hydrofobním polymerem a skoro vůbec nebobtná, proto tento typ uvolňování nebude uveden. (Siepmann et al. 2012)

1.2.1 Difuze

K uvolňování léčiva z biologicky rozložitelných dodávacích systémů dochází kombinací difúze léčiva, osmózy a degradace polymeru. Difúze je proces, kterým je částice transportována z jedné části systému do druhé v důsledku náhodných molekulárních pohybů. Taky je nutno zaznamenat, že k difúzi látky dochází při koncentračním gradientu například mezi léčivem a disolučním systémem. (Crank 1975)

Dominantním mechanismem uvolňování je zpravidla považovaná difúze inkorporované sloučeniny v pevném stavu z vláken do okolního např. vodního média. S tímto předpokladem se očekává 100% uvolnění léčiva po určitou (dlouhou) dobu. (Srikanth et al. 2008) Jestli se léčivo uvolnilo rychleji, než polymerní matrice začala degradovat lze zanedbat účinky eroze a mluvit o difúzi jako o dominantním mechanismu. V případě polykaprolakton čas degradaci pohybuje kolem 2 let. (Sun et al. 2006)

Obecně difúze pro monolitní systém neboli systém s inkorporovanou látkou do polymerního roztoku začíná z rychlého uvolňování látky do disolučního média díky koncentračnímu gradientu. S postupem času klesá rychlost uvolňování, protože léčivo, které je uvnitř monolitu, se musí difundovat na povrch. (Siepmann et al. 2012)

Ovšem v praxi úplné uvolňování není vždy možné, a to ani po dlouhou dobu. Závisí to na mnoha faktorech, přičemž hlavním je umístění léčiva v polymerní matrici. Je důležité si uvědomit, že velká plocha měrného povrchu, která je typická s nanovláčnými membrány poskytuje rychlé a účinné odpařování rozpouštědla během procesu elektrostatického zvláknování, což vede k omezení doby pro rekrystalizaci inkorporovaného léčiva.

Toto přispívá k tvorbě amorfních disperzí nebo pevných roztoků. (Verreck et al. 2003) Lék tedy může být, jak inkorporován uvnitř polymerní matrice, tak i zůstat v amorfním stavu na povrchu nanovlákněné membrány.

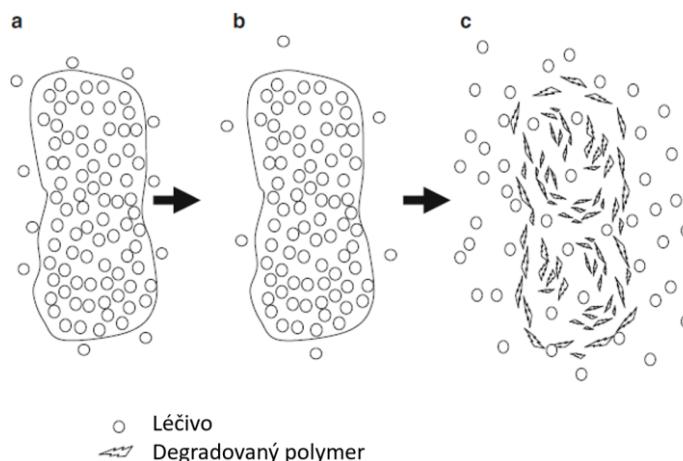
S tím je spojen jev zvaný explozivní uvolňování (angl. burst effect), který znamená rychlé uvolňování léčiva v prvních hodinách. Kenawy a kolektiv (2002) zkoumali uvolňování 5% tetracyklin hydrochloridu z poly(ethylen-vinylacetátu), polymléčné kyseliny a jejich směsí. Počáteční rychlost uvolňování všech formulací byla vysoká během prvních 10 až 12 hodin v důsledku explozivního uvolňování léčiva z povrchu vzorku.

Zeng a kol. (2005) studovali explozivní uvolňování inkorporovaného lipofilního léku paklitaxelu a hydrofilního léku doxorubicin hydrochloridu v polymléčné kyselině (PLA). Malé krystaly doxorubicin hydrochloridu byly detekovány na povrchu vlákna pomocí SEM snímků, což může být způsobeno špatnou rozpustností a kompatibilitou doxorubicin hydrochloridu v roztoku PLA / chloroform / aceton. Při elektrostatickém zvlákňování byla použita nejemná disperze a při rychlém odpařování rozpouštědla se významná část léčiva dostala na povrch vláken.

1.2.2 Eroze a degradace

K rychlému uvolňování léčiva dochází pouze na povrchu vláken a přes póry spojené s povrchem. Léčivo, které je inkorporované uvnitř polymerního materiálu, a to jak v struktuře jádro-obal, tak i v polymerní směsi nemůže být samovolně uvolněno i po dlouhou dobu. V takovém případě k uvolňování dojde při erozi polymerního materiálu. To naznačuje, že difuze v takovém případě není dominantním mechanismem dochází k desorpce inkorporované látky přes nanopóry v polymerní matrici. Do nanopór vstupuje disoluční medium a teprve dochází k difuzi. (Srikar et al. 2008)

K erozi polymerních monolitů dochází, když složky uvolňovacího média, zejména vody, napadají kovalentní vazby v polymerní matrici. K hromadné erozi, znázorněné na obr. 5, dochází, když voda napadne polymer rychleji, než může dojít k hydrolýze. V tomto případě voda prokazuje svou přítomnost v matrici a procesy štěpení řetězců jsou zahájeny všude. (Siepmann et al. 2012) V systému rezervoár to vede k uvolňování léčiva mechanismem osmóze a difuze.

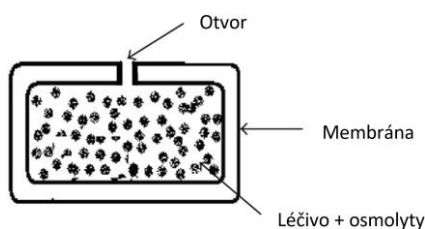


Obrázek 5 Schematické znázornění třech fází uvolňování léčiva z objemově erodujících polymerů. První stupeň (a) odpovídá léčivu, které je uvolňováno z povrchu zařízení nebo z pórů, které jsou k povrchu připojeny. Následuje druhé latentní stadium, během kterého dochází k malé degradaci polymeru a zbývající léčivo je zachyceno (b). Ve třetím stupni se zachycené léčivo rychle uvolňuje, když se polymer autokatalyticky rozpadá (c) (Siepmann et al. 2012)

1.2.3 Osmóza

Osmóza může být definována jako čistý pohyb vody přes selektivně propustnou membránu řízenou rozdílem osmotického tlaku. Voda protéká membránou ve snaze vyrovnat koncentrace nepropustných osmolytů na obou stranách membrány. Ve většině případů dochází k difúzi vody přes membránu. Nejprve je třeba zdůraznit, že na obou stranách membrány je spousta vody a tok vody skrz něj je určen rozdílem chemických potenciálů vody na obou stranách, nikoliv pouze koncentračním gradientem vody. Je to způsobeno rozdílem koncentrací rozpouštěných látek přes membránu, která umožňuje průchod vody, ale odmítá většinu rozpuštěných molekul nebo iontů. Osmotický tlak vytvářený osmolyty se používá jako hnací síla pro tyto systémy k řízenému uvolňování léčiva. (Keraliya et al. 2012; Siepmann et al. 2012)

V systému typu rezervoár může dojít k uvolňování mechanismem osmózy při vytvoření mezery v membráně obklopující léčivo. Osmóza umožňuje kinetiku nultého řádu, tj. z konstantní rychlosti uvolňování, což lze použít pro řízené uvolňování léčiva. Příklad takového systému je znázorněn na obr. 6.



Obrázek 6 Příklad systému s uvolňovacím mechanismem typu osmóza (Keraliya et al. 2012)

1.3 Interakce mezi surfaktantem a polymerem

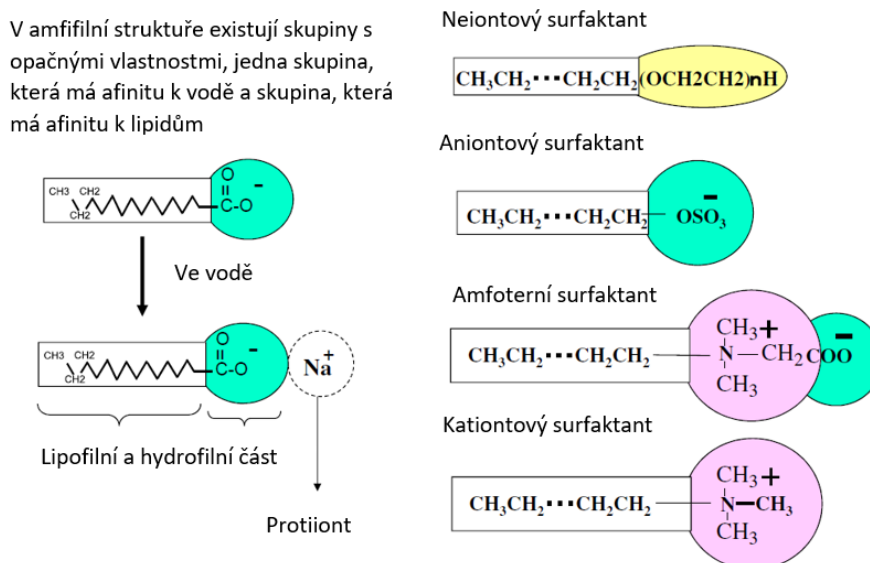
Vzhledem k tomu, že v této bakalářské práci bylo vybráno léčivo se strukturou povrchově aktivní látky neboli surfaktantu, je nutné podrobněji zvážit, co to je povrchově aktivní látka a jeho interakce s polymerem. V této kapitole bude popsána struktura a vlastnosti surfaktantů a jejich vliv na nanovláknennou polymerní matici a interakce s ní.

1.3.1 Surfaktant

Povrchově aktivní látky neboli surfaktanty se nazývají látky, které jsou schopny měnit povrchové napětí roztoku, díky čemuž dostaly svůj název (z angl. surfactant = surface-active agent). Také při dostatečné koncentraci v roztoku vytvářejí samostatně sestavené molekulární klastry zvané micely a adsorbují se na rozhraní mezi roztokem a jinou fází. Takové fyzické vlastnosti jsou zajištěny pomocí hydrofobní a hydrofilní funkční skupiny. Obvykle hydrofobní část je představena dlouhým nepolárním alkylovým řetězcem a hydrofilní funkční skupina má rozhodující vliv při charakterizaci surfaktantu. Celkem existují 4 skupiny povrchově aktivních látek, které jsou závislé na typu náboje přítomného v polární části:

1. **Aniontová** – surfaktant nese záporný náboj. Například $R-COO^- Na^+$ (mýdlo)
2. **Kationtová** – surfaktant nese kladný náboj. Například $R-NH_3^+ Cl^-$
3. **Zwitteriontová** (neboli amfoterní) - surfaktant nese jak záporný, tak kladný náboj
4. **Neiontová** – surfaktant nenese žádný náboj.

(Nakama 2017; Rosen a Kunjappu 2012) Na obrázku níže je schematicky znázorněna struktura a klasifikace surfaktantů.



Obrázek 7 Struktura a klasifikace surfaktantu (Nakama 2017)

Jednou z důležitých vlastností surfaktantů je jejich lipofilní charakter, který umožňuje tvorbu klastru zvaných micely. Díky takovému složení molekuly surfaktantu se orientují ve vodním prostředí takovým způsobem, aby se hydrofilní část směřovala ven z micely, kde interaguje s rozpouštědlem (vodou). Hydrofobní konec směřuje uvnitř micely, kde interaguje mezi sebou pomocí vodíkových můstků.

Jednou z důležitých charakteristik surfaktantu je tzv. kritická micelární koncentrace (CMC). Tato hodnota odpovídá koncentraci surfaktantu v roztoku, při které dochází ke tvorbě micel. Když se povrchově aktivní látky přidají do vodního prostředí, dojde k odpuzování atomů vody, což způsobí pokles entropie molekul vody. Při nárůstu koncentrace surfaktantu začne docházet ke sdružení hydrofobních skupin, až ne dojde k uvolňování vody a tím zvýšení entropie. V tu chvíli tato energie způsobí/podpoří tvorbu micel. (Nakama 2017, Rosen a Kunjappu 2012)

1.3.2 Použití surfaktantu

Díky svým vlastnostem surfaktant má hodně použití v různých odvětvích. Dříve se povrchově aktivní látky používaly hlavně pro efektivní odstranění špíny jako mýdlo. V dnešní době však se našlo více použití, například v kosmetice, jako solubilizační činidla, emulgátory, antimykotická činidla. (Nakama 2017) Také surfaktanty se mohou přidávat pro zlepšení vlastností polymerního roztoku při elektrostatickém zvláknění, což bude popsáno v následujícím odstavci.

Elektrostaticky zvlákněné nanovlákněné vrstvy zpravidla mají defekty způsobené různými faktory. Jeden z takových faktorů je tvorba „perliček“ neboli kapek na povrchu výsledné vrstvy. Lze to zmenšit přidáním surfaktantu nebo dalších iontových aditiv. Iontový surfaktant při rozpouštění v polymerním roztoku před zvlákněním zvýší elektrovodivost roztoku a zmenší povrchové napětí roztoku. (Abutaleb et al. 2017) To způsobí lepší „odezvu“ polymerního roztoku a zmenší relaxační čas tvorby Taylerového kuželu. Taky to umožní pracovat s nižším napětím, což ve výsledku bude znamenat větší variabilitu procesu, který můžeme měnit podle požadavku. Ve svých článcích Hu et al. (2015); Abutaleb et al. (2017) opublikovali výsledky vlivu surfaktantu na morfologii vláken a proces jejich tvorby při elektrostatickém zvláknění. Každý z nich použil jiný surfaktant a jinou polymerní matici, ale výsledky měli celkem podobné. Vlákna s přísadkou surfaktantu měly menší počet defektů (angl. defect ratio) a vlákna měly užší rozptyl distribuci průměrů. Možnost zvláknění při menších napětích umožňuje tvorbu jemnějších vláken.

1.3.3 Interakce surfaktantu s polymerním roztokem

Interakce mezi polymerem a surfaktantem nemá dosud komplexní analýzy. Existuje několik studií na tématu vlivu surfaktantu při procesu elektrostatického zvlákňování a jeho vlivu na roztok polymerů. Nejvýznamnější vlastnost surfaktantu, jak už bylo zmíněno je tvorba micel při dosažení kritické koncentraci micel v roztoku. Při tom jevu dochází k hydrofobním interakcím mezi shodnými částmi surfaktantu a polymeru, což je obvykle dlouhý nepolární alkylový řetězec u surfaktantu a podobná část u polymeru.

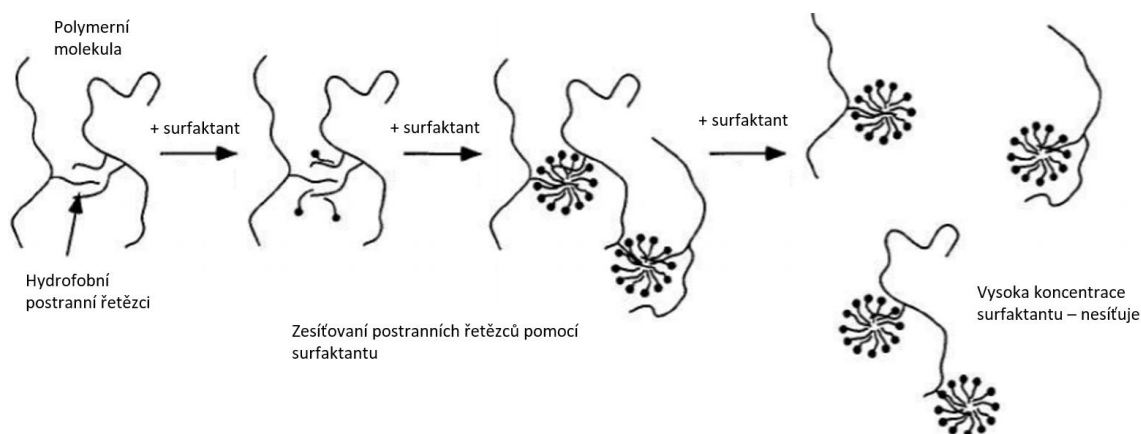
Taky může docházet k elektrostatickým interakcím v případě použití iontového surfaktantu. V takovém případě dojde ke zvyšování vodivosti roztoku a tím lepší odezvu při procesu elektrostatického zvlákňování. K asociace mezi surfaktantem a polymerem dojde při určité koncentrace surfaktantu v roztoku *CAC* (angl. critical associative concentration). Asociace je nejlépe považována za micelizaci indukovanou polymerem. V polymerním roztoku, micely se tvoří při nižší koncentraci surfaktantu než ve vodě. U iontových povrchově aktivních látek je tvorba micel silně ovlivněna nepříznivými elektrostatickými interakcemi, které vedou k hodnotám *CMC*, které jsou řádově vyšší než hodnoty *CAC*. Neiontové surfaktanty vykazují slabé interakce s většinou homopolymerů. (Hansson a Lindman 1996)

Při interakci polymeru a surfaktantu při překročení určité koncentraci surfaktantu v roztoku dojde k vytvoření modelu „náhrdelníku“, kde micely jsou kuličky a polymer je řetězec (obrázek 8). Segmenty polymeru se vážou k povrchové oblasti micel surfaktantu, takže jádro micely je chráněno před okolní vodou. Stabilizace rozhraní mezi hydrofobním jádrem a vodou je považována za hlavní hnací sílu pro interakci mezi polymerem a surfaktantem. Taky při interakcích více iontů surfaktantu s nenabitými segmenty polymeru dochází k odpuzování části polymerního řetězce mezi sebou působením elektrostatických interakcí. Schematický je zobrazeno na obr. 8. Tím se polymerní řetězec prodlužuje a zvyšuje se viskozita roztoku. (Khan et al. 2008)



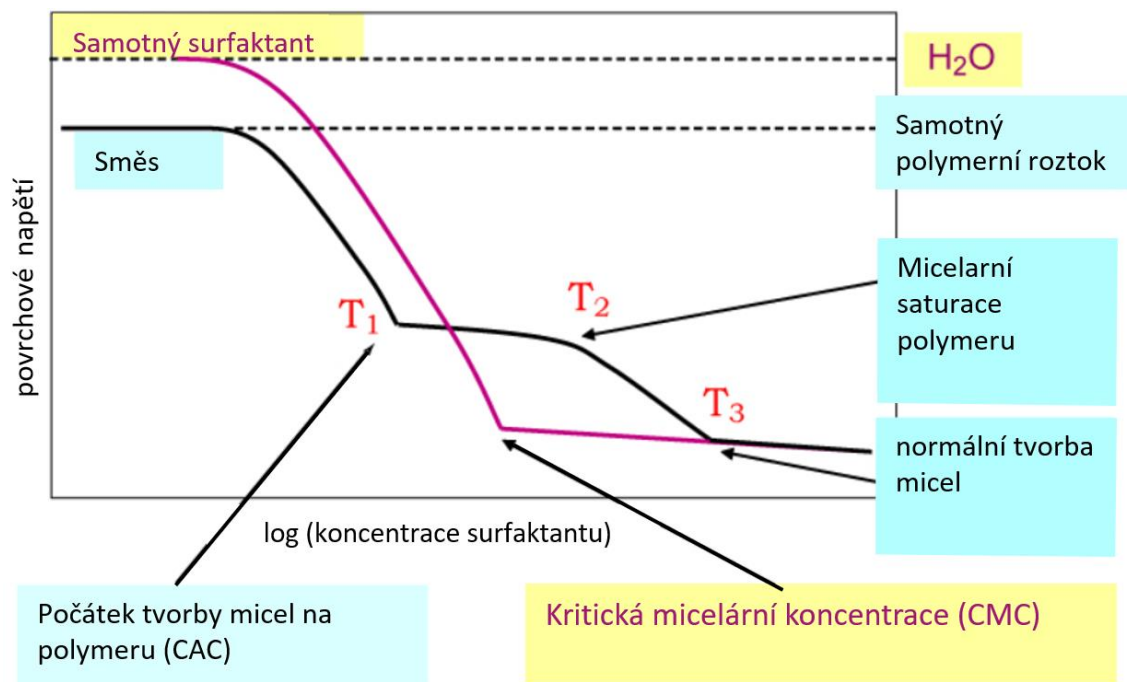
Obrázek 8 Vlevo je model náhrdelníku (Khan et al. 2008)
vpravo je zobrazeno působení iontových částí surfaktantu na polymerní řetězec (Abuin 1984)

Na obrázku níže je po krocích znázorněno interakci polymeru z surfaktantem. Je vidět, že při nízké koncentraci dochází k spojování polymerních vláken, ale při vysoké koncentraci surfaktantu v roztoku vytvářejí se samostatné micely na bočních řetězcích polymeru.



Obrázek 9 Interakce surfaktantu s postranními řetězci polymeru (Odeh 2006)

Také pro polymer-surfaktant interakce je nutno zmínit vliv koncentraci na povrchové napětí. Na obrázku 10 je znázorněno závislost koncentraci surfaktantu v polymeru a ve vodě na povrchovém napětí. Je vidět, že povrchové napětí klesá při zvyšování množství surfaktantu. U roztoku s polymerem dochází ke tvorbě micel při hodnotě CAC , která je nižší než CMC , což říká o tom, že interakce s polymerem podporují tvorbu micel. Ačkoliv interakce mezi surfaktantem a polymerem je stále ve stadii vyvíjení můžeme říct, že interaguje, jak pomoci hydrofobních interakci, tak i elektrostatických. V závislosti na surfaktantu a polymeru může být jiná dominantní síla.



Obrázek 10 Povrchové napětí slabě interagující směsi polymer / povrchově aktivní látka. Je také znázorněno povrchové napětí samotné povrchově aktivní látky. (Taylor et al. 2007)

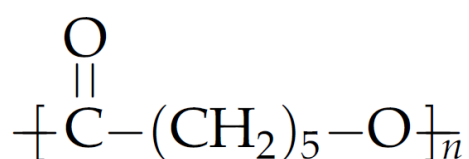
Ačkoliv interakce mezi surfaktantem a polymerem se intenzivně zkoumá, lze říct že převládají zejména hydrofobní interakce a elektrostatické. V závislosti na konkrétním surfaktantu a polymeru může se dominantní interakce lišit.

2. Praktická část

2.1 Použité materiály

Polykaprolakton

Poly- ϵ -kaprolakton (PCL) je lineární hydrofobní alifatický semikrystalický polymer syntetizovaný polymerací za otevření kruhu ϵ -kaprolaktonu. PCL byl vybrán díky jeho biodegradabilitě, dobré rozpustnosti v organických rozpouštědlech a jeho poměrně nízké ceně. (Sadasivuni 2017) Navíc, PCL je schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA a široce používán v oblasti tkáňového inženýrství a dodávání léčiv. (Hu et al. 2015)



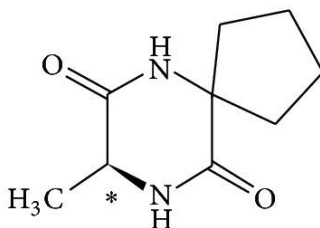
Obrázek 11 Chemický vzorec PCL, kde n je počet kaprolaktonových jednotek (Mark 2009)

Vybraná antibakteriální látka

Jako modelová antibakteriální látka pro tuto bakalářskou práci byla vybraná nová moduluární molekula s dlouhým hydrofobním řetězcem, která má strukturu podobnou surfaktantu (viz 1.3.1). Tato látka byla vyvinuta na Ústavu organické chemie a biochemie a může působit jako účinná látka proti gram-pozitivním a negativním bakteriím. V tabulkách a grafech je dále značen jako Antib.

Alaptid

Chemický název je (*S*)-8-Methyl-6,9-diazaspiro[4.5]decan-7,10-dione je známý pod obchodním názvem „Alaptid“. Alaptid byl vyvinut v 1980 letech a prokazuje velký potenciál použití pro urychlení léčby a regenerace poranění kůže. (Opatrilova et al. 2013) V rámci této bakalářské práce Alaptid byl vybrán jako druhá látka pro porovnání kinetiky uvolňování. V tabulkách a grafech je dále značen jako Ala.



Obrázek 12 Struktura (*S*)-Alaptidu (Rádl et al. 1990)

2.2 Použité metody

Příprava PCL nanovláken

Poly- ϵ -kaprolakton ($M_w = 43\ 000$) byl rozpuštěn ve směsi chloroform/ethanol (9:1 hm) s koncentrací polymeru v roztoku 16 hm %. Roztok byl dobře promíchán a poté elektrostaticky zvlákněn pomocí zařízení NANOSPIDERTM pro vytvoření kontrolní vrstvy bez přídavku účinné látky. Stejný postup byl použit pro vytvoření nanovláken s přídavkem alaptidu a vybrané antibakteriální látky. Konkrétně pro alaptid 1 % hm a 2,5 % hm a pro antibakterikum 2 % hm, 5 % hm a 10 % hm. V podstatě byla použita metoda inkorporace léčiva, která je podrobněji popsána v odstavci 1.1.3.

Morfologie vláken

Pro zkoumání morfologie nanovláken, z vyrobených nanovláčkových vrstev byly vystřiženy malé vzorky (cca 5 mm x 5 mm) a naneseny na kovový terčík. Následně byla nanesená vrstva zlata o tloušťce 14 nm a vzorky byly analyzovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu TESCAN Vega 3SB. Průměry vláken byly stanoveny pomocí počítačového programu ImageJ a statisticky zpracované jako průměrné hodnoty z buď 100x nebo 200x měření na různých místech pro každý druh zvlákněného materiálu. Analyzovány byly obě strany nanovláčkových materiálů (tj. líc a rub). Také byla provedena analýza nanovláken s inkorporovanou antibakteriální látkou na konci experimentu (tj. 174. den).

In vitro test uvolňování účinné látky

Disoluční (rozpuštěcí) studie jsou jednou z hlavních charakteristik lékových forem s řízeným uvolňováním léčiva. Stanovuje se jimi uvolňování léčivé látky z lékové formy v předepsané kapalině (disoluční médium, disoluční roztok) a v předepsaném čase. Přestože se používají zejména k hodnocení kvality léčivých přípravků, odhaduje se na základě jejich výsledků také biologická dostupnost léčivé látky *in vitro* a bioekvivalence generických léků, tj. používají se ke stanovení shody s danými požadavky na disoluci, která se hodnotí na základě faktorů podobnosti a rozdílnosti. (Jirásková 2015)

Pro zkoumání uvolňování účinné látky v podmínkách *in vitro* byly z nanovláčkových vrstev každého materiálu vyříznuty 3x malé nanovláčkové vzorky o průměrné hmotnosti (50 ± 1) mg. Následně byly vzorky umístěny do plastových zkumavek s pufracním roztokem PBS (fosfátový pufracní fyziologický roztok pH = 7,4). Pro vzorky s alaptidem

množství PBS bylo 20 ml a pro antibakterikum 5 ml. Poté byly všechny vzorky inkubovány v CO₂ inkubátoru při 37 ° C. V předem stanovených časových intervalech (15 min, 0,5 h, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 den, 14 den, a dále jednou za 2 týdny. Poslední den experimentu je 174 den) bylo odebráno 1 ml roztoku a nahrazeno čerstvým roztokem PBS pro zachování tzv. „sink“ podmínek (z anglického slova sink = výlevka). Tyto „sink“ podmínky zohledňují nulovou nebo nízkou koncentraci léčivé látky v disolučním médiu v průběhu experimentu tak, aby nedocházelo ke změně koncentračního gradientu a ovlivnění procesu disoluce. (Jirásková 2015)

Odebrané vzorky po celou dobu experimenty byly chráněny v lednici. Po 7 dnech experimentu tyto vzorky byly připravené na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) pro zjištění kumulativního množství uvolněné inkorporované látky. Množství uvolněné látky bylo vypočítáno podle vzorce:

$$M_t = c_t \cdot V_{zk} + V_{odb} \sum_{c_i=1}^{c_{t-1}} c_i$$

Kde M_t [mg/l] – množství uvolněné látky v čase t , c_t [mg/l] – koncentrace látky v odebraném vzorku v čase t , V_{zk} – objem uvolňovacího media (20 a 5 ml pro alaptid a antibakteriální látky), V_{odb} – objem odebraného vzorku (1 ml). Výsledky byly statisticky zpracovány a vyneseny do grafu v závislosti na čase.

Příprava pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC)

Uvolňování látek z nanovlákných PCL vrstev bylo kvantifikováno pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. Při analýze výluhů z nanovlákných materiálů byly vzorky nejprve naředěny 90 % acetonitrilem (ACN) v poměru 1:10 (150 µl vzorku, 1500 µl ACN). Pro odstranění možných nečistot promíchaný vzorek byl přefiltrován přes nylonový stříkačkový filtr o průměru 13 mm s velikostí pórů 0,22 µm do 2 ml vialky. Vialka byla poté umístěna do měřicí komory přístroje.

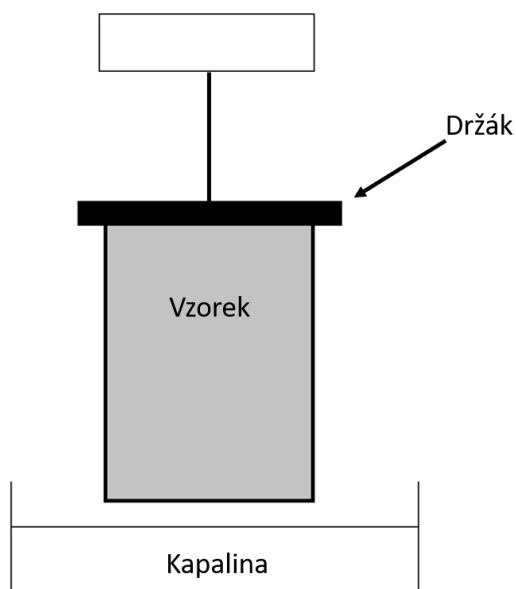
Měření velikosti částic

Pro zjištění velikosti částic antibakteriální látky byla použita metoda dynamického rozptylu světla (DLS) na zařízení Zetasizer Nano ZS. Je to technika, kterou lze použít ke stanovení profilu distribuce velikosti malých částic v suspenzi nebo polymerů v roztoku. (Berne a Pecora 2000). Vzorek čistého prášku antibakteriální látky byl dispergován

v methanolu (alaptid byl dispergován ve vodě) a změřen třikrát. Výsledky byly zaneseny do grafu.

Měření sorpce vody nanovlákněným materiálem s přidavkem antibakteriální látky

Měření sorpce inkorporované antibakteriální látky v polymerní matrice bylo prováděno metodou dynamiky vztlínání kapalin pomocí Mikrotensiometru Krüss K121. Z každého druhu polymerního materiálu o různé koncentrace inkorporovaného léčiva bylo vystříženo několik vzorků o rozměrech $30 \times 30 \text{ mm}$. Pak vzorek byl vložen do držáku a umístěn nad nádobkou s vodou v prostoru zařízení. Pomocí počítačového softwaru bylo změřeno rychlost nárůstu hmotnosti sorbované kapaliny do nanovlákněného materiálu v závislosti na času. Data byla statisticky zpracována a zanesena do grafu.



Obrázek 13 Schematické znázornění metody sorpce nanovlákněného materiálu

2.3 Výsledky a diskuze

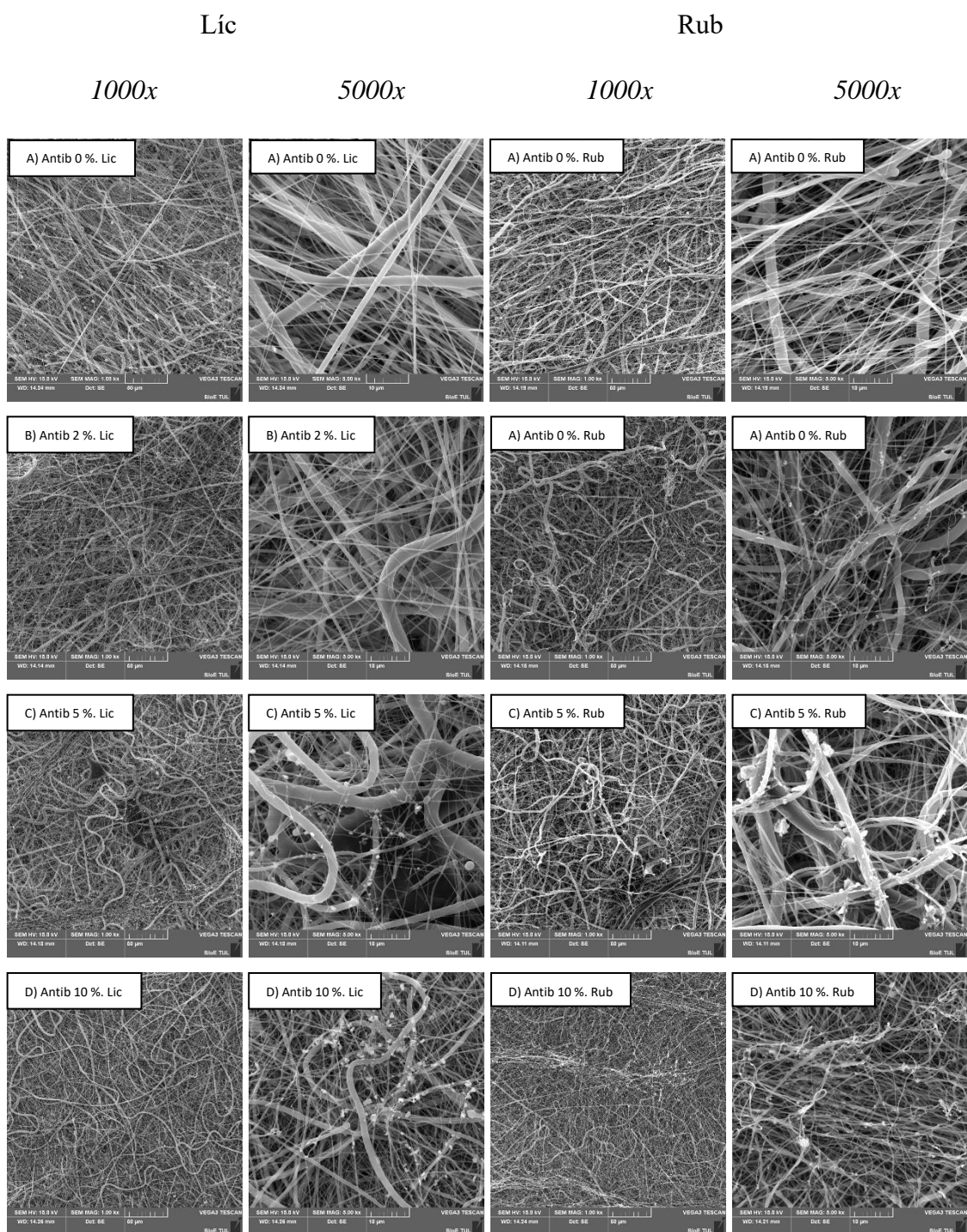
2.3.1 Morfologická analýza nanovláken

Analýza PCL vlákna s přidavkem antibakteriální látky

Na snímkách z SEM (obr. 13) není vidět, že se morfologie vláken výrazně změnila s přidavkem antibakteriální látky. Nicméně statistické zpracování naměřených průměru ukázalo statistické rozdíly mezi materiály (obr. 14). Navíc, se zvyšující se koncentrací přidané antibakteriální látky se na nanovlákných vrstvách vyskytovaly částice. Lze předpokládat, že to může být inkorporovaná antibakteriální látka, která je navázaná na polymerní matici.

Také bylo pozorováno zlepšení kvality vláken. Pro čisté PCL je typické velké množství nehomogenity a různých defektů, což může být také způsobeno nedostatečnou roztažností vláken při procesu elektrostatického zvlákňování. S přidavkem surfaktantu defekty se částečně zmizely, pravděpodobně v důsledku snížení povrchového napětí a tím stabilizaci procesu. (Abutaleb et al. 2017) Také je nutno zmínit rozdíl mezi lícovou a rubovou strany, což bylo nejvíce patrné u čistého PCL. Počet defektů i mikronových vláken byl značně vyšší, ale po přidání surfaktantu i na rubové části bylo pozorováno zmenšení počtu defektu a jejich průměru.

Při porovnání lícové a rubové části bylo pozorováno objev částic na obou stranách, ale u rubové části na rozdíl od lícové už i při koncentraci 2 % hm přidavku antibakteriální látky. Také je vidět, že počet částic na povrchu vláken je větší než u lícové strany. Můžeme udělat předpoklad, že toto je spojeno s dobrou rozpustností antibakteriální látky polymerním roztoku a při procesu elektrostatického zvlákňování látka byla inkorporovaná ve větší části uvnitř polymerní matrici. Snímky s porovnáním lícové a rubové části při různém zvětšení je znázorněno níže.



Obrázek 14 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu - 4 snímky v řádce s různým zvětšením pro každý vzorek (první dva v řadě pro líc stranu a poslední dva pro rub stranu): a) čistě PCL vlákna; b) PCL vlákna s přidávkem 2 hm. % antibakteriální látky; c) PCL vlákna s přidávkem 5 hm. % antibakteriální látky; d) PCL vlákna s přidávkem 10 hm. % antibakteriální látky. Měřitko ukazuje 50 µm pro 1000x zvětšení a 10 µm pro 5000x zvětšení.

Pomocí počítačového programu ImageJ byly změřeny průměry vláken. Do tabulek níže byly vyneseny hodnoty mediánu, střední hodnoty (označeno jako Stř. hodnota), směrodatné odchylky (označeno jako Směr. odch) a intervalu spolehlivosti pro 95 % změřených hodnot v závislosti na mediáně (označeno jak 95 % IS). Bylo to uděláno z toho důvodu, že velká mikronová vlákna značně zkreslují výsledky střední hodnoty a směrodatné odchylky, a proto je vhodnější brát v úvahu hodnoty mediánu a intervalu spolehlivosti. Všechny výsledky jsou znázorněné níže.

Tabulka 1 Statistické hodnoty průměrů vláken pro lícovou část vzorků s přidavkem antibakteriální látky. Celkem pro každý vzorek bylo naměřeno 200 hodnot.

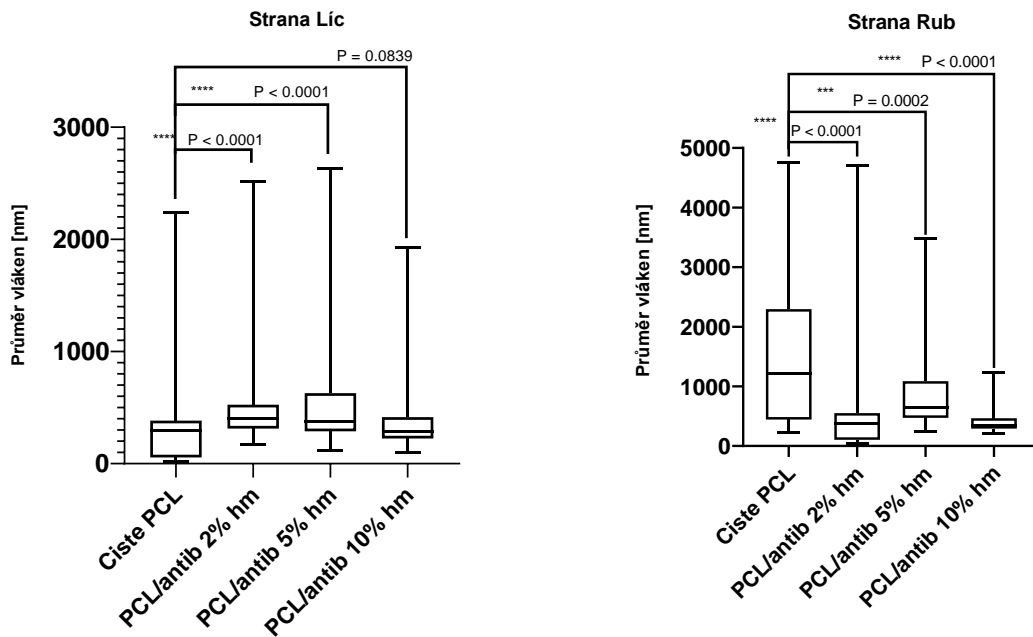
	PCL	Antib 2 %	Antib 5 %	Antib 10 %
<i>Medián [nm]</i>	295,0	402,5	377,5	290,5
<i>Stř. hodnota [nm]</i>	359,0	475,1	580,7	358,8
<i>Směr. odch. [nm]</i>	450,9	281,9	512,1	303,5
<i>95% IS [nm]</i>	296,1 – 421,9	435,8 – 514,4	509,3 – 652,1	343,5 – 428,1

Tabulka 2 Statistické hodnoty průměrů vláken pro rubovou část vzorků s přidavkem antibakteriální látky. Celkem pro každý vzorek bylo naměřeno 100 hodnot.

	PCL	Antib 2 %	Antib 5 %	Antib 10 %
<i>Medián [nm]</i>	1219,0	373,5	654,5	338,5
<i>Stř. hodnota [nm]</i>	1487	527,7	968,2	408,4
<i>Směr. odch. [nm]</i>	1119	722,5	789,7	188,4
<i>95% IS [nm]</i>	899,0 – 1557	326,0 – 464,0	551,0 – 781,0	314,0 – 357,0

Střední hodnoty průměrů nanovláken polykaprolaktonu s přidavkem antibakteriální látky se pohybovaly v rozmezí 350–600 nm. Některé vlákna byly v jednotkách mikronu. Nejmenší průměry vláken byly u 10 % hm. antibakteriální látky a u samotného PCL. Na obrázku 15 jsou znázorněny box-ploty distribuci průměru vláken včetně statistický významných rozdílů. Všechny změřené statistický hodnoty jsou znázorněny v tabulkách č. 1 a 2.

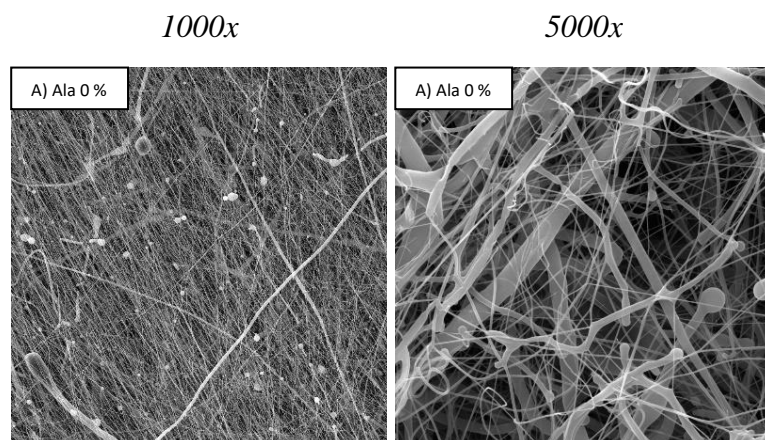
Průměry vláken PCL + antibakteriální látka

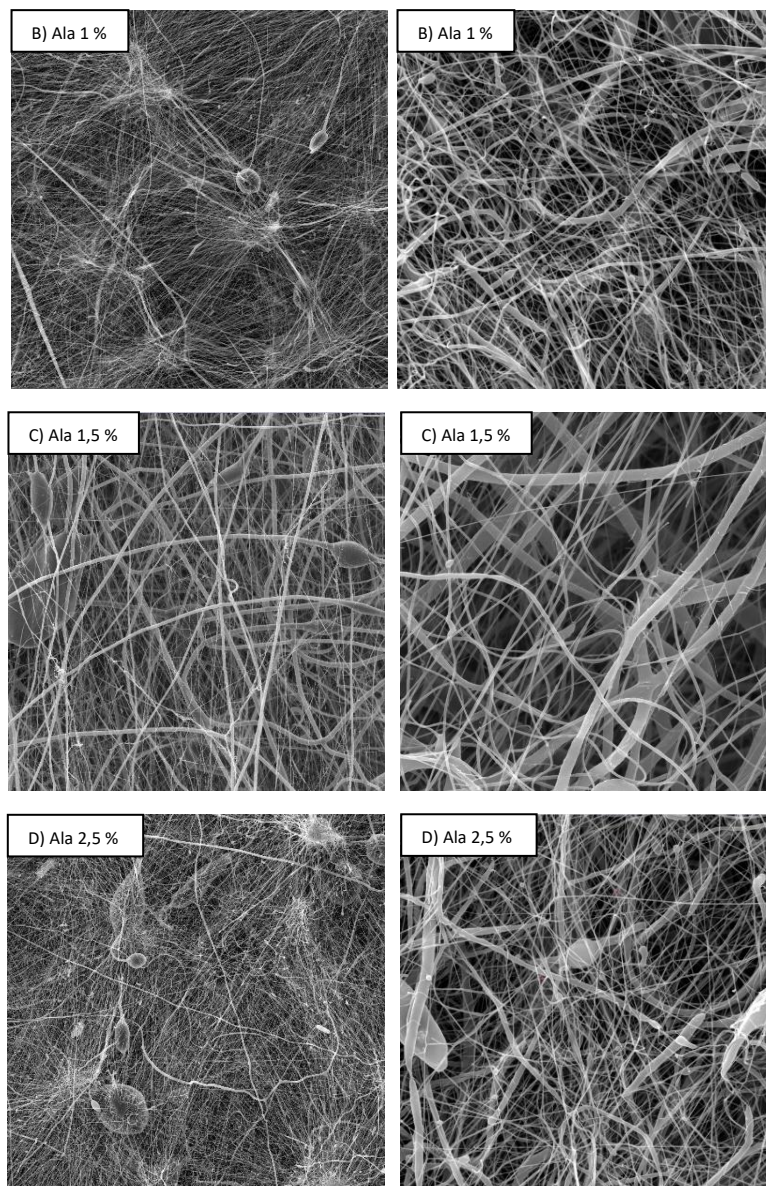


Obrázek 15 Boxplot rozložení distribuci průměru vláken pro nanovlákná PCL s různým přidavkem antibakteriální látky před experimentem; * označuje statisticky významné rozdíly mezi boxploty.

Analýza PCL vlákna s přidavkem alaptidu

Na snímkách z SEM (Obr. 16) je vidět u samotného PCL podobné defekty jako v předcházející analýze s přidavkem antibakteriální látky. Zvyšování obsahu léčiva vedlo ke snížení počtu „kapiček“ a zvýšení hladkosti vrstev. U vzorku s větší koncentrací alaptidu je zaznamenáno defekty, které jsou rozdílné od typických defektů PCL a mají velikost podobné čistému prášku alaptidu.





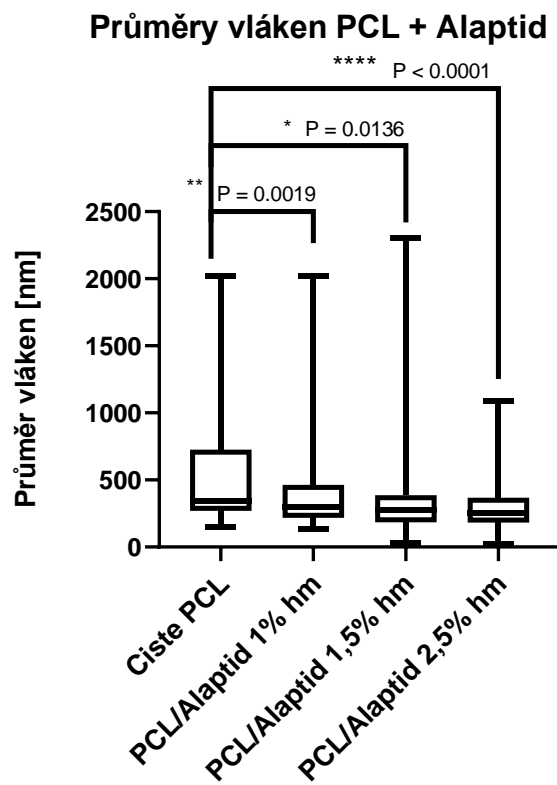
Obrázek 16 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu - 2 snímky v řádce s různým zvětšením pro každý vzorek: a) čisté PCL vlákna; b) PCL vlákna s přidávkem 1 hm. % alaptidu; c) PCL vlákna s přidávkem 1,5 hm. % alaptidu; d) PCL vlákna s přidávkem 2,5 hm. % alaptidu.

Pomocí počítačového programu ImageJ byly změřené průměry vláken. Vzhledem k tomu, že lícová a rubová strana vypadaly dost podobně bylo změřeno 100 hodnot dohromady pro lícovou a rubovou strany. Do tab. 3 byly vyneseny hodnoty mediánu, střední hodnoty (označeno jako Stř. hodnota), směrodatné odchylky (označeno jako Směr. odch) a intervalu spolehlivosti pro 95 % změřených hodnot v závislosti na mediáně (označeno jak 95 % IS). Stejně jak v případě s antibakteriální látkou větší pozornost byla věnovaná hodnotě mediánu a intervalu spolehlivosti.

Tabulka 3 Statistické hodnoty průměrů vláken pro vzorky s přidavkem alaptidu. Celkem pro každý vzorek bylo naměřeno 100 hodnot.

	PCL	Ala 1 %	Ala 1,5 %	Ala 2,5 %
Medián [nm]	341,5	299,0	275,0	251,5
Stř. hodnota [nm]	535,5	385,8	391,0	315,5
Směr. odch. [nm]	435,9	358,3	383,8	239,8
95% IS [nm]	315,0 – 396,0	253,0 – 357,0	240,0 – 308,0	228,0 – 296,0

Střední hodnota průměrů nanovláken polykaprolaktonu s přidavkem alaptidu se pohybují v rozmezí 300–550 nm. Stejně jako u materiálů s inkorporovanou antibakteriální látkou, některé vlákna byly v jednotkách mikronu. Na obrázku 17 je znázorněno distribuci rozložení průměru vláken včetně statistický významných rozdílů. Podle zmíněného obrázku a Tab. 3 je vidět, že se morfologie vláken měnila v závislosti na koncentraci přidaného alaptidu. Mezikvartilové rozpětí průměru vláken se zužovaly v závislosti na množství přidaného alaptidu, což může být vysvětleno kompatibilitou roztoku polymeru s přidávaným léčivem. (Zeng et al. 2005).



Obrázek 17 Boxplot rozložení distribuci průměru vláken pro nanovlákná PCL s různým přidavkem alaptidu; * označuje statisticky významné rozdíly mezi boxploty.

2.3.2 Výsledky uvolňování látek z nanovláknenného materiálu

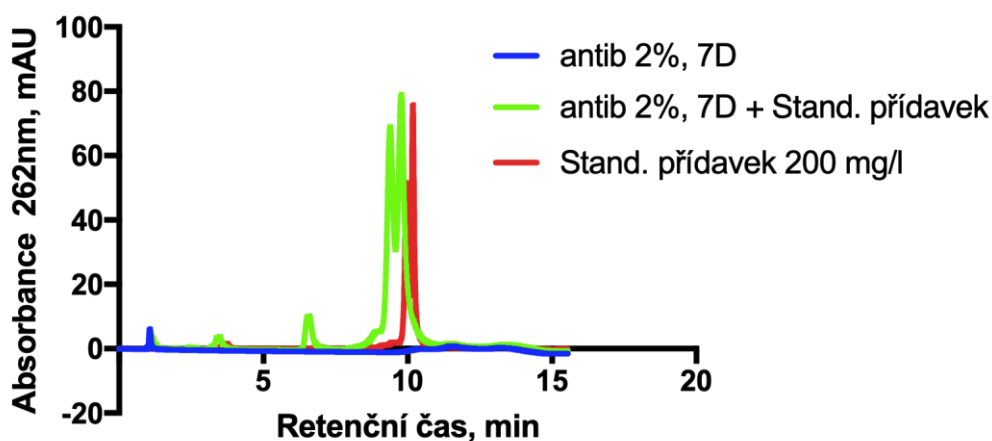
Kinetika uvolňování alaptidu i antibakteriální byla studovaná v podmínkách *in vitro* při různých počátečních zatíženích. Vzorky byly zkoumány v roztoku PBS (pH 7,4) a udržovány při teplotě 37 °C.

Antibakteriální látka

Na rozdíl od očekávaného průběhu uvolňování, pro vzorky s přidavkem antibakteriální látky nebylo zaznamenáno uvolňování látky ani na 60. den od začátku experimentu. Je možným, že jedním z hlavních důvodů jsou silné hydrofobní interakce mezi hydrofobním řetězcem léčiva a polymerním vláknem, což zabraňuje přístupu tekutiny (v našem případě PBS) a uvolňování pomocí difuze. (Srikan et al. 2008) V tomto případě difuze nejspíše nemůže být dominantním mechanismem a lze předpokládat, že k částečnému uvolňování látky dojde při plné nebo alespoň částečné degradaci polymerní matrici. (viz 1.2.2) Nicméně PCL vlákna mají čas degradace kolem dvou let, ale lze předpokládat částečnou erozi už po několika měsících. (Sun et al. 2006) Proto *in vitro* experiment nebyl zcela zastaven, a nanovláknenné vzorky se stále inkubovaly po dobu cca půl roku s pravidelnými odběry. Z důvodu technických komplikací na zařízení HPLC, zatím se ale nepodařilo změřit vzorky, odebrané v pozdních časech (po 4-5 měsících). Navíc při srovnání snímku z SEM před a po experimentu je vidět, že k degradaci vláken nedošlo a celková morfologie výrazně se nezměnila za výjimkou několika nových aglomerátů částic.

Důležitým faktorem při uvolňování léčiva je jeho kompatibilita s roztokem polymeru. Špatně rozpustná látka s polymerním roztokem s velkou jistotou po procesu elektrostatického zvláknění dostane se hlavně na povrch vláken, kde následně dojde, k již několikrát zmíněnému explozivnímu uvolňování. Zatímco použita antibakteriální látka má velmi dobrou rozpustnost, a tedy i v polárních rozpouštědlech jako chloroform a ethanol. Proto můžeme předpokládat, že pravděpodobně látka byla homogenně rozptýlena v nanovlákněch a k jejímu uvolňování dojde při degradaci těchto vláken. (Zeng et al. 2005) Pro kontrolu správnosti měření na HPCL byla provedena analýza, metodou standardního přídatku, jejíž výsledky je zobrazeno na obrázku 18. Na grafu je znázorněna závislost absorbance při hodnotě 262 nm na retenčním čase. Modrá čára znázorňuje absorbance 2 hm % antibakteriální látky po 7 dnech experimentu. Červená čára ukazuje na absorbance standardního přídatku 200 mg/l, což je čistý rozpouštěný prášek léčiva. Zelená čára

znázorňuje absorbance 2 hm % antibakteriální látky po 7 dnech experimentu spolu se standardním přídatkem. Jak je patrné z grafu zelená a červená čára máji skoro stejné piky, zatímco modrá čára žádné piky nemá. Tento graf ukazuje na to, že se léčivo opravdu nebylo detekováno ani na 7. den přesto měření HPLC bylo skutečně schopné detekovat uvolňování antibakteriální látky.



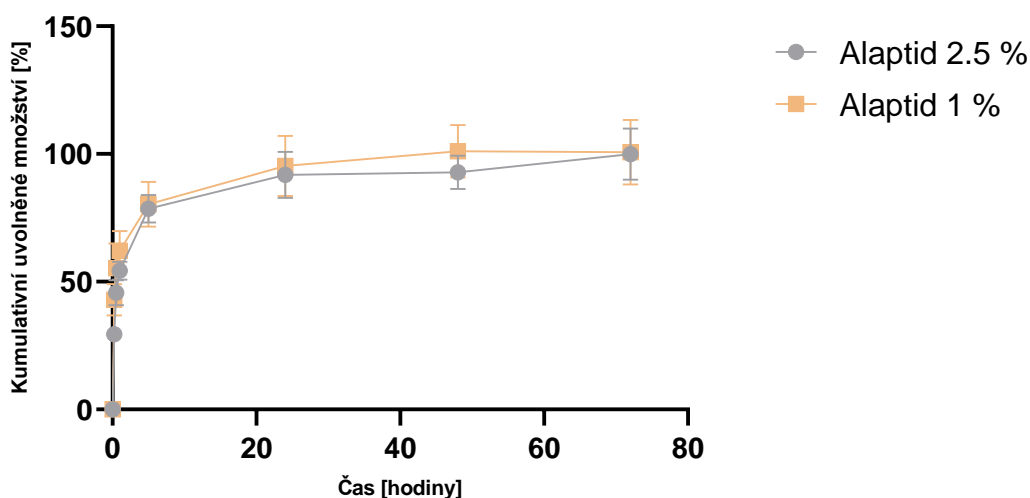
Obrázek 18 Graf absorbance vzorků v závislosti na čase

Kinetika uvolňování alaptidu

Pro vzorky s alaptidem bylo zaznamenáno rychlé uvolňování většiny začleněné látky během prvních 24 hodin. Kinetiku uvolňování alaptidu lze rozdělit do dvou částí. První část trvá kolem hodiny, za které se uvolňuje kolem 60 % začleněné látky. Dále rychlost uvolňování klesá s pomalým nárůstem koncentraci léčiva v disolučním mediu. Rychlý nárůst lze vysvětlit uvolňováním alaptidu z povrchu nanovláčkové matrici, což souvisí s jevem „angl. burst effect“ neboli explozivní uvolňování, který byl popsán v odstavci 1.2.1. Jelikož za dominantní mechanismus uvolňování lze pravděpodobně považovat prostou difuzi, pro částice v blízkosti středu vláčkové matrici trvá delší dobu migrace směrem k povrchu, což vede ke snižování rychlosti uvolňování léčiva v čase.

Za 24 hodiny uvolnilo se kolem 90-95 % od hodnoty inkorporované látky. Dále koncentrace uvolněné látky fluktuje kolem 100 %. Graf uvolňování alaptidu jsou znázorněné níže.

Kinetika uvolňování alaptidu



Obrázek 19 Graf kinetiky uvolňování alaptidu v závislosti na čase.

Navíc byla také změřena kinetika uvolňování pro koncentraci 1.5 % hm, a vzhledem k tomu, že zatím nebylo experimentálně zjištěno skutečné množství inkorporované látky nelze provést výpočet procentuálního množství uvolněné látky pro porovnání z jinými vzorky. Nicméně, uvolněné množství byly v souladu s hodnotou předpovědanou na základě výpočtu z původního množství a hmotnosti vláknenného vzorku.

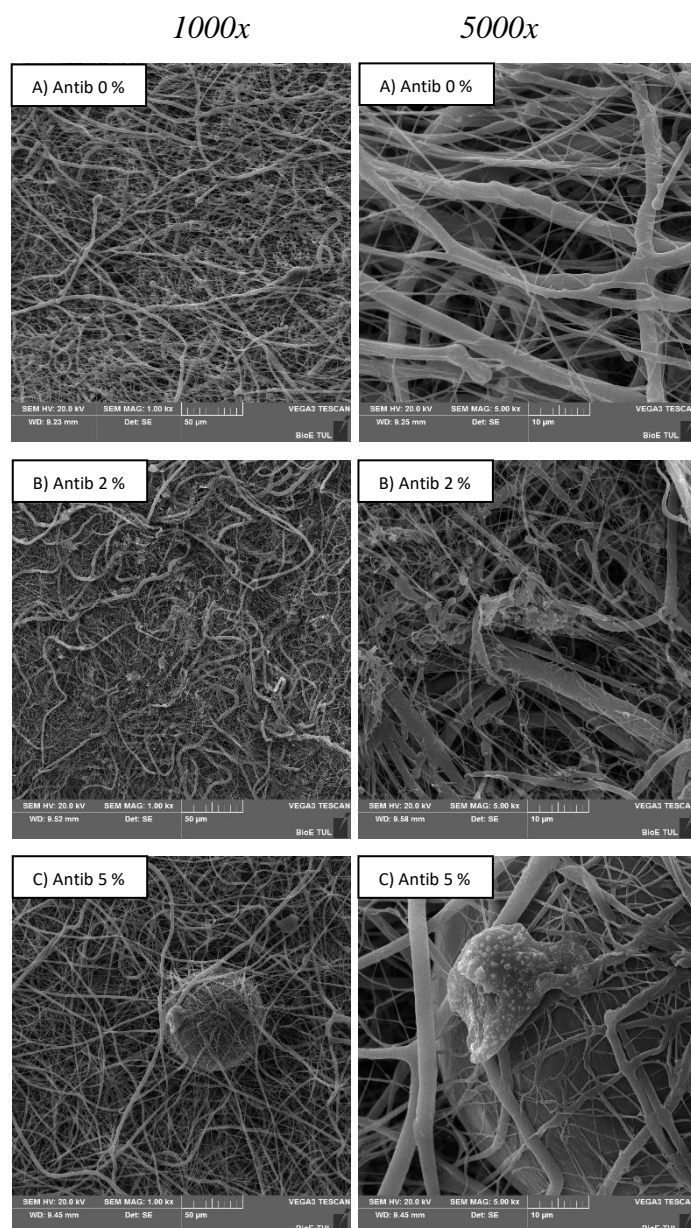
Z naměřených hodnot se dá říct, že inkorporování alaptidu do nanovláknenné PCL matrici proběhlo úspěšně a po explozivním uvolnění určitého množství docházelo k celkem řízené kinetice uvolňování.

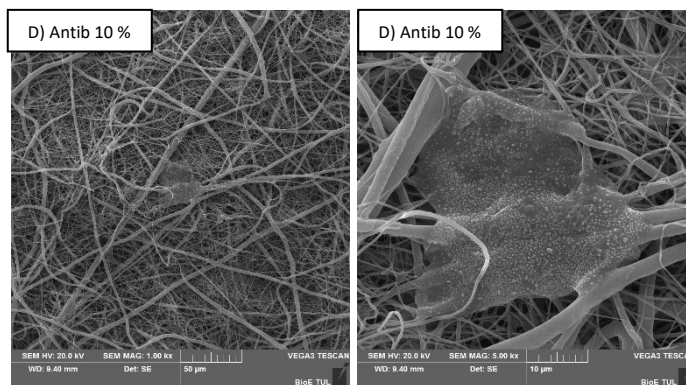
Kinetika alaptidů již byla studována, ale v této práci bylo brána v úvahu předchozí zkušenosti a v návrhu experimentu bylo provedeno několik změn: a) objem disolučního média byl zvýšen pro dosažení „sink“ podmínek (viz 2.2), b) byly eliminovány sekundární proměnné, které neovlivňovaly kinetiku, c) byl zvýšen počet odběrů d) byla přidána koncentrace 1,5 % hm alaptidu. (Asatiani 2018)

2.3.3 Morfologická analýza vlákna s přidavkem antibakteriální látky po experimentu

Po ukončení experimentu s přidavkem antibakteriální látky vzorky byly vysušeny a vyfoceny pomocí SEM. Výsledky jsou znázorněny na obr. 20. Také bylo zaznamenáno nárůsty nezjištěné přírody na vláknech. Vzhledem k tomu, že použita antibakteriální látka má dobrou rozpustnost lze předpokládat silnou interakci léčiva s polymerní matricí. Dá

se říct, že se léčivo drží silnými ne vazebnými interakcemi s polymerním vláknem. Taky na vláknech s přídatkem surfaktantu bylo pozorováno různé defekty podobné foliím a různé nepravidelné objekty na nich umístěné. Vzhledem k tomu, že antibakteriální látka má strukturu surfaktantu lze předpokládat, že tyto defekty mohly být způsobené značným snížením povrchového napětí v roztoku (viz 1.3.2). Rozpouštěné léčivo obalilo polymerní vlákna při procesu elektrostatického zvláknování a nerozpouštěné částičky léčiva mohly uváznout ve velmi viskózním rozpouštěném léčivě. Ze snímku SEM je vidět, že k degradaci neboli eroze vláken ve značně míře nedošlo, a proto lze předpokládat, že i na poslední den experimentu tj. 174 den léčivo se neuvolní.





Obrázek 20 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu - 2 snímky v řádku s různým zvětšením pro každý vzorek: a) čistá PCL vlákna; b) PCL vlákna s přidáním 2 hm. % antibakteriální látky; c) PCL vlákna s přidáním 5 hm. % antibakteriální látky; d) PCL vlákna s přidáním 10 hm. % antibakteriální látky. Měřítka ukazují 50 µm pro 1000x zvětšení a 10 µm pro 5000x zvětšení.

2.3.4 Měření sorpce

Měření sorpce polymerního materiálu s různým zatížením antibakteriální látky bylo prováděno dvakrát pro každý vzorek. Analýza dat byla provedena pomocí použití Washburnové metody. Washburnova teorie říká, že pokud se porézní pevná látka dostane do kontaktu s kapalinou, takže pevná látka není v kapalině ponořena, ale spíše se dotýká povrchu kapaliny, pak vzestup kapaliny do pórů pevné látky způsobený kapilárním působením řídí se následujícími rovnicemi:

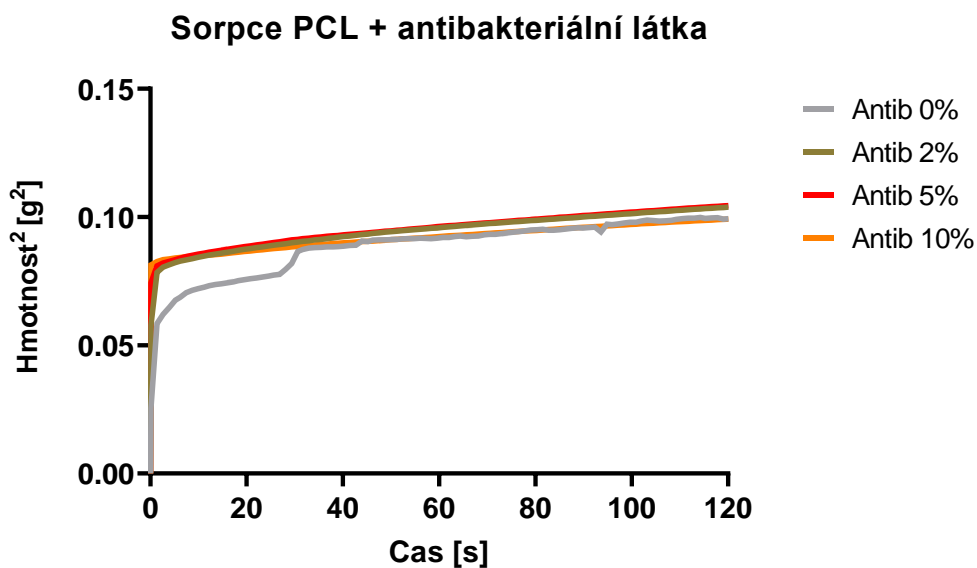
$$t = Am^2$$

Kde t je čas po kontaktu pevné látky a kapaliny, A je konstanta, která je závislá na vlastnostech kapaliny a pevné látky a m je hmotnost kapaliny nasávané do pevné látky. Po úpravě toho vztahu dosazením proměnných za A dostaneme:

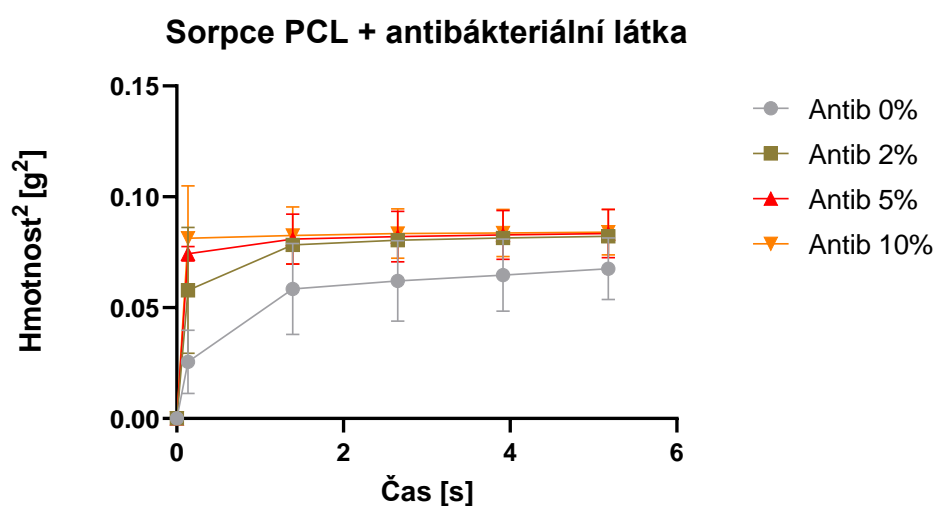
$$\frac{m^2}{t} = \frac{c \cdot \rho^2 \cdot \sigma \cdot \cos \theta}{\eta}$$

Kde η – viskozita kapaliny, ρ – hustota kapaliny, σ – povrchové napětí kapaliny, θ – kontaktní úhel mezi pevnou látkou a kapalinou a c – materiálová konstanta, která je závislá na porézní architektuře pevné látky. Levá strana vzorku znázorňuje experimentálně naměřená data. (Krüss 1996)

Z naměřených dat byla udělena závislost kvadrátu hmotnosti v závislosti na čase. Hodnoty byly extrapolovány na nulovou hodnotu (tj byl přidán pro všechny data počáteční bod [0;0]). Výsledný graf je znázorněn na obrázku 21. Pro zjištění hodnoty směrnice přímky, což vyjadřuje rychlost nasávání kapaliny do pevného materiálu byl udělán stejný graf závislosti, ale pro prvních 6 bodu včetně směrodatných odchylek. (Obr. 22)



Obrázek 21 Závislost kvadrátu hmotnosti na čase pro vzorky s různým množstvím inkorporované antibakteriální látky (celý experiment)



Obrázek 22 Závislost kvadrátu hmotnosti na čase pro vzorky s různým množstvím inkorporované antibakteriální látky včetně směrodatných odchylek (první 6 bodů)

Tabulka 4 Hodnoty směrnice přímky pro vzorky s různým přídatkem antibakteriální látky

	PCL	Antib 2 %	Antib 5 %	Antib 10 %
<i>Směrnice přímky</i>	0,01088	0,01072	0,009358	0,008807

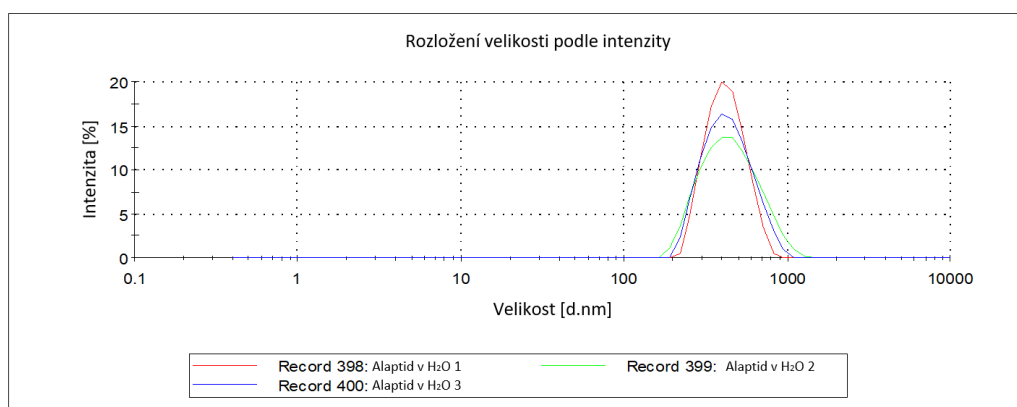
Na obrázku 22 je vidět, že existuje určitá závislost mezi množstvím přidaného léčiva a kvadrátu hmotnosti nasávané kapaliny. V tab. 4 je zobrazena hodnota směrnici linii trendu pro prvních 6 bodů, která ukazuje, že čisté PCL má nejvyšší rychlost nárustu kvadrátu hmotnosti. Toto může být způsobeno hydrofobicitou materiálu a hodnotou saturace

vzorků. Z obr. 22 je vidět, že v první okamžik měření 10 % hm Antib má největší množství sorbované vody, zatímco čisté PCL má nejmenší. Dále je vidět rychlejší nárůst PCL 0% v porovnání se vzorky s přidavkem léčiva. Je to způsobeno rychlou saturací vzorku s větším obsahem léčiva. Po překročení dochází jenom k pomalému nárůstu hmotnosti, což odpovídá pozorovaným změnám během měření. Vzorek s obsahem antibakteriální látky 10 % hm mnohem rychleji smáčel než bez léčiva. Taky lze vidět na obr. 21 po 30 sekundách, že všechny křivky nachází v těsné blízkosti vedle sebe s pomalým nárůstem, což taky svědčí o saturaci vzorků.

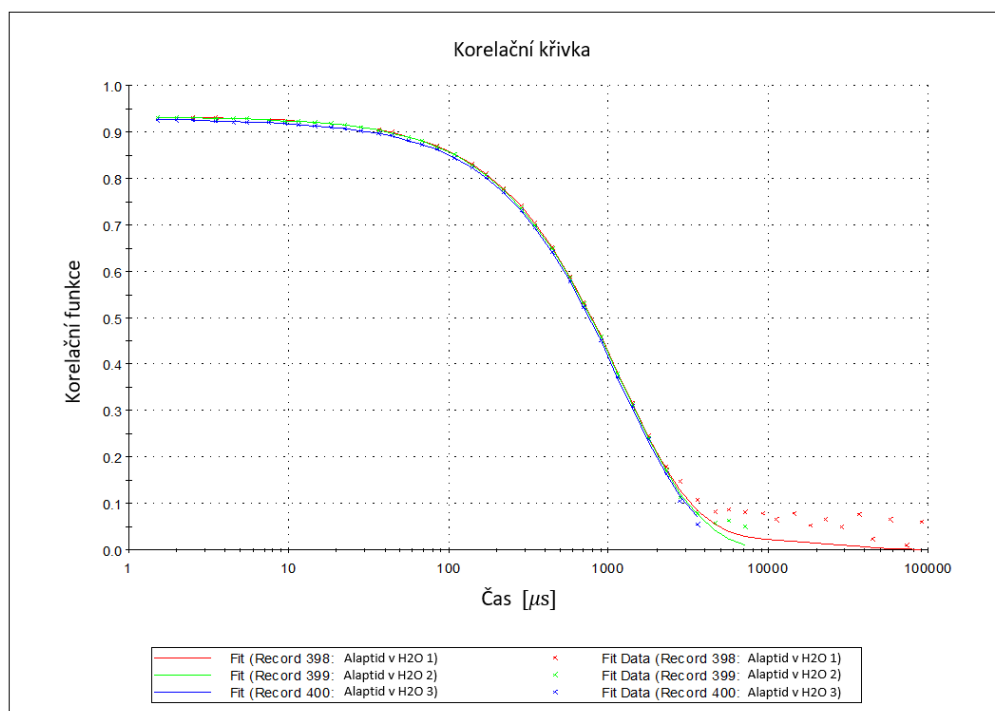
I když tento experiment ukazuje na určitou závislost mezi množstvím přidané látky a její vliv na hydrofobnost materiálů, je nutné si uvědomit, že směrodatné odchylky jednotlivých měření se do značné míry vzájemně překrývají.

2.3.5 Výsledky z měření velikosti částic

Čistá antibakteriální látka a alaptid byly dispergovány v malém množství příslušného disperzního media - methanol pro antibakterikum a voda pro alaptid. Následně vzorky byly změřeny pomocí přístroje Zetasizer. Pro každou látku bylo provedeno 3 měření s krátkým intervalem a výsledky rozložení velikosti částic byly vyneseny do grafu závislosti intenzity na velikosti částice. Na obrázku 23 je znázorněno rozložení velikosti částic alaptidu. Výsledky jednotlivých měření vyšly dost blízko sebe a hodnoty piky pohybují kolem 400 nm. Spolehlivost měření částečně potvrzuje i tvar autokorelační křivky, která souvisí s pohybem částic v suspenze. Velké částice se pohybují pomalu, zatímco menší částice se pohybují rychle. Při měření velkých částic, autokorelační funkce bude pomalejší než u malých částic. (Šev et al. 2014) Autokorelační funkce pro alaptid (obr. 24) vyšla unimodální a shoduje se pro tři různé měření, a proto lze říct, že připravený vzorek suspenze byl po dobu měření poměrně stabilní.

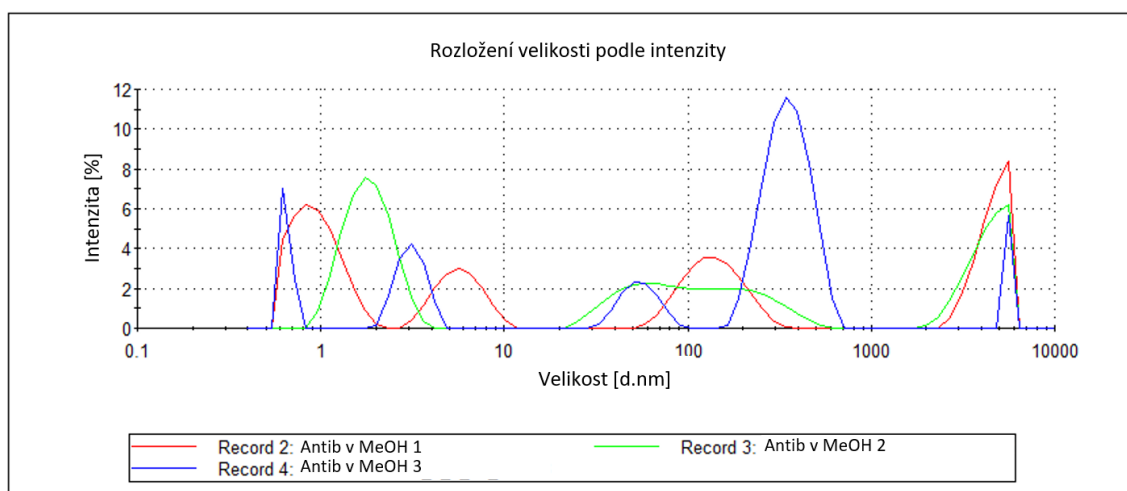


Obrázek 23 Rozložení velikosti částic alaptidu podle intenzity signalu

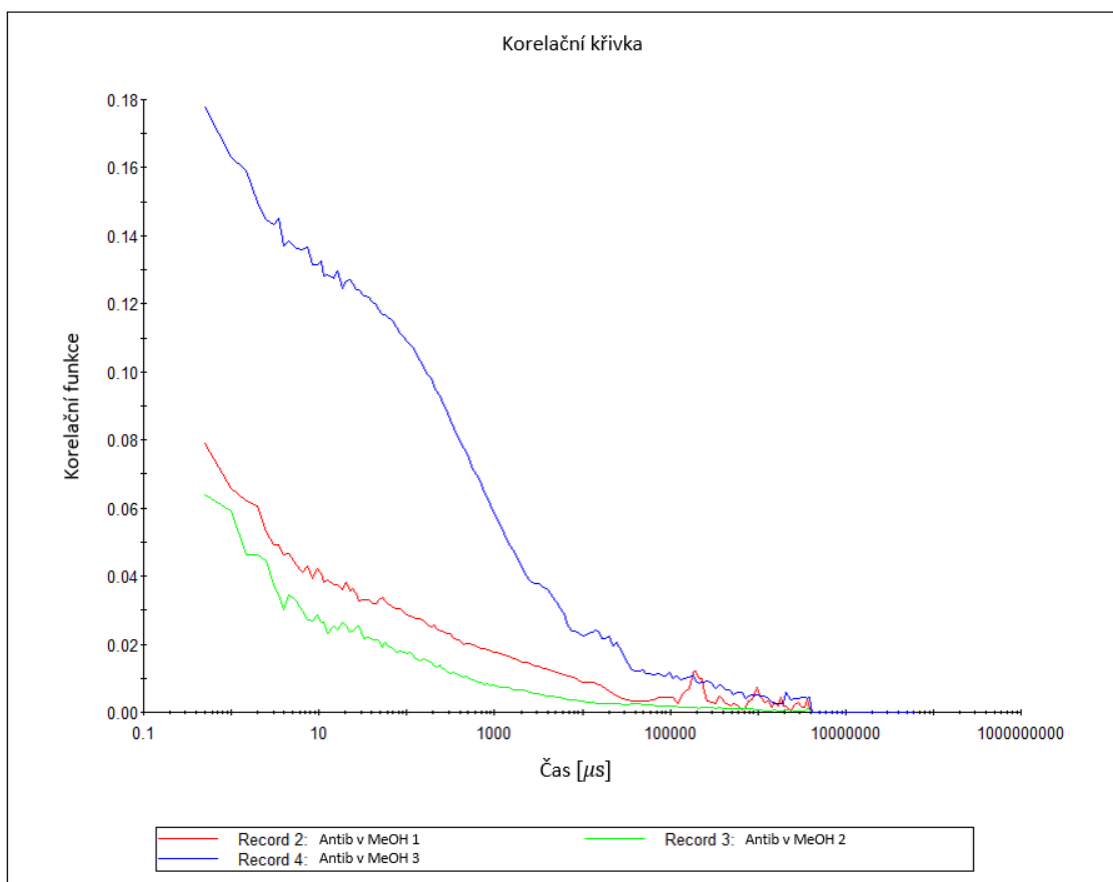


Obrázek 24 Autokorelační křivka pro měření velikosti částic alaptidu

Pro antibakteriální látku měření vyšlo jinak. Obvykle se očekává jeden dva piky v blízkém rozložení kolem sebe po celou dobu měření, jak to bylo např. u měření alaptidu. Na obrázku 25 je vidět, že každá z křivek má několik piků, které nekorespondují s ostatními měření. Tedy z grafu nemůžeme jednoznačně určit velikost částic zkoumané látky, protože rozpouštěný vzorek je příliš polydisperzní. Toto může být způsobeno velmi dobrou rozpustností antibakteriální látky v polárních rozpouštědlech, kvůli čemu nelze vytvořit suspenzi. Autokorelační funkce na obrázku 26 taky je velmi odlišná od očekávaného tvaru, jak to bylo např. u alaptidu (obr. 24). Je vidět přítomnost značného množství šumu a absenci jasné korelace, což znamená nesprávnost daných výsledků.



Obrázek 25 Rozložení velikosti částic antibakteriální látky podle intenzity signálu



Obrázek 26 Autokorelační křivka pro měření velikosti částic antibakteriální látky

2.4 Závěr

V dnešní době řízené systémy léčiv na bázi elektrostaticky zvlákněných nanovláken jsou ve fázi stálého vyvíjení. Díky svému velkému potenciálu v oblasti personalizované medicíny získávají větší pozornost. Zároveň se stále hledají možnosti vyvíjení látek, které by byly schopné nahradit antibiotika. Cílem této studie bylo inkorporace vybrané antibakteriální látky, která má strukturu surfaktantu do polymerní matrici polykaprolaktonu a zjištění kinetiky uvolňování v podmínkách *in vitro*. Kvůli tomu, že antibakterikum měl neočekávané chování a nebylo zaznamenáno uvolňování ani po dvou měsících byl proveden podobný experiment s alaptidem.

Nejprve byly úspěšně vyrobeny nanovlákněné vrstvy polykaprolaktonu pomocí technologie elektrostatického zvláknění. Při analýze SEM bylo zjištěno, že přidáním léčiva průměry vláken PCL zmenšovaly a defekty typické pro PCL při procesu elektrostatického zvláknění (např. kapičky polymeru) částečně zmizely.

Poté byl proveden experiment uvolňování inkorporovaných látek v podmínkách *in vitro*. Pro alaptid byla zjištěna kinetika s rychlým uvolňováním v prvních hodinách a postupným uvolňováním veškeré začleněné látky během několika dnů. Pro antibakteriální látku naopak nebyla zjištěna žádná kinetika i na 60 den. Jeden z možných důvodů je dobrá kompatibilita léčiva s polymerní matricí, což přivedlo ke silným hydrofobním interakcím a inkapsulaci léčiva v polymerní matrici. Zatímco u alaptidu za dominantní mechanismus difuze, u antibakteriální látky lze předpokládat uvolňování erozí polymerní matrici.

Velikost částic antimikrobiální látky nebyla změřena kvůli její dobrému rozpouštění a nemožnosti vytvořit suspenzi. Však bylo zaznamenáno nepatrné zvýšení hydrofilnosti materiálu pomocí měření sorpce, což ale může být vysvětleno i celkovou změnou morfologie vláken inkorporací antibakteriální látky.

Ze získaných výsledků lze říct, že inkorporace obou vybraných látek do polymerní matrici proběhlo úspěšně, ale hypotéza ohledně difuze jako hlavního mechanismu uvolňování antibakteriální látky zatím nebyla potvrzena.

Vybraná antimikrobiální látka má složitou modulární strukturu, a proto vyžaduje pokračování studií. Jako hlavní výhledy do budoucna jsou několik bodů, a to zejména opakování experimentu s uvolňováním antibakteriální látky do jiného disolučního média (ve kterém by se PCL mohlo zároveň enzymaticky degradovat). Vzhledem k upřesnění okolních podmínek *in vitro* experimentu a získání většího počtu dat, je nyní potřeba hlubší analýza kinetiky uvolňování (zejména fitace do matematických modelů). Nakonec, je nutné provést analýzu EDX pro ověření toho, zda pozorované částice na povrchu vláken před a po experimentu byly skutečně inkorporovanou antibakteriální látkou.

Seznám použité literatury

Abutaleb, Ahmed, Dinesh Lolla, Abdulwahab Aljuhani, Hyeon Shin, Jonathan Rajala a George Chase, 2017. Effects of surfactants on the morphology and properties of electrospun polyetherimide fibers. *Fibers* [online]. **5**(3), 33. ISSN 2079-6439. Dostupné z: [doi:10.3390/fib5030033](https://doi.org/10.3390/fib5030033)

Abuin, E. B. and Scaiano, J. C. *Journal of American Chemical Society* 1984, 106, 6274
Agarwal, Seema, Joachim H. Wendorff a Andreas Greiner, 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* [online]. **49**(26), 5603–5621. ISSN 00323861. Dostupné z: [doi:10.1016/j.polymer.2008.09.014](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.014)

Asatiani, Nikifor. Study of diffusion of alaptide from nanofibrous layers. Liberec, 2018. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. Vedoucí práce Ing. Petr Mikeš, Ph.D.

Berne, Bruce J. a Robert Pecora, 2000. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Dover ed. Mineola, N.Y: Dover Publications. ISBN 978-0-486-41155-2.

Cornejo Bravo, José Manuel, Luis Jesús Villarreal Gómez a Aracely Serrano Medina, 2016. Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques. In: Sajjad Haider a Adnan Haider, ed. *Electrospinning - Material, Techniques, and Bio-medical Applications* [online]. B.m.: InTech [vid. 2020-05-14]. ISBN 978-953-51-2821-2. Dostupné z: doi:[10.5772/65939](https://doi.org/10.5772/65939)

Crank, John, 1975. *The mathematics of diffusion*. 2d ed. Oxford, [Eng]: Clarendon Press. ISBN 978-0-19-853344-3.

Krüss, GmbH, 1996. Wettability studies for porous solids including powders and fibrous materials. Technical Note. Dostupné z WWW: https://www.kruss-scientific.com/fileadmin/user_upload/website/literature/kruss-tn302-en.pdf

Hansson Per a Björn Lindman, 1996. Surfactant-polymer interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Volume 1, Issue 5, Pages 604-613, ISSN 1359-0294. Dostupné z: doi: 10.1016/S1359-0294(96)80098-7.

Hillery, Anya M., Andrew W. Lloyd a James Swarbrick, ed., 2001. *Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists*. London: Taylor & Francis. ISBN 978-0-415-27197-4.

Hu, Jue, Molamma P. Prabhakaran, Xin Ding a Seeram Ramakrishna, 2015a. Emulsion electrospinning of polycaprolactone: influence of surfactant type towards the scaffold properties. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. **26**(1), 57–75. ISSN 0920-5063, 1568-5624. Dostupné z: doi:[10.1080/09205063.2014.982241](https://doi.org/10.1080/09205063.2014.982241)

Hu, Jue, Molamma P. Prabhakaran, Lingling Tian, Xin Ding a Seeram Ramakrishna, 2015b. Drug-loaded emulsion electrospun nanofibers: characterization, drug release and in vitro biocompatibility. *RSC Advances* [online]. **5**(121), 100256–100267. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:[10.1039/C5RA18535A](https://doi.org/10.1039/C5RA18535A)

Jirásková, J.; Ondřejček, P.; Wolaschka, T.; Řehula, M.; Rabišková, M. Aplikční možnosti disoluční metody s průtokovou celou. *Chem. Listy* 2015, 109 (1), 34–40. ISSN 0009-2770.

Kenawy, El-Refaie, Gary L. Bowlin, Kevin Mansfield, John Layman, David G. Simpson, Elliot H. Sanders a Gary E. Wnek, 2002. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release* [online]. **81**(1–2), 57–64. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:[10.1016/S0168-3659\(02\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00041-X)

Keraliya, Rajesh A., Chirag Patel, Pranav Patel, Vipul Keraliya, Tejal G. Soni, Rajnikant C. Patel a M. M. Patel, 2012. Osmotic Drug Delivery System as a Part of Modified Release Dosage Form. *ISRN Pharmaceutics* [online]. **2012**, 1–9. ISSN 2090-6153. Dostupné z: doi:[10.5402/2012/528079](https://doi.org/10.5402/2012/528079)

Khan, Mohammad Yunus, Abhijit Samanta, Keka Ojha a Ajay Mandal, 2008. Interaction between aqueous solutions of polymer and surfactant and its effect on physicochemical properties. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* [online]. **3**(5), 579–585. ISSN 19322135, 19322143. Dostupné z: doi:[10.1002/apj.212](https://doi.org/10.1002/apj.212)

Liu, Yong, Kaili Li, Mohamedazeem M. Mohideen a Seeram Ramakrishna, 2019. Fiber membranes obtained by melt electrospinning for drug delivery. In: *Melt Electrospinning* [online]. B.m.: Elsevier, s. 173–195 [vid. 2020-05-31]. ISBN 978-0-12-816220-0. Dostupné z: doi:[10.1016/B978-0-12-816220-0.00009-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816220-0.00009-9)

Lu, Yang, Jiangnan Huang, Guoqiang Yu, Romel Cardenas, Suying Wei, Evan K. Wujcik a Zhanhu Guo, 2016. Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering: Biomedical coaxial electrospun fibers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. **8**(5), 654–677. ISSN 19395116. Dostupné z: doi:[10.1002/wnan.1391](https://doi.org/10.1002/wnan.1391)

Mark, James E., ed., 2009. *Polymer data handbook*. 2nd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-518101-2.

Nakama, Y., 2017. Surfactants. In: *Cosmetic Science and Technology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 231–244 [vid. 2020-04-21]. ISBN 978-0-12-802005-0. Dostupné z: doi:[10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X)

Odeh, Fadwa. "Polymer-Surfactant Interaction." *Clarkson University, New York* (2006).

Opatrilova, Radka, Aneta Cernikova, Lenka Coufalova, Jiri Dohnal a Josef Jampilek, 2013. *In Vitro* Permeation of Micronized and Nanonized Alaptide from Semisolid Formulations. *The Scientific World Journal* [online]. **2013**, 1–8. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:[10.1155/2013/787283](https://doi.org/10.1155/2013/787283)

Ramakrishna, Seeram, ed., 2005. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific. ISBN 978-981-256-415-3.

Rosen, Milton J. a Joy T. Kunjappu, 2012. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. B.m.: John Wiley & Sons. ISBN 978-1-118-22902-6.

Rádl, S., E. Kasafírek a I. Krejčí, 1990. Alaptide. *Drugs of the Future* [online]. **15**(5), 445. ISSN 0377-8282. Dostupné z: doi:[10.1358/dof.1990.015.05.127620](https://doi.org/10.1358/dof.1990.015.05.127620)

Růžičková, Jana, 2016. Možnosti využití nanovláken v medicíně. Praha 2016. Kongresové centrum Praha. Dostupné z WWW: <https://www.helpnet.cz/sites/default/files/Ruzickova.pdf>

Sadasivuni, Kishor Kumar, Deepalekshmi Ponnamma, Jaehwan Kim, Mariam Ali Almaadeed A J.-J. Cabibihan, ed., 2017. *Biopolymer composites in electronics*. Amsterdam ; Boston ; Heidelberg ; London ; New York ; Oxford ; Paris ; San Diego ; San Francisco ; Singapore ; Sydney ; Tokyo: Elsevier. ISBN 978-0-12-809261-3.

Siepmann, Juergen, Ronald A. Siegel a Michael J. Rathbone, ed. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* [online]. Boston, MA: Springer US, 2012 [cit. 2020-05-31]. DOI: 10.1007/978-1-4614-0881-9. ISBN 978-1-4614-0880-2.

Srikar, R., A. L. Yarin, C. M. Megaridis, A. V. Bazilevsky a E. Kelley, 2008. Desorption-Limited Mechanism of Release from Polymer Nanofibers. *Langmuir* [online]. **24**(3), 965–974. ISSN 0743-7463, 1520-5827. Dostupné z: doi:[10.1021/la702449k](https://doi.org/10.1021/la702449k)

Sun, Hongfan, Lin Mei, Cunxian Song, Xiumin Cui a Pengyan Wang, 2006. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* [online]. **27**(9), 1735–1740. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:[10.1016/j.biomaterials.2005.09.019](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.019)

Šev, Petra, Ra Kašpárková a Í Krej, 2014. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chem. Listy*. Zlín: Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Dostupné z WWW: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf

Vediappan, Vijayakumar & Subramanian, K., 2015. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials* [online]. B.m.: Taylor & Francis [vid. 2020-05-17]. ISBN 978-1-4398-9879-6. Dostupné z: doi:[10.1081/E-EBPP](https://doi.org/10.1081/E-EBPP)

Verreck, Geert, Iksoo Chun, Joel Rosenblatt, Jef Peeters, Alex Van Dijck, Jurgen Mensch, Marc Noppe a Marcus E. Brewster, 2003. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *Journal of Controlled Release* [online]. **92**(3), 349–360. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:[10.1016/S0168-3659\(03\)00342-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00342-0)

Zeng, Jing, Xiaoyi Xu, Xuesi Chen, Qizhi Liang, Xinchao Bian, Lixin Yang a Xiabin Jing, 2003. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. **92**(3), 227–231. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:[10.1016/S0168-3659\(03\)00372-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00372-9)

Zeng, Jing, Lixin Yang, Qizhi Liang, Xuefei Zhang, Huili Guan, Xiuling Xu, Xuesi Chen a Xiabin Jing, 2005. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *Journal of Controlled Release* [online]. **105**(1–2), 43–51. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:[10.1016/j.jconrel.2005.02.024](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.02.024)

Seznám obrázků

<i>Obrázek 1 Graf závislosti koncentraci léčiva ve plasmě člověka na čase. Porovnání řízeného uvolňování s rychlým uvolňováním (Vediappan 2015).....</i>	<i>11</i>
<i>Obrázek 2 Schematické znázornění procesu elektrostatického zvlákňování (Kajdič et al. 2019).....</i>	<i>12</i>
<i>Obrázek 3 Zvlákňovací komora přístrojů NANOSPIDER™. 1 – podklad, 2 – struna, 3 - místo umístění pohybovací hlavy s roztokem (Technická univerzita v Liberci)</i>	<i>13</i>
<i>Obrázek 4 Schematické znázornění základních způsobů inkorporování léčiva do nanovláken A) Použití polymerní směsi s léčivem B) Koaxiální elektrostatické zvlákňování C) Použití emulze (Cornejo Bravo et al. 2016)</i>	<i>15</i>
<i>Obrázek 5 Schematické znázornění třech fází uvolňování léčiva z objemově erodujících polymerů. První stupeň (a) odpovídá léčivu, které je uvolňováno z povrchu zařízení nebo z pórů, které jsou k povrchu připojeny. Následuje druhé latentní stadium, během kterého dochází k malé degradaci polymeru a zbývající léčivo je zachyceno (b). Ve třetím stupni se zachycené léčivo rychle uvolňuje, když se polymer autokatalyticky rozpadá (c) (Siepmann et al. 2012)</i>	<i>18</i>

<i>Obrázek 6 Příklad systému s uvolňovacím mechanismem typu osmóza (Keraliya et al. 2012).....</i>	<i>18</i>
<i>Obrázek 7 Struktura a klasifikace surfaktantu (Nakama 2017)</i>	<i>19</i>
<i>Obrázek 8 Vlevo je model náhrdelníku (Khan et al. 2008) vpravo je zobrazeno působení iontových částí surfaktantu na polymerní řetězec (Abuin 1984)</i>	<i>22</i>
<i>Obrázek 9 Interakce surfaktantu s postranními řetězci polymeru (Odeh 2006).....</i>	<i>22</i>
<i>Obrázek 10 Povrchové napětí slabě interagující směsi polymer / povrchově aktivní látka. Je také znázorněno povrchové napětí samotné povrchově aktivní látky. (Taylor et al. 2007).....</i>	<i>23</i>
<i>Obrázek 11 Chemický vzorec PCL, kde n je počet kaprolaktonových jednotek (Mark 2009).....</i>	<i>24</i>
<i>Obrázek 12 Struktura (S)-Alaptidu (Rádl et al. 1990).....</i>	<i>24</i>
<i>Obrázek 13 Schematické znázornění metody sorpce nanovláknenného materiálu</i>	<i>27</i>
<i>Obrázek 14 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu - 4 snímky v řádce s různým zvětšením pro každý vzorek (první dva v řadě pro lic stranu a poslední dva pro rub stranu): a) čisté PCL vlákna; b) PCL vlákna s přidávkem 2 hm. % antibakteriální látky; c) PCL vlákna s přidávkem 5 hm. % antibakteriální látky; d) PCL vlákna s přidávkem 10 hm. % antibakteriální látky. Měřitko ukazuje 50 μm pro 1000x zvětšení a 10 μm pro 5000x zvětšení.</i>	<i>29</i>
<i>Obrázek 15 Boxplot rozložení distribuci průměru vláken pro nanovláknena PCL s různým přidávkem antibakteriální látky před experimentem; * označuje statisticky významné rozdíly mezi boxploty.</i>	<i>31</i>
<i>Obrázek 16 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu - 2 snímky v řádce s různým zvětšením pro každý vzorek: a) čisté PCL vlákna; b) PCL vlákna s přidávkem 1 hm. % alaptidu; c) PCL vlákna s přidávkem 1,5 hm. % alaptidu; d) PCL vlákna s přidávkem 2,5 hm. % alaptidu.</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 17 Boxplot rozložení distribuci průměru vláken pro nanovláknena PCL s různým přidávkem alaptidu; * označuje statisticky významné rozdíly mezi boxploty.....</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 18 Graf absorpance vzorků v závislosti na čase</i>	<i>35</i>
<i>Obrázek 19 Graf kinetiky uvolňování alaptidu v závislosti na čase.....</i>	<i>36</i>
<i>Obrázek 20 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu - 2 snímky v řádce s různým zvětšením pro každý vzorek: a) čisté PCL vlákna; b) PCL vlákna s přidávkem 2 hm. % antibakteriální látky; c) PCL vlákna s přidávkem 5 hm. % antibakteriální látky;</i>	

<i>d) PCL vlákna s přidávkem 10 hm. % antibakteriální látky. Měřitko ukazuje 50 μm pro 1000x zvětšení a 10 μm pro 5000x zvětšení.</i>	38
<i>Obrázek 21 Závislost kvadrátu hmotnosti na čase pro vzorky s různým množstvím inkorporované antibakteriální látky (celý experiment)</i>	39
<i>Obrázek 22 Závislost kvadrátu hmotnosti na čase pro vzorky s různým množstvím inkorporované antibakteriální látky včetně směrodatných odchylek (první 6 bodu)</i>	39
<i>Obrázek 23 Rozložení velikosti částic alaptidu podle intenzity signálu</i>	40
<i>Obrázek 24 Autokorelační křivka pro měření velikosti částic alaptidu.....</i>	41
<i>Obrázek 25 Rozložení velikosti částic antibakteriální látky podle intenzity signálu.....</i>	41
<i>Obrázek 26 Autokorelační křivka pro měření velikosti částic antibakteriální látky</i>	42

Seznám tabulek

<i>Tabulka 4 Statistické hodnoty průměrů vláken pro lícovou část vzorků s přidávkem antibakteriální látky. Celkem pro každý vzorek bylo naměřeno 200 hodnot.....</i>	30
<i>Tabulka 5 Statistické hodnoty průměrů vláken pro rubovou část vzorků s přidávkem antibakteriální látky. Celkem pro každý vzorek bylo naměřeno 100 hodnot.....</i>	30
<i>Tabulka 6 Statistické hodnoty průměrů vláken pro vzorky s přidávkem alaptidu. Celkem pro každý vzorek bylo naměřeno 100 hodnot.....</i>	33
<i>Tabulka 4 Hodnoty směrnice přímky pro vzorky s různým přidávkem antibakteriální látky.....</i>	39