

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Zuzana Hampejsová

Polymerní nanovláknenné nosiče pro lokální aplikaci hydrofobních léčiv -
studium profilu uvolňování léčiv pomocí HPLC

Polymeric nanofibrous carriers for local application of hydrophobic drugs -
studying of the drug release profiles by HPLC

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Školitel-konzultant: RNDr. Jakub Širc, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.9.2018

Podpis

Tato disertační práce byla podporována projekty Grantové agentury Univerzity Karlovy – GA UK č. 307115 a SVV a Grantové agentury České republiky – GAČR 16-04863S.

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za skvělou spolupráci, všestrannou pomoc, ochotu, trpělivost a zejména za její lidský přístup během vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli-konzultantovi RNDr. Jakobovi Šircovi, Ph.D. a Ing. Radce Hobzové Ph.D. za poskytnutí vzorků nanomateriálů, cenné rady a pomoc. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat pracovníkům Katedry analytické chemie za vytvoření příjemného prostředí. Také bych zde ráda poděkovala mojí rodině a mým skvělým kamarádům, kteří mi vždycky byli oporou při všech útrapách i radostech doktorského studia. Nakonec bych chtěla moc poděkovat mému milovanému panu Václavovi za vše, co pro mě dělá.

Dizertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2014 – 2018 během mého postgraduálního studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.
Konzultant: RNDr. Jakub Širc, Ph.D.

Klíčová slova:

mikro/nanovlákná, cyklosporin A, paklitaxel, polyethylenglykol, polylaktid, HPLC-UV, MS/MS, hydrogely

SEZNAM PUBLIKACÍ A PROHLÁŠENÍ O SPOLUAUTORSTVÍ

Prohlašuji, že se Mgr. Zuzana Hampejsová podílela na níže uvedených publikacích měrou, uvedenou v závorkách:

- [1] Hřib, J.; Širc, J.; Hobzová, R.; Hampejsová, Z.; Bosáková, Z.; Munzarová, M.; Michálek, J.: Nanofibers for drug delivery – incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure. *Belstein Journal of Nanotechnology*, **6**, 1939–1945 (2015). (15 %)
- [2] Širc, J.; Hampejsová, Z.; Trnovská, J.; Kozlík, P.; Hřib, J.; Hobzová R.; Zajícová, A.; Holáň, V.; Bosáková, Z.: Cyclosporine A Loaded Electrospun Poly(D,L-Lactic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Nanofibers: Drug Carriers Utilizable in Local Immunosuppression. *Pharmaceutical Research*, **34**, 7, 1391-1401, (2017). (80 %)
- [3] Hobzová, R.; Hampejsová Z.; Plch, J.; Hraběta, J.; Venclíková, K.; Jedelská J.; Bakowsky, U.; Bosáková, Z.; Lhotka, M.; Steinhart, M.; Kovářová J.; Michálek, J.; Širc, J.: Poly(D,L-lactide)/poly(ethyleneglycol) fibrous mats as paclitaxel-eluting carriers: Preparation and characterization of fibers, *in vitro* drug release and antiangiogenic activity, v recenzním řízení časopisu *Materials Science and Engineering C* (2018). (40 %)
- [4] Plch, J.; Venclíková, K.; Janoušková, O.; Hraběta, J.; Eckschlager, T.; Kopečková, K.; Hampejsová, Z.; Bosáková, Z.; Širc, J.; Hobzová R.: Paclitaxel-Loaded Polylactide/Polyethylene Glycol Fibers with Long-Term Antitumor Activity as a Potential Drug Carrier for Local Chemotherapy, *Macromolecular Bioscience*, **18**, 6, (2018). (20 %)

.....
Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

.....
RNDr. Jakub Širc, Ph.D.

.....
Ing. Radka Hobzová, Ph.D.

DALŠÍ VÝSTUPY

Postery

Zuzana Hampejsová, Zuzana Bosáková, Jakub Širc, Jana Trnovská, Petr Kozlík:

Release kinetics of cyclosporine A from biocompatible nanofibers with poly(ethylene glycol) additive studied by HPLC-MS/MS,

Euroanalysis 2015, Bordeaux, Francie (6. -10. 9. 2015)

Zuzana Hampejsová, Zuzana Bosáková, Jakub Širc, Petr Kozlík:

Controlled cyclosporine A release from poly(D,L-lactic acid) nanofibers with poly(ethylene glycol) of various molecular weight studied by HPLC-MS/MS,

International Symposium on Chromatography 2016, Cork, Irsko (28. 8. - 1. 9. 2016)

Zuzana Hampejsová, Zuzana Bosáková, Jakub Širc, Radka Hobzová:

Release kinetics of hydrophobic drugs from poly(D,L-lactic acid)/poly(ethylene glycol) nanofibers studied by HPLC

24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques
Sopoty, Polsko (10. - 13. 9. 2017)

Zuzana Bosáková, Zuzana Hampejsová, Radka Hobzová, Jakub Širc:

Release Kinetics of Hydrophobic Drug Paclitaxel from Poly(D,L-Lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Nanofibers into Hydrogel Based on 2-Hydroxyethyl Methacrylate Studied by HPLC

32nd International Symposium on Chromatography, Cannes-Mandelieu, Francie, (23. - 27. 9. 2018)

Granty

Zuzana Hampejsová, Zuzana Bosáková, Martina Havlíková, Jakub Širc:

Příprava a charakterizace biokompatibilních nanovláken s inkorporovaným imunosupresivem cyklosporinem A a studium kinetiky jeho uvolňování do různých médií pomocí metod HPLC/UPLC-MS/MS

Projekt Grantové agentury Univerzity Karlovy – GA UK č. 307115 (2015 - 2017).

Abstrakt

Imunosupresiva a cytostatika jsou léčiva s velmi silnými nežádoucími účinky, projevujícími se v závislosti na jejich celkovém podaném množství. Vhodná lokální aplikace těchto léčiv umožňuje významné snížení celkové dávky léčiva při současném zvýšení jeho lokální koncentrace a prodloužení doby působení. Jedním z možných způsobů lokální aplikace léčiv je použití polymerních vláknenných nosičů. Na polylaktidových (PLA) mikro/nanovlákních obsahujících hydrofobní léčiva (imunosupresivum cyklosporin A a cytostatikum paklitaxel) byla studována možnost jejich využití pro medicínální účely. Do vláken byly během přípravy inkorporovány amfifilní molekuly polyethylenglykolu (PEG) o různých molekulových hmotnostech (6, 20 a 35 kDa) ke zvýšení kompatibility systému PLA-léčivo a ovlivnění rychlosti uvolňování hydrofobních léčiv do vodného prostředí. Pro systematický vývoj těchto materiálů je důležité popsat souvislosti přípravy nanovláken, jejich morfologie a profilu uvolňování léčiv. Pro sledování kinetiky uvolňování léčiv do různých prostředí simulujících prostředí lidského těla (fosfátový pufr, hydrogel) byly vypracovány, optimalizovány a validovány analytické HPLC metody s tandemovou hmotnostní nebo UV detekcí. Pomocí těchto metodik byl studován vliv složení vláken a podmínek okolního prostředí na profil uvolňování léčiv. Přidáním PEG do nanovláken došlo k významnému nárůstu uvolněného množství léčiv a k prodloužení doby uvolňování v porovnání s nanovláknem neobsahujícím PEG. Byl také pozorován násobný nárůst uvolněného léčiva do hydrogelů v porovnání s uvolňováním do vodných médií. PLA-PEG nanovláknem by tak mohla být použita jako účinné nosiče pro potlačení lokální zánětlivé reakce, odpovědi imunitního systému a pro lokální léčbu recidivujících nádorů.

Abstract

Immunosuppressive and cytostatic drugs have many serious side effects which are dose dependent. Local application of drugs prolongs and increases the concentration of drug in the target place and, therefore, may reduce their serious side effects. Polymeric fiber carrier could be used as drug delivery system for local application. Polylactide (PLA) micro/nanofibers containing hydrophobic drugs (immunosuppressive drug cyclosporine A and cytostatic drug paclitaxel) were prepared to study this potential medicinal application. Poly(ethylene)glycols (PEG) of various molecular weight (6, 20 and 35 kDa) were incorporated to the structure of fibers to improve compatibility of PLA-drug system and influence the release profiles of hydrophobic drugs. For the systematic development of these materials, it is important to describe the context of the preparation of nanofibers, their morphology and drug release profiles. Therefore, HPLC methods with tandem mass spectrometric or UV detection were optimized and validated to determine the influence of composition of nanofibers on release kinetics of drugs to different medium (phosphate buffer, hydrogels). The nanofibers with added PEG released significantly higher amounts of drugs and prolonged the release time, compared to the fibers containing only drugs. A multiple increase in the release of the drug into hydrogels compared with release into aqueous media was also observed. Therefore, PLA-PEG nanofibers can serve as an effective scaffold for the local suppression of inflammatory reaction or immune response or for local recurrence therapy.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	12
2	ÚVOD	13
3	CÍLE PRÁCE	14
4	NANOVLÁKENNÉ MATERIÁLY	15
4.1	NANOVLÁKNA A JEJICH VLASTNOSTI	15
4.2	METODY PŘÍPRAVY NANOVLÁKEN	15
4.2.1	<i>Dloužením (drawing)</i>	15
4.2.2	<i>Podložkovou syntézou (template synthesis)</i>	15
4.2.3	<i>Fázovou separací (phase separation)</i>	16
4.2.4	<i>Samo-organizováním (self-assembling)</i>	16
4.2.5	<i>Foukáním taveniny (meltblowing)</i>	16
4.2.6	<i>Elektrostatickým zvlákňováním (electrospinning)</i>	17
4.2.6.1	Princip přípravy nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování	17
4.2.6.2	Modifikace elektrospinningu	18
4.2.6.3	Bezjehlový elektrospinning	19
4.2.6.4	Parametry zvlákňování	20
5	CHARAKTERIZACE NANOVLÁKEN	22
5.1	CHARAKTERIZACE MORFOLOGIE VLÁKEN	22
5.2	CHEMICKÁ CHARAKTERIZACE VLÁKEN	24
6	MATERIÁLY POUŽÍVANÉ K PŘÍPRAVĚ NANOVLÁKEN	24
6.1	PŘÍRODNÍ POLYMERY	24
6.2	SYNETICKÉ POLYMERY	25
6.2.1	<i>Polylaktid</i>	26
6.3	POUŽITÍ NANOVLÁKEN V MEDICINÁLNÍCH APLIKACÍCH	27
6.3.1	<i>Krytí a hojení ran</i>	27
6.3.2	<i>Nosiče vhodné pro tkáňové inženýrství</i>	29
6.3.3	<i>Lokální aplikace léčiv</i>	30
7	INKORPOROVANÁ LÉČIVA, STUDOVANÁ V TÉTO PRÁCI	33
7.1	CYKLOSPORIN A	33
7.2	PAKLITAXEL	36
8	VLIV PŘÍDAVKU POLYETHYLENGLYKOLU NA KINETIKU UVOLŇOVÁNÍ LÉČIV	38

9	HPLC A JEJÍ VYUŽITÍ PRO DETEKCI HYDROFOBNIČ LČIV	40
9.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	40
9.2	DETEKČNÍ SYSTÉMY	41
9.2.1	<i>Spektrofotometrické detektory</i>	41
9.2.2	<i>Hmotnostní detektory</i>	41
9.3	STANOVENÍ CSA	43
9.4	STANOVENÍ PTX	45
10	KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM	46
10.1	NANOVLÁKENNÉ NOSIČE PRO LOKÁLNÍ APLIKACI LČIV – INKORPORACE A UVOLŇOVÁNÍ MODELOVÝCH MOLEKUL, VLV JEJICH MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI A DRUHU POLYMERU (PUBLIKACE 1)	46
10.2	CsA/PLA/PEG NANOVLÁKNA S INKORPOROVANÝM LČIVEM SLOUŽÍCÍ K LOKÁLNÍ IMUNOSUPRESI (PUBLIKACE 2)	49
10.3	PLA/PEG VLÁKENNÉ MATERIÁLY JAKO NOSIČE UVOLŇUJÍCÍ PTX, PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE VLÁKEN, UVOLŇOVÁNÍ LČIVA <i>IN VITRO</i> A JEHO ANTIANGIOGENNÍ AKTIVITA (PUBLIKACE 3)	55
10.4	PTX/PLA/PEG VLÁKNA S DLOUHODOBOU PROTINÁDOROVOU AKTIVITOU JAKO POTENCIÁLNÍ NOSIČ LČU PRO LOKÁLNÍ CHEMOTERAPII (PUBLIKACE 4)	61
10.5	PILOTNÍ STUDIE UVOLŇOVÁNÍ HYDROFOBNIČO LČIVA PTX DO 2-HYDROXYETHYLMETHAKRYLÁTOVÝCH HYDROGELŮ	65
10.5.1	<i>Materiály</i>	65
10.5.2	<i>Stanovení celkového množství PTX v terčích</i>	65
10.5.3	<i>Příprava hydrogelů a stanovení množství vody v rovnovážně zbotnaném stavu</i>	66
10.5.4	<i>Měření uvolňování PTX do hydrogelů</i>	67
11	ZÁVĚR	70
12	CITACE	71
13	PUBLIKACE	88
13.1	PUBLIKACE 1	88
13.2	PUBLIKACE 2	96
13.3	PUBLIKACE 3	108
13.4	PUBLIKACE 4	131

1 Seznam zkratek a symbolů

<i>a</i>	Plocha terčíků
CAM	Chorioallantoická membrána
CsA	Cyklosporin A
ESI	Ionizace elektrosprejem
hmot. %	Hmotnostní procento
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IL-2	Interleukin 2
<i>m</i>	Množství léčiva
MALDI	Desorpce laserem za účasti matrice
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>m/z</i>	Hmota/náboj
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Polykaprolakton
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Polyglykolid
PLA	Polylaktid
PLGA	Poly(laktid- <i>co</i> -glykolid)
PVA	Polyvinylalkohol
PTX	Paklitaxel
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
UHPLC	Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
<i>v</i>	Rychlost uvolňování
<i>t</i>	Doba analýzy

2 Úvod

V době, kdy je možné provádět transplantace orgánů či ovlivnit vývoj rakoviny, se neustále hledají účinnější a šetrnější aplikace léčiv. Jednou z možností je použití nanovláken jakožto polymerních nanovláčkových nosičů sloužících k uvolňování léčiv. Množství a intenzita vedlejších účinků cytostatických či imunosupresivních léčiv je závislá na jejich celkové podané dávce. Lokální aplikace nanovláčkových materiálů by působením přímo v místě účinku mohla nejenom snížit celkovou dávku léčiva, tedy snížit množství vedlejších účinků, ale také zvýšit jeho lokální koncentraci a dobu jeho působení v cílové tkáni. Některé nanovláčkové materiály se již v klinické praxi užívají jako terapie u rakoviny pevných nádorů, a proto je uvolňování léčiv z nanovláčken vnímáno jako oblast výzkumu s velmi vysokým potenciálem.

Pro vývoj úspěšného nanovláčkového materiálu s inkorporovaným léčivem je však nutné sledovat řadu parametrů ovlivňujících profil uvolňování léčiva jako je např. jejich morfologie, druh použitého polymeru nebo případných aditiv přidaných do zvláčňovací směsi.

Uvolňování léčiva ve fyziologickém prostředí lidského těla je velmi komplexní jev, který je ovlivněn řadou faktorů, jako jsou rozpustnost léčiva, iontová síla, konvekce tekutiny v okolí, sorpce léčiva na proteiny krevní plasmy a mnoho dalších. Vzhledem k této komplexnosti se na vývoji takovýchto projektů podílí řada pracovišť nejenom biologických či medicínálních, které testují vlákna na živých organismech, ale také analytických. Většina biologických experimentů je totiž velmi specifická, proto pro exaktní pochopení procesů, majících vliv na uvolňování léčiv z nanovláčkových materiálů, je třeba analytického stanovení množství či profilu uvolňování léčiva.

3 Cíle práce

Disertační práce si klade za cíl přispět k poznání vlivu složení nanovláken s inkorporovanými hydrofobními léčivy na profil uvolňování těchto léčiv, a tím na možnost jejich použití při lokálních aplikacích.

Hlavní cíle disertační práce jsou:

- 1) Výběr vhodného biokompatibilního polymeru a aditiv pro přípravu nanovláken s ohledem na inkorporaci léčiv, vlastní příprava a charakterizace nanovláken, které by bylo možné využít pro lokální imunosupresi či onkologickou terapii.
- 2) Vývoj, optimalizace a validace analytických HPLC metod s tandemovou hmotnostní nebo UV detekcí, vhodných pro sledování profilu uvolňování léčiv v různých kapalných mediích, vybraných tak, aby alespoň částečně simulovaly reálné prostředí lidského organismu.
- 3) Studium vlivu přídavku polyethylenglykolu (PEG) do struktury polylaktidových (PLA) vláken na profil uvolňování hydrofobních léčiv cyklosporinu A (CsA) a paklitaxelu (PTX) v různých prostředích.
- 4) Sledování vlivu PEG na profil uvolňování PTX do hydrogelu simulujícího reálnou tkáň, vlastní příprava hydrogelu, jeho charakterizace a uspořádání experimentu uvolňování léčiva z nanovláčenného nosiče.

4 Nanovláknenné materiály

4.1 Nanovláknna a jejich vlastnosti

Polymerní nanovláknna jsou materiály s velmi specifickou strukturou, díky níž jsou v současné době v centru pozornosti mnoha biomedicínálních aplikací. Jejich struktura je charakteristická velkou porozitou, tvořenou relativně malými póry, které při biomedicínálních aplikacích nejen brání přístupu bakterií a nečistot z vnějšího prostředí, ale také umožňují transport malých molekul, např. kyslíku, vody a metabolitů do buněk. Velmi výhodným se tedy jeví použití nanovláken jako obvazových materiálů [1, 2]. Biokompatibilní nanovláknna mohou být dále použita jako nosiče pro kultivace různých buněčných struktur [3], nosiče při lokálních aplikacích antibiotik [4], růstových faktorů [5], anestetik [6] či při imobilizaci enzymů [7].

4.2 Metody přípravy nanovláken

Nanovláknna lze připravit následujícími způsoby:

4.2.1 Dloužením (drawing)

Jedná se o proces přípravy, díky kterému je možné produkovat jednotlivá velmi dlouhá vlákna. Principem metody je přiložení kapiláry s průměrem několika mikrometrů k povrchu kapky roztoku či taveniny polymeru. Jejím následným odtážením vzniká mezi ústím kapiláry a kapkou vlákno, které při vhodných parametrech kapaliny může dosáhnout submikronových tloušťek. Problémem této metody je její nízká univerzálnost a reprodukovatelnost tloušťky připravovaných vláken. Lze totiž použít jen zcela viskoelastický materiál, který je schopen překonat silnou deformaci a zároveň musí být materiál dostatečně soudržný, aby nedošlo k přerušení vlákna [8, 9].

4.2.2 Podložkovou syntézou (template syntesis)

Podložková syntéza je metoda využívající k tvorbě nanovláken vzorovací membrány z různých materiálů, např. kovů, polovodičů, uhlíku či elektricky vodivých polymerů s nanorozměrnými póry. Skrze membránu je protlačován kapalný roztok polymeru do srážecí lázně. Metoda má výbornou reprodukovatelnost vlastností materiálů, ale nelze jejím prostřednictvím produkovat jednotlivá nanovláknna [10-12].

4.2.3 Fázovou separací (phase separation)

Tato metoda je složena z několika kroků. Prvním krokem je rozpouštění polymeru v rozpouštědle, druhým krokem je jeho gelace a následně dochází k samotné fázové separaci. Při té je postupnou extrakcí za použití různých rozpouštědel odstraněno původní rozpouštědlo ze struktury gelu a je nahrazeno novým rozpouštědlem odlišných vlastností (např. dvojice voda a tetrahydrofuran), díky kterému vzniká nanorozměrná pórovitá pěna. Následuje ochlazení materiálu na teplotu tuhnutí druhého rozpouštědla a jeho odstranění sublimací za sníženého tlaku. Průměry vláken bývají 50 - 500 nanometrů a délka v řádu mikrometrů. Nevýhodou procesu je časová náročnost převodu pevného polymeru do porézní pěny [13-15].

4.2.4 Samo-organizováním (self-assembling)

Principem samo-organizování je proces, při kterém se jednotlivé prvotní složky nanovláken organizují do požadovaných vzorů a funkcí. Různou chemickou strukturou prvotních složek je dán způsob organizování. Jedním z příkladů může být tvorba hydrogelů obsahujících dvě navzájem propojené fáze, kde pevnou fází tvoří nanovláčená síť a kapalnou fází je voda. Zpracování kontinuálních polymerních vláken je stejně časově náročné jako fázová separace. Zpravidla se tato metoda používá pro zpracování peptidů např. v kombinaci s amfifilními látkami [16].

4.2.5 Foukáním taveniny (meltblowing)

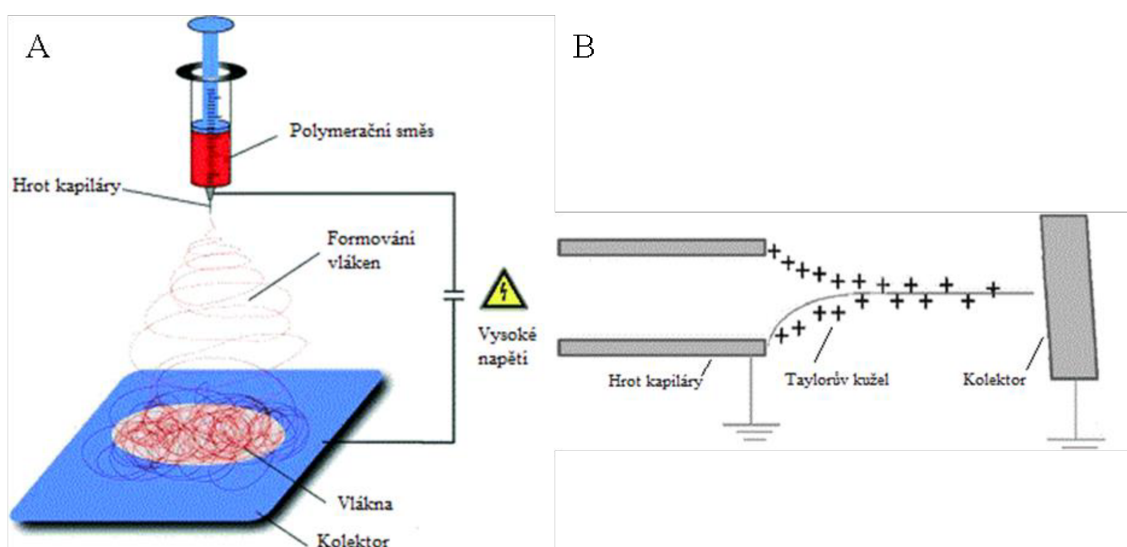
Základem přípravy vláken je protlačení taveniny polymeru tryskou s mnoha otvory, ke kterým je současně přiváděn ohřátý stlačený vzduch. Po vytlačení je tavenina unášena a dloužena ohřátým vzduchem proudícím vysokou rychlostí. Vlastnosti vláken závisí na konstrukčních parametrech zařízení (tvar a rozmístění trysek), na vlastnostech polymerní taveniny (teplota tání, index toku) a na parametrech proudícího vzduchu (charakter proudění, teplotní gradient). Tato metoda obecně slouží k výrobě mikrovláken; zvolením vhodných podmínek však lze dosáhnout i vytvoření nanovláken. Nespornou výhodou je možnost efektivního zpracování polymerů z taveniny, např. polyethylenu či polyurethanu [17].

4.2.6 Elektrostatickým zvlákňováním (elektrospinning)

Jedná se o techniku přípravy vláken malých průměrů z polymerního roztoku nebo polymerní taveniny pomocí elektrostatických sil. V porovnání s ostatními způsoby přípravy je možné tento způsob výroby použít k výrobě jednotlivých kontinuálních nanovláken, navíc u některých technik s výrazně vyšší produktivitou, tak aby bylo možné je využít v reálné praxi. Běžně se k přípravě nanovláken používá tzv. jehlový elektrospinning [18] a jeho modifikace bezjehlový elektrospinning, jehož prostřednictvím lze na rozdíl od ostatních zvlákňovacích metod vyrábět nanovláknenné textilie o ploše až několika metrů čtverečních [19].

4.2.6.1 Princip přípravy nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování

Nejrozšířenější metodou přípravy nanovláken je dnes elektrostatické zvlákňování (elektrospinning). Tato metoda využívá elektrostatických sil k výrobě polymerních vláken o malém průměru (od desítek nanometrů až po několik mikrometrů).

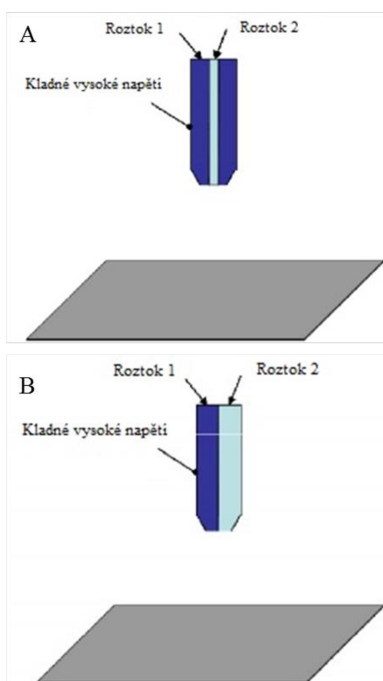


Obr. 1 Schématický diagram elektrospinningového přístroje ve vertikálním uspořádání (A); převzato a upraveno [18]. Taylorův kužel (B); převzato a upraveno [20].

Elektrospinningový přístroj je složen ze tří hlavních částí: elektrody vysokého napětí, zvlákňovací trysky a elektrody opačného náboje (kolektoru) (obr. 1A). Elektroda vysokého napětí je spojena přímo s polymerním roztokem a zvlákňovací tryskou, která končí kapilárou. V důsledku elektrického pole mezi špičkou kapiláry zvlákňovací trysky a kolektorem je na povrchu kapaliny polymerního roztoku indukován elektrický náboj. Vzájemná odpudivost nábojů a stažení povrchových nábojů k opačné elektrodě vytváří

sílu vektorově opačnou k povrchovému napětí. Jak intenzita elektrického pole vzrůstá, hemisférický povrch kapaliny ve špičce kapiláry se prodlužuje, až tvoří kuželovitý tvar (tzv. Taylorův kužel). Pokud elektrické pole dosáhne kritické hodnoty, při které odpudivá elektrostatická síla překoná povrchové napětí, na špičce Taylorova kuželu se vytváří nabitý proud kapaliny (obr. 1B). Proud polymerního roztoku se ztenčuje a zrychluje v elektrickém poli ve směru elektrody opačného náboje (kolektoru), kde se usazuje na nosnou textilií. Během tohoto procesu dochází k odpaření rozpouštědla a ke vzniku polymerního vlákna. Vzniká tak nanovláknenná netkaná textilie [18, 21].

4.2.6.2 Modifikace elektrospinningu



Obr. 2 Schéma použití jehel u koaxiálního (A) a side-by-side elektrospinningu (B); převzato a upraveno z [22].

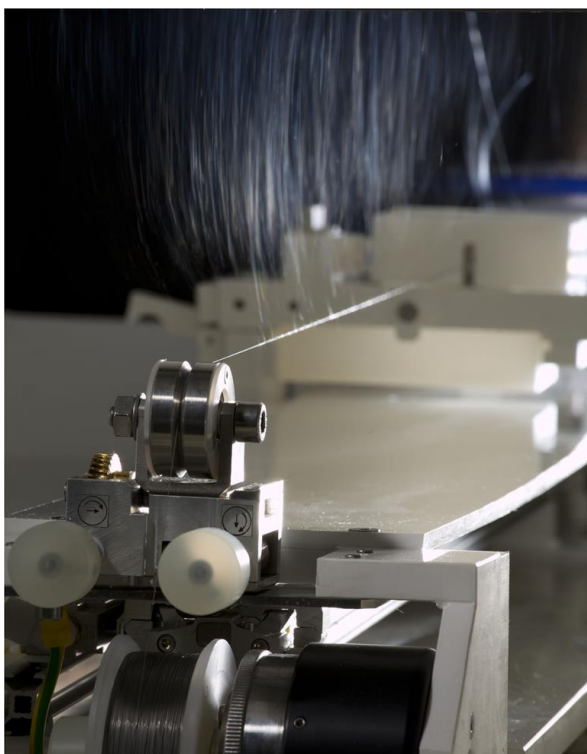
Existuje mnoho modifikací klasického elektrospinningu. Jedním z příkladů je koaxiální elektrospinning [22, 23], umožňující výrobu nanovláken s jiným složením polymeru uvnitř a na povrchu vlákna. Za použití dvou jehel (vnitřní a vnější) dochází k výrobě nanovláken s rozdílným složením uvnitř nanovlákn a na jeho povrchu. Do vnitřní jehly je umístěn jeden druh polymerního roztok a do vnější jehly druhý. Tento způsob poté umožňuje tvorbu tzv. core-shell vláken (obr. 2A).

Dalším typem je tzv. side-by-side elektrospinning (obr. 2B), který umožňuje tvorbu dvojitých až půlených vláken ze dvou různých polymerů [24]. Při jejich tvorbě je využíváno jehly, která je rozpůlena přepážkou umožňující oddělený přívod dvou roztoků. Na špičce jehly se roztoky potkávají a správnou volbou roztoků nedojde k jejich mísení, ale ke vzniku půleného vlákna

[25]. Další modifikací je tzv. bezjehlový elektrospinning, u něž jsou nanovláknna formována přímo z povrchu roztoku či taveniny polymeru bez použití trysky [19].

4.2.6.3 Bezjehlový elektrospinning

Principem této metody je tzv. bezjehlové zvlákňování z povrchu roztoku či taveniny. Na otáčející se kladné elektrodě ve tvaru válce, částečně ponořené do roztoku polymeru, zůstává tenká vrstva zvlákňované směsi, ze které se vlivem elektrostatického pole (desítky kV) formují desítky až stovky nanovláken. Nanovlákná se ukládají na nosnou textilií, která se posouvá před elektrodou opačné polaroty, umístěné



Obr. 3 Bezjehlový elektrospinning s jednostrunnou elektrodou, Elmarco Std.

ve vzdálenosti několika centimetrů. Rychlostí posuvu se reguluje tloušťka nanovláknenné vrstvy. Intenzitou elektrického pole, vzdáleností elektrod, teplotou, složením a fyzikálně-chemickými vlastnostmi zvlákňovací směsi lze ovlivnit i další parametry vyráběných nanovláken [26]. Poměrně velký povrch válce na jednu stranu umožňuje tvorbu mnoha desítek vláken najednou, na stranu druhou však snižuje sílu elektrostatického pole a umožňuje částečné vypařování rozpouštědla. Změna koncentrace polymeru v roztoku snižuje reprodukovatelnost výroby. Navíc je v tomto uspořádání nutné relativně velké množství roztoku

polymeru. Slabou intenzitu elektrického pole lze částečně vykompenzovat použitím upravené elektrody složené z natažených paralelních strun či bodových nebo lopatkových tvarů. Zavedení takového typu elektrod ovšem stále neumožňuje efektivní zvlákňování většiny druhů roztoků. Proto byl vyvinut nový druh tzv. jednostrunné elektrody (obr. 3), která je stabilní rychlostí pokrývána roztokem v posuvném pojezdu a řeší problém odpařování rozpouštědel [19].

Hlavní výhodou beztryskového elektrospinningu oproti ostatním výrobním metodám je produkce dostatečného množství nanovláken. Laboratorní přístroje jsou

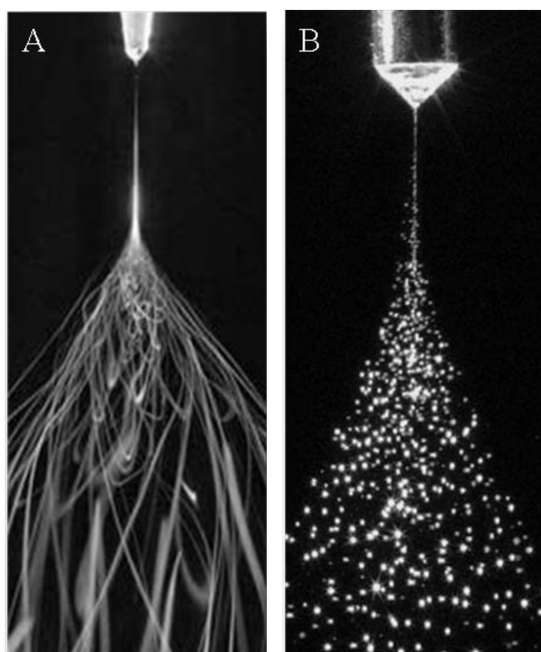
schopny produkovat nanovláknenné textilie o rozměrech A4, průmyslová výroba umožňuje vyrábět role až o šíři 1,6 m.

4.2.6.4 Parametry zvlákňování

Nespornou výhodou elektrostatického zvlákňování jsou jeho podmínky tj. použití za laboratorní teploty a atmosférického tlaku. Dále, na rozdíl od ostatních metod přípravy nanovláken, elektrosinning umožňuje různým nastavením parametrů regulovat morfologii vyrobených vláken, jejich průřez, hustotu či vnitřní strukturu samotných vláken [27-29]. Parametry určující zvlákňovací proces je možné rozdělit na tři typy:

4.2.6.4.1 Parametry roztoku

Koncentrace nanovláknenné směsi je jedním z důležitých parametrů ovlivňujících zvlákňování. Při příliš nízkých koncentracích polymerů ve zvlákňovací směsi může



Obr. 4 Elektrosinning (A) a electrospraying (B); převzato a upraveno [31].

docházet ke dvěma situacím. Prostřednictvím elektrosinningu se buď formují vlákna s malým průměrem, v jejichž struktuře můžeme pozorovat tzv. protažené kapky, perličky (beads) (obr. 4A), nebo nedochází k formování vláken vůbec (electrospraying) (obr. 4B), kdy vznikají pouze kapičky směsi a nikoliv vlákna. [30]. Naopak při příliš vysoké koncentraci dochází v nanovláknenné struktuře k nehomogenitám a vzniku silnějších vláken [31].

Dalším parametrem ovlivňujícím zvlákňování je viskozita. Ta ovlivňuje iniciační tvar kapičky, proudovou trajektorii zvlákňování a následně průměr vláken. Je-li příliš nízká, kapalinový proud se rozbije do kapiček následkem elektrostatického napětí a opět dochází k electrosprayingu. Naopak při použití příliš viskózní kapaliny nedochází k tvorbě Taylorova kužele. Při kombinaci příliš vysoké koncentrace a viskozity dochází k nárůstu průměru vláken [18, 32].

Dalším parametrem zvlákňování je molekulová hmotnost polymeru, která má vliv na viskozitu rozpouštědla a často na výslednou krystalinitu nanovláken. Bylo pozorováno, že při použití příliš nízké molekulové hmotnosti polymeru dochází k tvorbě perliček více než u polymerů s vyšší molekulovou hmotností [33].

Vodivost roztoku je dána typem polymeru, rozpouštědla a případně přídavkem solí či tenzidů. Obecně se se zvyšující vodivostí snižuje průměr vláken. Při příliš nízké vodivosti buď vlákna nelze tvořit vůbec, nebo je jejich průměr velký a objevují se u nich nehomogenity [27]. Naopak příliš vysoká hodnota vodivosti způsobí nestabilitu elektrického pole, která vede k nestabilitě průměru vláken [21].

Povrchové napětí souvisí především se složením rozpouštědla a je jen částečně závislé na koncentraci polymeru [34]. Obecně lze říci, že povrchové napětí určuje vrchní a spodní hranici tzv. elektrospinnového okna pokud jsou všechny ostatní parametry konstantní [35].

Parametrem ovlivňujícím průměr vláken je objemová hustota prošlého náboje, obecně závislá na vodivosti roztoku [36].

4.2.6.4.2 Parametry zvlákňovacího zařízení

Intenzita elektrického pole je zásadním parametrem při zvlákňování a je určena především aplikovaným napětím mezi zvlákňovací kapilárou a kolektorem. Napětí musí být dostatečné na to, aby elektrostatická síla překonala povrchové napětí roztoku a došlo ke vzniku Taylorova kužele a následně k vlastnímu zvlákňování. Použitím vyššího napětí dochází k prodlužování vláken, ke zmenšení jejich průměrů, ale také k tvorbě perliček. U jehlového elektrospinningu také může vzrůstat počet vláken vytržených z hrotu kapiláry [37, 38].

Důležitá je i vzdálenost mezi hrotem jehly a nejbližším bodem kolektoru. S rostoucí vzdáleností klesá intenzita elektrického pole. Pokud je vzdálenost kratší, zvýší se síla elektrického pole a může dojít k tvorbě perliček a ke zploštění vláken [27, 39]. Při delších vzdálenostech elektrod je síla elektrického pole zanedbatelná a vlákna se buď neukládají na kolektor, nebo se zakulacují. Vzdálenost jehly a kolektoru má také zásadní vliv na odpaření rozpouštědla, ve kterém jsou polymer a případné další látky rozpuštěny.

Průtok polymeru v kapiláře u jehlového elektrospinningu velice ovlivňuje rychlost proudění a rychlost přenosu materiálu. Se zvyšujícím se průtokem obecně vzrůstá průměr vláken a pórů mezi nimi. Příliš vysoký průtok vede ke vzniku nehomogenních vláken, protože nedochází k dostatečnému vysušení vláken (odpaření rozpouštědla) a v jejich struktuře mohou vznikat perličky [27, 40]. Průtok také musí být vždy dostatečně vysoký, aby docházelo k rovnoměrné distribuci vláken. Parametry vláken ovlivňuje také typ a rychlost posuvu kolektoru [41].

4.2.6.4.3 Parametry prostředí (teplota, vlhkost vzduchu)

Teplota a vlhkost vzduchu jsou nejvíce sledovanými parametry prostředí při zvlákňování. Zvýšením teploty dochází ke snížení viskozity roztoku a tedy k poklesu průměru nanovláken [42]. Rostoucí teplota prostředí také ovlivňuje rychlost odpařování rozpouštědla. Naopak příliš nízká teplota prostředí může způsobit, že elektrostatická síla nepřekoná povrchové napětí roztoku a nedojde tak k vlastnímu elektrospinningu.

Vlhkost vzduchu ovlivňuje vznik a velikost pórů v samotných nanovláčkách. Se zvyšující se vlhkostí dochází ke vzniku malých pórů a k jejich shlukování [43]. Naopak příliš nízká vlhkost může způsobit extrémně rychlé odpaření rozpouštědla ze zvlákňovací směsi a u jehlového elektrospinningu tak může dojít k ucpání kapiláry [44]. Se zvyšující se vlhkostí naopak dochází k pomalejšímu odpařování rozpouštědla, nanovláčka vznikají pomaleji a vytváří se tak vlákna s nižším průměrem [45]. Příliš vysoká vlhkost následně může způsobit i perličkové efekty [46].

5 Charakterizace nanovláken

5.1 Charakterizace morfologie vláken

K charakterizaci struktury vláken se nejvíce využívá mikroskopických technik. Pro měření tloušťky vláken, jejich orientaci a geometrii je nejčastěji používána skenovací elektronová mikroskopie (SEM), v ojedinělých případech transmisní mikroskopie (TEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM).

SEM je nejvíce využívanou technikou z důvodu relativně jednoduché přípravy vzorků a snadné interpretace získaných dat. Používá se pro stanovení průměru vláken a k určení jejich morfologie. Oproti tradičnímu optickému mikroskopu mají SEM obrázky velkou hloubku ostrosti a mnohem větší rozlišení. Tyto vlastnosti jsou dány

principem metody využívající úzkého elektronového paprsku, který se postupně pohybuje po povrchu vzorku a vytváří výsledný obraz postupným skenováním vzorku.

Podmínkou aplikace SEM je vodivost stanovovaného materiálu. Většina nanovlákných materiálů tak musí být pokryta vodivou vrstvou uhlíku, zlata nebo platiny. Nanášení této vrstvy probíhá metodou vakuového odpaření nebo iontového rozprašování. Nevýhodou SEM je, že vodivá vrstva může způsobovat snížení přesnosti měření u velmi tenkých vláken a také, že vlivem elektronového paprsku může dojít k poškození vláken o průměru < 200 nm. Především však nanášení vodivého povrchu vyžaduje důkladné vysušení vzorku, což může být spojeno se změnou jeho morfologie. U hydrofilních polymerů jsou tak sledována vlákna v jiném prostředí, než v jakém jsou použita (např. v *in vivo* prostředí při medicínálních či biologických aplikacích). Stejně tak může mít vlhkost vliv na porozitu nanovlákné textilie [47].

Velikost pórů nanovlákných materiálů je důležitým parametrem; u tkáňových kultur přímo ovlivňuje schopnost buněk infiltrovat materiál. Charakterizace pórů zahrnuje stanovení celkového objemu pórů, případně distribuci jejich velikostí. S omezenou vypovídací hodnotou lze pro tyto účely použít rtuťovou porozimetrii [48].

Dále je pro charakterizaci materiálu nutno určit porozitu samotných vláken, tedy distribuci šířek pórů, jejich objem a specifickou plochu nanovlákných textilií, tj. plochu vzorku vztaženou na jeho hmotnost. Ke stanovení těchto parametrů se nejvíce využívá BET (Brunauer, Emmet, Teller) metody, resp. adsorpce/desorpce dusíku [49]. Principem metody je adsorpce a následná desorpce molekul plynu z povrchu materiálu. Lze změřit množství plynu, které se adsorbuje za daných podmínek na povrchu vzorku. Jestliže je známo, jak velkou plochu zaujímá molekula plynu na adsorbovaném povrchu a množství plynu adsorbované na známém množství vzorku, lze vypočítat specifický povrch vzorku. Množství adsorbovaných molekul lze stanovit prostřednictvím adsorbční izotermy, která udává závislost objemu adsorbovaného plynu na tlaku za rovnovážné teploty [47].

5.2 Chemická charakterizace vláken

K charakterizaci molekulové struktury nanovláken se nejvíce využívá infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, nukleární magnetická rezonance a rentgenová difrakce. Pro určení tepelných vlastností nanomateriálů je nejčastěji používána diferenciální skenovací kalorimetrie. Princip této metody spočívá v měření množství tepla nutného k ohřátí (ochlazení) vzorku určitou definovanou změnou teploty. Tepelná změna vzorku je měřena proti referenčnímu materiálu. Z naměřených dat lze určit teplotu tání polymeru, jeho krystalinitu, skelné přechody, tepelné kapacity, teplotu degradace atd. [50].

6 Materiály používané k přípravě nanovláken

Prostřednictvím elektrospinningu je možné vyrábět nanovlákná z různých typů polymerů jak přírodních, tak syntetických. Tato vlákna je možné použít v mnoha oblastech (medicině, biochemii, ekologii). Přírodní materiály obecně vykazují velmi dobrou biologickou kompatibilitu a nízkou cytotoxicitu, zatímco výhodou syntetických polymerů je reprodukovatelnost jejich výroby, široké spektrum mechanických vlastností (pevnost, elasticita) a v některých případech rychlost jejich degradace.

6.1 Přírodní polymery

Mezi přírodní polymery, ze kterých jsou vlákna nejčastěji vyráběna, patří např. kolagen, želatina, chitosan a kyselina hyaluronová. Kolageny jsou nerozpustné bílkoviny tvořící pojivovou tkáň v chrupavkách, šlachách, kostech a kůži [51]. Mají důležitý vliv na jejich mechanické vlastnosti. K výrobě kolagenových nanovláken se nejčastěji používá vysoce těkavých fluorovaných alkoholů a vlákna z nich tvořená mají velký potenciál např. jako materiály pro hojení ran [52].

Želatina se připravuje z kolagenu denaturací teplem nebo bazickou či kyselou hydrolyzou. Při přípravě želatiny z kolagenu dochází k změně jejích vlastností, stává se rozpustnou v řadě běžných rozpouštědel, ale naopak ztrácí mechanické vlastnosti kolagenu. Běžně se želatina používá v medicíně zvláště kvůli své biodegradabilitě a biokompatibilitě [53]. Želatinová nanovlákná prokazují schopnost urychlit hojivý proces [54] a mohou sloužit jako podpůrný materiál pro přenos buněk [55]. Nanovlákná z fibroinu a želatiny jsou také vhodným nosičem pro růst fibroblastů [56].

Dalšími přírodními polymery, vhodnými pro tvorbu nanovláken, jsou chitin a jeho deacetylovaná forma chitosan. Chitosan a chitin jsou biokompatibilní, biodegradabilní polymery. Chitin je málo rozpustný a k jeho zvláknění se používají fluorované alkoholy nebo aceton [57]. Chitosan se často zvláknuje ve směsi s kyselinou octovou [58] a také se často používá ve směsi s mnoha syntetickými polymery, příkladem mohou být chitosano-polyethylenoxidová vlákna [59]. Chitosan i chitin mají vynikající potenciál jako materiály k hojení ran [60], jako obvazové materiály [61, 62] a vykazují antibakteriální a hemostatické účinky [63].

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid s mnoha důležitými biologickými vlastnostmi, jako je biokompatibilita, biodegradabilita, díky nimž je jedním z nejvíce využívaných přírodních polymerů v tkáňovém inženýrství [64]. Pro zvláknění se nejvíce užívá dimethylformamid s vodou [65] či vodnými roztoky hydroxidu sodného nebo amoniaku [66]. Kyselina hyaluronová díky svým vlastnostem může být použita pro hojení ran [67], jako nosič vhodný pro tkáňové inženýrství [68], k léčbě artrózy, k distribuci léků či může být součástí implantátů.

6.2 Syntetické polymery

Syntetické polymery mají oproti přírodním materiálům řadu výhod jako je reprodukovatelnost jejich výroby, široké spektrum mechanických vlastností (pevnost, elasticita) a v některých případech rychlost jejich degradace [69]. Mezi syntetické polymery patří např. polyglykolidy (PGA), polykaprolaktony (PCL), polyvinylalkoholy (PVA) a v neposlední řadě polylaktidy (PLA). Vzhledem k dobré biodegradabilitě byly tyto materiály již použity k výrobě obvazových materiálů [70], kostní tkáně [71], srdečních náhrad či náhražek krevních cév [72].

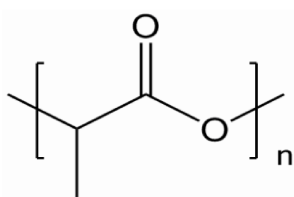
Polykaprolakton je semikrystalický, biodegradabilní polymer patřící po skupiny polyesterů. K jeho zvláknění se nejvíce užívá chloroform [71, 73] nebo směs tetrahydrofuranu s dimethylformamidem [55]. Bývá používán pro výrobu vláken sloužících pro krytí ran [55], tkáňové inženýrství [71] či jako nosič pro uvolňování léčiv [74]. Jeho užití je však limitováno jeho horšími mechanickými vlastnostmi a hydrofobním charakterem.

Polyglykolidy jsou netoxické, biokompatibilní, semikrystalické polyestery, degradovatelné již během několika týdnů. Právě tato biodegradabilita umožňuje jejich snadné použití v oblasti biomedicíny [75]. Jsou hojně užívány jako materiál v chirurgii

či jiných medicínských aplikacích. K jejich zvláknování se užívá zejména fluorovaných alkoholů [76] a jsou často používané k výrobě vláken pro krytí ran [77].

Dalším užívaným polymerem je ve vodě rozpustný polyvinylalkohol. Jeho vynikající chemická odolnost, fyzikální vlastnosti a úplná biologická rozložitelnost vedou k jeho širokému praktickému využití. K jeho rozpuštění pro přípravu zvláknovací směsi se užívá vodných roztoků [78]. Oblast jeho použití ve formě nanovláken je nejvíce v lokální aplikaci léčiv [79, 80], k výrobě materiálů pro krytí a hojení ran [81] nebo jako nosič pro kultivaci buněk kosterních tkání [82].

6.2.1 Polylaktid



Obr. 5 Struktura polylaktidu (PLA).

Jedním z velmi často užívaných syntetických polymerů pro výrobu vláken je polylaktid neboli polymléčná kyselina (obr. 5). PLA je termoplastický, alifatický polyester s velmi dobrými vlastnostmi jako

jsou jeho biokompatibilita, biodegradabilita, pevnost a v neposlední řadě komerční dostupnost. PLA obsahuje asymetrický alfa uhlík, díky kterému tvoří dvě krystalické D a L formy a amorfní racemickou D, L formu. Krystalinita PLA je dána z velké části poměrem použitých D a L forem [83].

Tyto formy a jejich poměry mají vliv také na degradovatelnost polymeru. K degradaci PLA dochází zejména hydrolyticky ve vodném prostředí a k tomuto štěpení dochází přednostně v amorfních oblastech struktury PLA, což vede ke zvýšení krystalinity polymeru [69]. K degradaci PLA také dochází prostřednictvím enzymatické degradace. Byl studován vliv různých serinových proteas, včetně proteinasy K, na degradaci a byla prokázána jejich schopnost degradovat PLA [84, 85]. Porovnání degradační aktivity proteinasy K a enzymové lipasy ukázalo, že proteinasa K má výraznější vliv na rychlost degradace PLA než lipasa [86, 87]. Dále bylo zjištěno, že na průběh degradace PLA má také vliv krystalinita a stereochemie PLA. Proteinasa K totiž selektivně degraduje L-laktidovou formu a přednostně také dochází k degradaci amorfní oblasti struktury PLA [88-90].

Strukturu PLA lze modifikovat prostřednictvím kopolymerace s jinými polymery, což umožňuje změnu krystalinity, teploty tání či rozpustnosti. Nejvýznamnějším produktem kopolymerace PLA je PLA-co-glykolid (PLGA), který vykazuje jiné

vlastnosti než samotný PLA či PGA. PLA je v tomto kopolyměru zastoupen zpravidla stejným množstvím své L a D formy [91].

PLA a jeho kopolymery jsou významnou skupinou látek, vhodných pro přípravu biokompatibilních a biodegradabilních materiálů [69, 83, 92]. Jejich vlákna vykazují dobré mechanické vlastnosti a zvýšenou odolnost k vnějšímu prostředí. Připravují se zejména prostřednictvím elektrostatického zvlákňování buď z taveniny [93], nebo z roztoku. PLA se obvykle zpracovává za pomoci čistého dichlormethanu, trichlormethanu ale i dalších rozpouštědel [94, 95].

PLA je díky svým vlastnostem vhodným materiálem k výrobě tělních implantátů, kostry pro neurální tkáň [95], krytí ran [96] a je také jedním z nejvíce využívaných materiálů pro inkorporaci a následné uvolňování léčiv z nanovláknenných materiálů [4, 97, 98].

6.3 Použití nanovláken v medicíně aplikacích

V medicíně aplikacích jsou nanovláknena používána zejména díky svým specifickým vlastnostem. Nejvýznamnější z nich je vysoká porozita, tvořená relativně malými póry, které při biomedicíně aplikacích nejenže brání přístupu bakterií a nečistot z vnějšího prostředí, ale také umožňují transport malých molekul, např. kyslíku, vody a metabolitů. Nanovláknena lze použít tedy jako obvazové materiály k hojení ran [1, 2], jako nosiče vhodné pro tkáňové inženýrství [99], nebo jako systém při lokálních aplikacích antibiotik [4], růstových faktorů [5], anestetik [6] či při imobilizaci enzymů [7].

6.3.1 Krytí a hojení ran

Ideální obvazy pro hojení ran musí mít určité vlastnosti, které jsou důležité pro správné a rychlé hojení. Musí být účinnou bakteriální bariérou, být hemostatické, dále by měly být schopny přizpůsobit se obrysu rány, absorbovat uvolňující se tekutinu z rány, měly by být nepřilnavé k povrchu rány a v neposlední řadě by měly být bezbolestné, snadno odstranitelné a samozřejmě mít co nejnižší náklady na výrobu [100].

Použití nanovláken jako obvazových materiálů je zatím v prvotním stádiu, ale vlastnosti nanovláknenných materiálů splňují většinu výše uvedených požadavků, nutných pro hojení ran. Materiály, velice často studované k potenciálnímu hojení ran,

jsou zejména nanovlákná z přírodních polymerů nebo kombinace syntetických polymerů s přírodními.

Příkladem mohou být kolagenová vlákna, u nichž byly zkoumány jejich účinky na cytokompatibilitu, interakce kolagenových nanovláken s buňkami a hojivé vlastnosti nanovláken. Bylo zjištěno, že u těchto nanovláknenných materiálů dochází k šíření keratinocytů a zároveň k podpoře adheze buněk, a tím tedy k lepšímu hojení ran zejména v raných stádiích léčby [52].

Dalšími přírodními polymery, používanými k přípravě nanovláken sloužících ke krytí a hojení ran, jsou chitin a chitosan. Chitinová vlákna byla vytvořena pro sledování cytokompatibility, degradovatelnosti a šíření keratinocytů a fibroblastů a byla porovnávána s komerčně vyráběnými mikrovláknami [57].

Příkladem užití chitosanu byla chitosanová vlákna s přídavkem polyvinylpyrolidonu, která prokázala vysoké antibakteriální účinky proti gram pozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a gram negativním bakteriím *Escherichia coli* [101].

Rovněž byla připravena PLA vlákna a bikomponentní PLA/polyethylenglykolu (PEG) vlákna pokrytá chitosanem. Se vzrůstajícím množstvím chitosanu docházelo k rostoucí hemostatické aktivitě vláken, dále byla pozorována také antibakteriální aktivita vláken, a proto by tato vlákna mohla být použita pro přenos buněk nebo regeneraci pokožky [96].

Dalším přírodním polymerem užívaným k výrobě nanovláken je želatina. Jako obvazové materiály byla testována želatinová vlákna v kombinaci s PCL vlákny. Na lidských dermálních fibroblastech, keratinocytech a mesenchymálních kmenových buňkách bylo zjištěno, že jak želatinová, tak PCL vlákna podporují buněčnou adhezi a proliferaci. Účinek nanovláken na hojení ran byl zkoumán na krysách a porovnáván s kontrolní léčbou za použití gázy. Po 5 a 10 dnech léčby bylo zjištěno výrazně rychlejší uzavření rány za použití nanovláken obsahujících želatinu, ale žádné zlepšení stavu rány kryté PCL vlákny [55].

Mezi syntetické polymery použité pro krytí a hojení ran patří PVA, PCL, polyakrylonitril či polyurethan. S použitím těchto vláken byly sledovány tři fáze hojení: čistící neboli zánětlivá fáze, granulační fáze, ve které dochází ke vzniku nových cév a vyplnění rány granulační tkání, a epitelizační fáze. Bylo zjištěno, že účinnost hojení

ran je dána zejména porozitou vláken a prodyšností či smáčitelností povrchu vláken. Vhodná hydrofilita a vysoká porosita usnadňuje hojení ran zejména v jeho první zánětlivé fázi. Ovšem také průměr vláken a jejich antibakteriální aktivita hrají velkou roli v účinnosti hojení rány [81].

Dalšími vlákny použitými jako krycí materiály byla PGA vlákna, u nichž byly sledovány možnosti zlepšení biokompatibility PGA vláken s měkkými tkáněmi vytvořením vláken s malými póry a hydrolýzou jejich povrchu prostřednictvím kyseliny chlorovodíkové. Byl zjištěn kladný vliv hydrolýzy povrchu na zlepšení schopnosti adheze buněk k povrchu vláken a také došlo ke zlepšení smáčivosti vláken [77].

Také polyestersulfonová vlákna byla použita pro zrychlení epidermální regenerace a zlepšení obnovy tkáně. Charakterizace vláken ukázala, že vlákna mají porézní strukturu s velkým specifickým povrchem, což umožňuje vyšší absorpční kapacitu materiálu, nezbytnou pro účinné hojení ran. Dále *in vitro* pokusy ukázaly, že polyesterová vlákna mohou podporovat proliferaci fibroblastů a že epitelová regenerace u nich probíhá rychleji než regenerace za použití gázy [102].

6.3.2 Nosiče vhodné pro tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor, který kombinuje vědní obory ve snaze zlepšit biologické náhrady vhodné pro obnovu, udržení a zlepšení funkce tkání. Biomateriály hrají klíčovou roli v oblasti tkáňového inženýrství, protože mohou sloužit jako matrice pro růst buněk, pro jejich proliferaci či je lze použít k regeneraci a tvorbě nových tkání. Nanovláknenné materiály jsou v této oblasti často diskutovány v souvislosti s jejich strukturou, jelikož je velmi podobná extracelulárnímu matrixu [14]. Nízké průměry pórů s obdobnou velikostí jako fibrily extracelulárního matrixu umožňují napodobení prostředí tkáně a mohou být tedy účinné jako substrát pro růst buněk.

Velmi často jsou pro tyto účely používány přírodní polymery jako želatina [56], kolagen, kyselina hyaluronová [103], chitosan či škrob. Jejich případná kombinace se syntetickými polymery může vylepšit celkovou cytocompatibilitu nosiče. Příkladem mohou být PLA vlákna s přídavkem želatiny [56] nebo nanovláknna z různých syntetických polymerů (PLA, PLC a dalších) v kombinaci se škrobem [104]. Různé polymerní materiály již byly použity jako nosiče kožních buněk [52], kosterní tkáně [71], srdečních náhrad [105] či nervové tkáně [95].

Vhodným kandidátem pro léčbu kosterních defektů by mohla být např. nanovlákná ze syntetického PCL. Na tyto nanovláknenné nosiče byly aplikovány mesenchymální kmenové buňky a po uplynutí jednoho týdne došlo k penetraci buněk skrz nosič, k tvorbě extracelulárního matrixu a k migraci buněk uvnitř polymerního nosiče [71].

Jako potenciální nosič kosterní tkáně byla také studována vlákna kopolymeru PLA/kolagen/hyaluronová kyselina. Trojrozměrné polymerní nosiče napodobovaly mikrostrukturu spongiózní (houbovitě) kosti. Osteoblasty krysí lebeční tkáně byly umístěny na povrch nosiče, kde došlo k jejich adhezi, rozšíření a proliferaci skrze póry nosiče během jednoho týdne [103].

Na PLA a PLGA nanovláknách byly zkoumány možnosti jejich použití jako nosičů srdeční tkáně. Byl zkoumán vliv jejich chemického složení, rychlosti degradace a povrchových vlastností na jejich spojení s kardiomyocyty a na růst těchto buněk. Bylo zjištěno, že došlo k propojení kardiomyocytů s kostrou nosiče a byl také pozorován vliv složení nanovláknenného materiálu na růst kardiomyocytů. U nejvíce hydrofobních vláken (PLA) docházelo k větší buněčné adhezi než u hydrofilnějších a lépe degradovatelnějších PLGA vláken [105].

Dále byla sledována možnost použití PLA vláken k podpoře obnovy centrálního nervového systému. Byla testována schopnost nosičů podpořit růst kultury neurálních kmenových buněk. Buňky byly nejenom schopny proliferovat na nosiči, ale také zůstaly životaschopné dokonce 14 dnů za nepřítomnosti rozpustných růstových faktorů v médiu [95].

6.3.3 Lokální aplikace léčiv

Bylo zjištěno, že při vhodném složení roztoku polymeru je možné do struktury nanovláken inkorporovat biologicky či farmakologicky aktivní látky a že takto vytvořená biokompatibilní nanovlákná jsou vhodná pro řízené uvolňování léčiv při jejich lokální aplikaci. Díky velké flexibilitě výběru polymerního materiálu, a tím i jeho vlastností je možné do vláken inkorporovat různé druhy léku jako například: antibiotika, analgetika, imunosupresiva či cytostatika. Ke studiu uvolňování léčiv byla použita řada přírodních či syntetických polymerních nosičů, jako jsou PCL, PVA, polyurethan, celuloza, chitosan a v neposlední řadě PLA a jeho kopolymer PLGA.

Nejvíce sledovanými léčivými, uvolňovanými z nanovláken, byla léčiva s antibiotickými účinky. U vícevrstvých nanovláčenných materiálů, vyrobených beztryskovým elektrospinningem z polyurethanu a PVA, bylo sledováno uvolňování antibiotika gentamicinu [106]. Bylo zjištěno, že dochází k uvolnění 90 % léčiva během první hodiny u obou typů vláken. Zvýšením tloušťky krycí nanovláčenné vrstvy docházelo k prodloužení uvolňování gentamicinu.

Na PVA nanovláčenech s chitosanem bylo sledováno uvolňování antibiotika tetracyklin hydrochloridu. Bylo zjištěno, že během prvních dvou hodin dochází k uvolnění dostatečného množství tetracyklinu, umožňující antibakteriální potlačení gram negativních bakterií *Escherichia coli*, a také gram pozitivních bakterií *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*. Vyvinutá vlákna byla také dostatečně cytocompatibilní, což zlepšuje jejich vlastnosti při použití pro antibakteriální ošetření rány [79].

Z PCL vláken byl uvolňován metronidazol pro léčbu periodontálních onemocnění. Nanovláčna s přidaným léčivem poskytovala trvalý účinek pacientům až po dobu 11 dní. Žádný z pacientů, kterým byla vlákna aplikována do ústní dutiny, nezaznamenal žádné negativní účinky, jako je bolest zubů, bolesti ústní dutiny, citlivost zubů, vznik zánětu, alergie, absces, změněná chuť nebo zvýšená tvorba slin [74].

Dále bylo studováno uvolňování analgetik např. ibuprofenu z polyvinylpyrolidinových vláken s obsahem celulosy [107], nebo paracetamolu z polyvinylpyrolidinových vláken [108]. Tato vlákna měla sloužit jako perorální, rychle se rozpouštějící film, obsahující paracetamol a kofein. Při zkouškách navlhčování došlo k rozpadu vlákna s léčivem během 0,5 sekundy a disoluční studie ukázaly, že veškeré vložené léčivo bylo rozpuštěno za méně než 150 sekund, což bylo významné zlepšení oproti samotným jednotlivým léčivům a jejich směsi.

Nesteroidním protizánětlivým léčivem uvolňovaným také z PVA nanovláken byl ketoprofen. Z vláken bylo uvolněno 85 % léčiva během dvou hodin a 96 % obsahu léčiva se uvolnilo během dvou týdnů. Přidání methanolu do nanovláčenné směsi vedlo k pomalejší degradaci vláken ve vodném prostředí a tudíž ke snížení rychlého počátečního uvolňování [80].

Velmi významným polymerem v oblasti uvolňování léčiv z nanovláčenných materiálů je PLA a jeho kopolymer PLGA. Nejvíce používanými léčivými v kombinaci

s PLA nanovláknny jsou léčiva s antibiotickými účinky. Uvolňování tetracyklinu, chlorocyklinu a amfotericinu B bylo sledováno z PLA a PCL nanovláken. Byl pozorován jak vliv chemické struktury léčiva, tak vliv polymeru, ze kterého byla vlákna připravena. U PCL vláken došlo k uvolnění 75 % inkorporovaného tetracyklinu během prvních 20 minut. A přestože má chlorocyklin velmi podobnou strukturu, došlo k uvolnění pouze 30 % léčiva za stejný čas. Rozdíl v uvolňování byl pravděpodobně způsoben jinou rozpustností těchto léčiv jak ve zvláknovací směsi, tak v prostředí uvolňování. U PLA vláken došlo k uvolnění pouze 10 % tetracyklinu ze struktury vláken. Je tedy patrné, že tetracyklin je mnohem lépe dostupný z PCL než PLA vláken. V případě amfotericinu B bylo pozorováno pomalé uvolňování léčiva z PCL vláken během prvních 90 minut. Po třech hodinách bylo uvolněno kolem 30 % celkového množství léčiva. Dále byla připravena kombinovaná PCL/PLA vlákna s různým poměrem polymerů u kterých došlo k uvolnění až 70 % léčiv během prvních 30 minut. Takto rychlé uvolnění léčiva ale neodpovídá medicínám požadavkům. Lze tedy shrnout, že z PCL vláken došlo k mnohem rychlejšímu uvolňování léčiva než u PLA vláken, ve kterých lze léčivo udržet déle, a jsou tedy vhodnější pro medicínální aplikace [97].

Dalšími studovanými antibiotiky byly vancomycin, gentamicin a lokální anestetikum lidokain, inkorporované do sandwichových PLGA/kolagenových nanovláken s krycí vrstvou PLGA/kolagen a vnitřní nosnou vrstvou z PLGA. *In vivo* experimenty prokázaly, že uvolňování všech léčiv z nanovláken probíhalo po dobu až tří týdnů a u všech došlo k největšímu uvolnění během prvního dne. Pro stanovení relativní aktivity uvolňovaných antibiotik byl proveden test bakteriální inhibice. Biologická aktivita se pohybovala od 40 do 100 %. Nanovláknna byla účinná při léčbě infikovaných ran a fungovala také jako urychlovače při hojení ran v rané fázi [109].

Bioabsorbovatelná PLA nanovláknna byla použita pro studium uvolňování antibiotika mefoxin, kdy v průběhu prvních 3 hodin došlo k uvolnění většiny z celkového množství léčiva z povrchu vláken a během 24 hodin bylo uvolněno prakticky veškeré množství mefoxinu a [110].

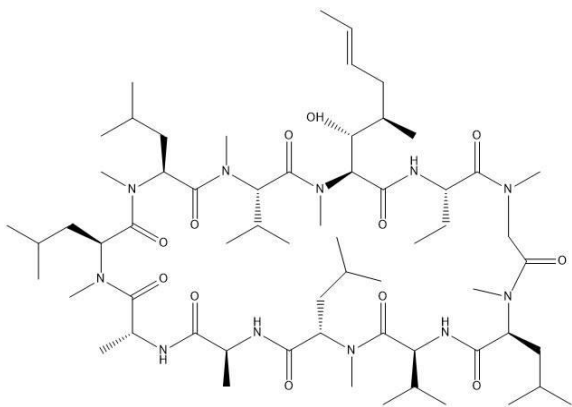
Při sledování kinetiky uvolňování paracetamolu z PLA a PLA/PEG vláken bylo zjištěno, že přidání hydrofobní látky (léčiva) do struktury nanovláken vede ke zpomalení degradace nanovláknenných materiálů a ke zlepšení jejich morfologie.

Nanovlákna byla více uniformní a rovnější. Během prvních šesti hodin uvolňování došlo k uvolnění 3 % paracetamolu z PLA vláken a okolo 50 % léčiva z PLA/PEG vláken. Důvodem může být hydrofobní charakter paracetamolu, který je méně kompatibilní s hydrofilními vlákny PLA/PEG, a tak dochází k rychlejšímu uvolňování léčiva než z PLA vláken. Z uvedených výsledků je patrné, že rychlost uvolňování léčiva může být řízena nejenom nastavením průměru vlákna, ale také hydrofilitou polymerní matrice [6].

7 Inkorporovaná léčiva studovaná v této práci

Nanovláknenné materiály se ukázaly jako velmi výhodné pro použití při lokální aplikaci léčiv. Při lokální aplikaci lze snížit celkovou dávku léčiva podanou organismu, a tedy snížit množství a intenzitu vedlejších účinků. Tato aplikace je proto velmi vhodná pro léčiva, u kterých jejich vážné vedlejší účinky nedovolují dosáhnout v místě účinku požadované koncentrace. Příkladem látek, vhodných pro studium použití nanovláken pro lokální aplikace léčiv, jsou právě imunosupresiva či cytostatika, mezi něž patří i cyklosporin A (CsA) a paklitaxel (PTX).

7.1 Cyklosporin A



Obr. 6 Struktura cyklosporinu A (CsA).

Cyklosporin A je lipofilní, cyklický polypeptid složený z 11 aminokyselin (obr. 6). Sedm z nich je *N*-methylovaných a pravděpodobně zabraňují jeho inaktivaci v trávicím traktu. Další čtyři nemethylované aminokyseliny umožňují tvorbu intramolekulárních vodíkových vazeb a stabilizují tak sekundární strukturu látky (tzv. β -list). CsA je velmi málo rozpustný ve vodě a ve vodných

pufrech. Jeho rozpustnost mohou zvýšit přísady surfaktantů, jako jsou Tween 20 či Tween 80 [111]. Rozpustnost CsA je závislá na teplotě a oproti většině látek se jeho rozpustnost zvyšuje s klesající teplotou [112].

CsA je imunosupresivní léčivo, které se díky své vysoké selektivitě vůči T-lymfocytům velmi často používá k prevenci odmítnutí transplantovaného orgánu.

Indikuje se např. po transplantacích jater, ledvin, srdce či kostní dřeně [113]. V současné době jsou zkoumány také jeho neuroprotektivní účinky, které by umožnily jeho aplikaci pro léčbu pacientů po mozkové mrtvici [114]. Také je možné jej užívat při léčbě některých kožních onemocnění, např. lupénky [115]. Je třeba zmínit i jeho velký potenciál při léčbě poranění rohovky [116], léčbě zánětu povrchu oka a syndromu suchého oka [117].

Nejběžnější aplikací CsA je perorální užívání. Může být také podáván intravenózně, avšak tento způsob podání je doporučován výhradně pacientům s problémy trávicího traktu, kteří nejsou schopni orálního podání. Léková formulace cyklosporinového léčiva totiž obsahuje ricinomakrogol, jehož vedlejšími účinky jsou dýchací obtíže, červenání obličeje, změny krevního tlaku nebo tachykardie. Pacienti s intravenózní terapií tedy musí být monitorováni a co nejdříve převedeni na orální podání [113].

Pro zvýšení perorální biologické dostupnosti CsA byly vytvořeny tablety uvolňující nanoemulzi. Farmakokinetická studie porovnávající tablety s nanoemulzí a běžné tablety ukázala, že profil uvolnění CsA z nanoemulze je odlišný od běžné lékové formulace. U běžných lékových formulací totiž dochází k velmi rychlému vstřebání léku do krve a poté je udržována jeho nízká hladina po dobu 24 hodin. Naproti tomu profil uvolnění z emulze vykazuje typické vlastnosti řízeného, postupného uvolňování se stabilnější absorpcí organismem a pomalejší eliminační rychlostí [118].

Významnou komplikací užívání CsA jsou jeho vedlejší účinky, mezi něž patří zejména nefrotoxicita [119] a hepatotoxicita [120]. Dalšími vedlejšími účinky mohou být zvýšení krevního tlaku [121, 122], hyperlipidemie [123] a existuje také podezření z iniciace *diabetes mellitus* [124].

Intenzita všech výše zmíněných nežádoucích účinků roste se zvyšujícím se množstvím podaného léčiva. Kvůli nízké rozpustnosti ve vodě má CsA při orálním podání velmi malou vstřebatelnost. Při běžných orálních aplikacích je tedy nutné podávat vysoké dávky CsA pro dosažení jeho terapeutického účinku. Lokální aplikace nanovlákných materiálů s inkorporovaným CsA by umožnila snížení celkové dávky potřebné k navození účinku léčiva.

Byly testovány různé formy zvyšující účinnost aplikace CsA. Inkorporace CsA do nanočástic již byla použita pro studium lokálního působení CsA u zrakově

postižených. CsA byl ve formě micelárních částic z PLGA aplikován při zkoumání účinnosti imunosupresiv na zánět povrchu oka, vznikajícího při syndromu suchého oka. Jak již bylo dříve uvedeno průměr a povrchový náboj nanočástic je daný typem polymeru, ze kterého jsou nanočástice připraveny. Nanočástice PLGA:Eudragit (75 : 25) s CsA vykazovaly nejenom malý průměr částic, ale také pozitivní povrchový náboj, což je činilo nejvýhodnějšími k léčbě syndromů suchého oka. Tato formulace také vykazovala signifikantně vyšší stupeň buněčné absorpce a vyšší koncentraci CsA v slzném filmu oka v porovnání s ostatními formulacemi [125].

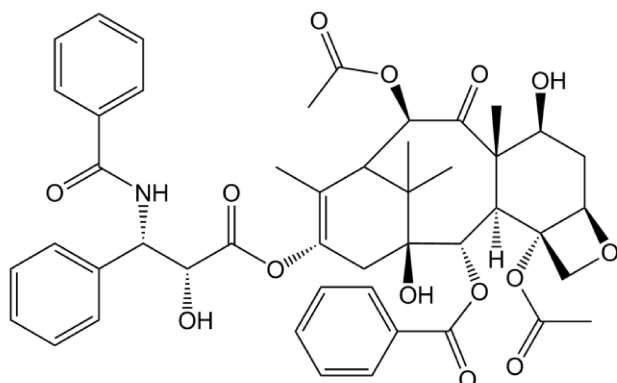
Dále bylo zjištěno, že liposomální částice s CsA jsou více efektivní a méně dráždivé než emulze již registrované pro oční léčbu. Syntetizované liposomy vykazovaly u experimentálních králíků významné zlepšení v produkci slz v suchých očích, vyšší koncentraci slzného filmu a menší oční podráždění při léčbě syndromu suchého oka [126].

Další studie sledovala účinek CsA na potlačení funkce T-lymfocytů při transplantaci rohovky. CsA byl použit tentokrát ve formě micelárních nanočástic kopolymeru složeného z různých derivátů PEG a PLA. Léčba byla prováděna po dobu 14 dnů a byly hodnoceny tři parametry: transparentnost rohovky, edém a neovaskularizace. Ve srovnání s kontrolní skupinou vykazovala léčená skupina významně vyšší průhlednost rohovky a nižší edém po 7 a 13 dnech od operace. Na konci studie byla neovaskularizace u léčených zvířat snížena o 50 %. Míra úspěšnosti transplantace rohovkového štěpu po 14 dnech léčby byla třikrát vyšší u léčených zvířat (73 % oproti 25 % kontrolní skupiny). Tato nová formulace měla stejnou účinnost jako systémová léčba, ale bez závažných systémových vedlejších účinků CsA [98].

Dalším typem studované lokální aplikace byla inkorporace CsA do nanovláknenných materiálů. CsA byl inkorporován do nanovláken z PLA a studium jeho uvolňování prokázalo, že dochází k jeho uvolňování i po 96 hodinách, aniž by došlo ke ztrátě jeho aktivity. Výsledky získané z výzkumu na buněčných kulturách také prokázaly, že při použití PLA vláken obsahujících CsA dochází k potlačení proliferace T-lymfocytů a k lokálnímu zmírnění produkce protizánětlivých cytokinů IL-2, IL-17 a IFN- γ . Bylo tedy prokázáno, že je možné tato vlákna použít pro medicínální aplikace jako lokální imunosupresi a buněčnou terapii [127].

Dále byly nanovláknenné materiály z PLA uvolňující CsA testovány pro léčbu poškození rohovky. Po nanesení vláken na povrch rohovky, poškozené alkalickými látkami, byla významně inhibována infiltrace T-lymfocytů, zánět rohovky a neovaskularizace. Snížení T-lymfocytů bylo spojeno s poklesem cytokinů v místě působení a došlo k oslabení buněčné apoptózy, syntézy oxidu dusnatého a exprese metaloproteinasy. K uzdravení rohovky došlo bez tvorby jizev [116].

7.2 Paklitaxel



Obr. 7 Struktura paklitaxelu (PTX).

Paklitaxel patřící mezi diterpenoidy, je pseudoalkoloid obsahující strukturu taxanu, která je zodpovědná za jeho antikarcinogenní účinky (obr. 7). PTX je hydrofobní látka s velmi nízkou rozpustností ve vodném prostředí [128]. Byla sledována jeho stabilita v různých typech solventů a bylo zjištěno, že je stabilní v polárních i nepolárních organických rozpouštědlech, ale že dochází k jeho degradaci ve vodném prostředí hydrolyzou jeho esterových skupin či epimerizací chirálního centra [129]. Na jeho stabilitu ve vodných roztocích má ale velmi kladný vliv přídavek methanolu, ethanolu, PEG či surfaktantu Tween 80 [130].

PTX je jedním z nejvíce používaných protinádorových léčiv pro léčbu pevných tumorů, zejména vaječníků, prsu nebo plic. Jedním z mechanismů jeho protinádorové aktivity jsou jeho antiangiogenní účinky. U nádorových tkání probíhá intenzivní látková výměna, a tudíž mají velmi husté krevní řečiště. Protinádorová aktivita PTX tkví v potlačení růstu krevního řečiště [131].

Intravenózně se PTX používá ve formě s nevodným solventem (Cremophor EL), což může způsobovat jeho vysrážení ve vodném prostředí těla, alergickou reakci nebo jiné vážné vedlejší efekty [128]. Jeho vhodné lokální podání by tak mohlo redukovat některé z jeho vedlejších účinků spojených s jeho systémovým podáním. Lokální chemoterapie je zatím pouze na experimentální úrovni, nicméně již byly provedeny preklinické studie potvrzující tuto možnost. Jedním z příkladů lokální chemoterapie je OncoGel, tedy gel poly(laktid-co-glykolid)ové (PLGA) kyseliny a PEG obsahující PTX.

Tato formulace již byla použita v klinické praxi jako terapie u rakoviny jícnu, nádorů mozku a jiných pevných nádorů [132].

Během posledních let byla vytvořena řada systémů podávání PTX s důrazem na zvýšení jeho rozpustnosti ve vodném prostředí spolu s kontrolovaným uvolňováním léku [133]. Jedním z možných způsobů jak zvýšit uvolňování hydrofobních látek je zvýšení povrchové plochy jejich nosiče vytvořením mikro- či nanočástic [134-136]. Nedávno byly studovány některé nanovláknenné nosiče obsahující PTX, které by mohly mít potenciální využití pro lokální chemoterapii.

Chitosanová vlákna s polyethylenoxidem a kyselinou hyaluronovou byla použita k testování biologické aktivity PTX na buněčných liniích rakoviny prostaty. Čím větší byla plocha povrchu vláken, tím více docházelo k uvolnění PTX. Po 48 hodinách rychlého uvolňování PTX došlo k poklesu uvolňování léčiva. Životaschopnost buněk rakoviny prostaty DU145 po 48 hodinách inkubace s PTX nanovláknem byla významně nižší než životnost buněk po aplikaci nanovláken s nižší koncentrací PTX ve stejném kultivačním období. Pokles počtu rakovinových buněk prostaty byl spojen s rostoucím množstvím inkorporovaného PTX [137].

PLGA nanovláknem s PTX byla vytvořena pro postchirurgickou chemoterapii při léčbě maligního gliomu. Byly vytvořeny různé typy nanovláknenných disků či mikrovláken pro studium způsobu uvolňování léčiv z vláknenných matric. Všechny tyto formy vykazovaly trvalé uvolňování PTX po dobu 80 dní s počátečním vyšším uvolněním léčiva. Studie apoptózy potvrdila výhodu trvalého uvolňování PTX z vláknenných matric ve srovnání s jednorázovým podáváním Taxolu® (obchodní název PTX). Studie na zvířatech potvrdila inhibici růstu nádorů o 70 % u všech typů vláken použitých u léčených skupin v porovnání s kontrolními skupinami po 24 dnech růstu nádoru. Tyto implantáty tak mohou hrát zásadní roli v lokální chemoterapii nádorů mozku [138].

Při prevenci recidivy rakoviny prsu byla vyzkoušena PLA vlákna s docetaxelem, derivátem PTX. Při aplikaci těchto nosičů po resekci primárního nádoru došlo ke snížení lokální recidivy nádorů (16,7 %) u myši oproti kontrolní skupině, které byla subkutánně podána vlákna neobsahující léčivo (88,9 %). Vlákna také vykazovala vynikající biologickou kompatibilitu, jak ukázala minimální přítomnost zánětlivých buněk v oblasti obklopující vlákna [139].

8 Vliv přídavku polyethylenglykolu na kinetiku uvolňování léčiv

Řada léčiv je hydrofobní povahy, proto je jejich uvolňování z polymerních nosičů do vodného prostředí velmi limitované. Jedním ze způsobů jak ovlivnit rychlost uvolňování léčiv je inkorporace PEG do polymerních nosičů a jejich následné uvolňování. PEG jsou biokompatibilní, amfifilní polymery s nízkou toxicitou. Díky svým vlastnostem usnadňují například transport léčiv na bázi proteinů z lipidových implantátů. Tato léčiva je nutné podávat parenterálně a navíc s velmi častou frekvencí, proto je velmi důležité co nejvíce optimalizovat vhodný systém pro jejich kontrolované podání. Ukázalo se, že přidání 5 až 20 % PEG do lipidových implantátů významně změnilo výslednou rychlost uvolňování proteinů. Přidáním PEG došlo k ovlivnění strmosti křivky uvolnění a zároveň k navýšení celkového množství uvolněného interferonu. U implantátů bez PEG došlo k uvolnění 31 % celkového množství proteinů po sedmi dnech. Naproti tomu u implantátů obsahujících 10 či 20 % PEG došlo k uvolnění celkového množství proteinů během 16 dní [140].

Přidání nízkomolekulárních PEG do polymerních nosičů a jejich vliv na uvolňování byl již také studován na různých typech formulace léčiv. Jedním z nich bylo uvolňování imunosupresiva sirolimu z dvouvrstvých biodegradabilních PLA/PLGA filmů. Uvolňování sirolimu bylo sledováno po dobu 40 dní a přidáním PEG do filmů došlo ke zrychlení profilu uvolňování léčiva. Během 16 dní bylo u filmů neobsahujících PEG uvolněno 10 % sirolimu, kdežto u filmů s PEG se uvolnilo 45 % celkového množství léčiva [141].

Vliv PEG byl také studován na uvolňování léčiva heparinu z PLA a PLGA filmů. Bylo zjištěno, že přídavkem PEG dochází k ovlivnění uvolňování heparinu v závislosti na typu polymeru. U kinetiky uvolňování z PLA filmů došlo přidáním PEG k potlačení počátečního rychlého uvolňování léčiva, které bylo pozorováno u filmů obsahujících pouze PLA. Po 56 dnech také došlo k uvolnění 90 % PTX, tedy o 10 % více než u filmů neobsahujících PEG. U PLGA filmů naproti tomu nebyl pozorován žádný vliv na uvolňování léčiva [142].

Dále byl sledován vliv přídavku PEG na uvolňování cytostatika PTX z PLGA/PEG filmů. Bylo zjištěno, že dochází k rychlému uvolňování PTX i PEG

z filmů. Přidání PEG do filmů zvýšilo uvolňování PTX během prvních 8 hodin, poté však došlo ke snížení uvolňování PTX v porovnání s filmy neobsahujícími PEG [143].

Dalším parametrem, ovlivňujícím vlastnosti nanovláken s inkorporovanými léčivy a profil jejich uvolňování do vnějšího vodného prostředí, je molekulová hmotnost přidaného amfifilního polymeru PEG. Vliv molekulové hmotnosti a přídavku PEG byl zkoumán na inkorporaci PTX do PLGA filmů a byl zjištěn významný vliv PEG na degradaci vláken a také na kinetiku uvolňování PTX z filmů. Z výsledků vyplynulo, že u filmů obsahujících PEG o vyšší molekulové hmotnosti (10 kDa) dochází k zvýšení rychlosti uvolňování. Oproti tomu PEG s nízkou hmotností (0,4 kDa) byl méně účinný při modifikaci uvolňování léčiva. [144].

V další studii sledující vliv molekulové hmotnosti a množství inkorporovaného PEG na uvolňování léčiv bylo zjištěno, že přidání nízkomolekulárního PEG (8 kDa) do PLGA filmů vedlo k variabilitě uvolňování PTX v závislosti na množství přidaného PEG. Čím více bylo přidávaného PEG, tím rychleji a ve větším množství docházelo k uvolňování léčiva z filmů. Přidání 15 % PEG (8 kDa) vedlo k uvolnění 26 % PTX po dobu 33 dní. Přídavkem 25 % PEG (8 kDa) došlo k rychlému uvolnění 17 % PTX během jedné hodiny a během následujících 12 dní pak došlo k uvolnění téměř 76 % PTX. U 50 % přídavku PEG (8 kDa) došlo k rychlému uvolnění 80 % PTX během jednoho dne. Oproti tomu u PLGA filmů neobsahujících PEG došlo k uvolnění pouze 17 % celkového množství PTX po 33 dnech.

Naopak přidání všech množství (15, 25 i 50 %) vysokomolekulárního PEG (35 kDa) vedlo k postupnému pomalému uvolňování PTX po dobu 33 dní, tj vedlo k nejvýznamnějšímu postupnému uvolňování PTX ze všech formulací. V případě vyššího množství PEG o velikosti 35 kDa také došlo k významnému uvolnění PTX během prvních dvou dnů, což bylo vysvětleno vyšší krystalinitou PEG (35 kDa), fázovou separací polymerní matrice a následným rychlým uvolňováním PEG s PTX do vodného prostředí [145]. Lze tedy shrnout, že byl pozorován významný vliv jak množství přidaného PEG, tak jeho molekulové hmotnosti na uvolňování léčiva.

9 HPLC a její využití pro detekci hydrofobních léčiv

9.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří do skupiny chromatografických separačních metod, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze, a to mobilní a stacionární fázi.

Klíčem celé chromatografické separace je kolona, na které dochází k dělení látek. V současné době jsou kolony pro HPLC připravovány výhradně komerčně. Při výběru vhodné kolony je třeba zohlednit typ stacionární fáze a její zrnění neboli velikosti částic [146]. Pro analytické účely jsou v dnešní době nejčastěji používány kolony o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm a délce 10 až 300 mm. Kolony jsou plněny náplněmi o velikosti částic od 1,8 do 10 μm . Použití částic chromatografického sorbentu menších než 2 μm přináší zvýšení účinnosti separace, ale také velký nárůst zpětného tlaku soustavy, a tím i vyšší nároky na instrumentaci; v tomto případě se již jedná o ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC). UHPLC je metoda dosahující lepší účinnosti, separaci píků a zkrácení doby analýzy, protože díky velikosti částic lze výrazně zkrátit i délku kolony. UHPLC systém musí splňovat požadavky jako je robustní čerpadlo a dávkovací systém, rychlé dávkovací cykly, přesné dávkování menších objemů, minimální mimokolonové objemy, vhodné stacionární fáze (mechanická stabilita při vysokých tlacích, částice menší než 2 μm), co nejmenší zpoždění gradientu a vysokou frekvenci sběru dat [147].

První volbou při vývoji HPLC metod bývá, díky své univerzálnosti, separace na reverzních fázích. Je využívána jak pro separaci malých molekul, tak pro komplikované směsi, jakými jsou biologické vzorky při studiu nových léčiv. Reverzní chromatografie využívá k separaci nepolární stacionární fáze. Nejčastěji se jedná o uhlíkaté řetězce navázané na povrchu nosiče (nejčastěji silikagelu). Nejběžnějšími jsou C18 nebo C8 uhlíkaté řetězce, dále pak fenylové či fenyl-hexylové ligandy. Retence látek na reverzních fázích obecně vzrůstá s počtem a délkou alkylových řetězců, s větším počtem aromatických jader či přítomností objemných substituentů jako jsou halogeny [146].

9.2 Detekční systémy

Vlastnosti ideálního detekčního systému jsou: vysoká citlivost a předvídatelná odezva, univerzálnost, specifická, linearita, spolehlivost, nedestruktivnost, signál nezávislý na složení mobilní fáze, změně teploty a průtoku, nulový příspěvek k mimokolonovému rozmývání elučních zón a v neposlední řadě kvalitativní informace pro detekované píky [148].

9.2.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm a patří mezi univerzální, nedestruktivní detektory s širokým lineárním dynamickým rozsahem. Podle konstrukčního uspořádání jsou spektrofotometrické detektory rozlišeny na detektory s fixní vlnovou délkou, s měnitelnou vlnovou délkou, s programovatelnou vlnovou délkou a na detektory s diodovým polem. Nejvíce používaným typem detektorů jsou detektory s diodovým polem. Tyto přístroje jsou schopny snímat celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Jsou velice užitečné, protože umožňují detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce a porovnání snímaného spektra s knihovnou spekter. Umožňují také vypočítat čistotu píku zjištěním, zda v daném retenčním čase eluuje pouze jedna látka nebo dochází ke koeluci více látek proměřováním spekter po celou dobu eluce píku [146].

9.2.2 Hmotnostní detektory

Hmotnostní detektory poskytují nejenom chromatografický údaj, ale také spektrální údaje o identitě látek. Skládají se z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru iontů a zdroje vakua. V iontovém zdroji dojde k zplynění mobilní fáze a k tvorbě iontů analytu z neutrálních molekul. Poté následuje urychlení a rozdělení iontů v hmotnostním analyzátoru na základě poměru mezi hmotností a nábojem iontu (m/z) a v posledním kroku dochází k detekci iontů a zesílení intenzity signálu v detektoru [149].

Volba ionizační techniky je dána těkavostí látky, její tepelnou stabilitou, molekulovou hmotností a polaritou. Nejpoužívanějšími technikami ve spojení s HPLC jsou ionizace za atmosférického tlaku a ionizace desorpcí laserem za účasti matrice

(MALDI). Mezi ionizace za atmosférického tlaku se řadí ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace a fotoionizace za atmosférického tlaku.

ESI je měkká ionizační technika pracující za atmosférického tlaku. U měkkých ionizačních technik obecně dochází ke vzniku protonovaných molekul s hmotou $[M+H]^+$ nebo deprotonovaných molekul o hmotě $[M-H]^-$. Nedochází u nich k rozsáhlým fragmentacím analytu jako u tvrdých ionizačních technik. ESI společně s MALDI patří mezi nejšetrnější a nejčastěji používané techniky zejména pro analýzu velkých molekul, jako jsou proteiny nebo jiné biomolekuly.

Hmotnostní analyzátor, umístěný mezi iontovým zdrojem a detektorem, má dvě funkce: rozdělení iontů podle jejich poměru m/z a jejich urychlení a fokusaci. Pro analýzu vysokomolekulárních látek jako jsou léčiva, jsou nejvíce vhodnými hmotnostními analyzátory analyzátor doby letu a kvadrupólové analyzátory.

Kvadrupólový analyzátor je tvořen 4 paralelními tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu, na které je vkládáno střídavé napětí. Napětí na tyčích je nastaveno tak, aby oscilace vstupujících iontů byla stabilní pouze pro ionty s určitým poměrem m/z a aby ostatní ionty byly zachyceny na tyčích kvadrupólu.

Trojité kvadrupól je tvořen třemi sériově zapojenými kvadrupóly. První a třetí kvadrupól slouží jako hmotnostní filtry a druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela. První kvadrupól propustí pouze zvolenou hmotu m/z prekurzorového iontu. Tato hmota je vedena do kolizní cely, kde dochází na základě zvolené kolizní energie k její fragmentaci. Vzniklé produktové ionty jsou vedeny do třetího kvadrupólu, který opět selektuje pouze vybraný produktový iont o dané m/z . Principem trojitého kvadrupólu je tedy sledování specifického přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem daného analytu. Produktový iont je dále detekován detektorem iontů nejčastěji elektronásobičem či fotonásobičem.

Prostřednictvím hmotnostního analyzátoru je možné získat různé typy hmotnostních záznamů vhodných k analýze různorodých aplikací:

Základní sken (SCAN) - Systém pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu. Kvadrupól propustí na detektor všechny ionty a změří hmotnostní spektrum v celém studovaném rozsahu m/z .

Selektivní záznam jednoho nebo více iontů (SIM) - Režim jednoduchého kvadrupólu propustí na detektor pouze zvolenou hodnotu m/z a ukazuje závislost signálu vybraného iontu na čase.

Sken prekurzorových iontů - Trojitý kvadrupól poskytuje spektrum všech prekurzorových iontů, ze kterých může vzniknout určitý fragment. Obecně se tento typ skenu používá pro identifikaci strukturně blízkých látek ve směsi.

Sken produktových iontů - Systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde definovaná m/z , ta je rozštěpena v kolizní cele, vzniklé ionty projdou třetím kvadrupólem a jsou následně detekovány. Tento typ skenu slouží k objasnění struktury analytu.

Sken neutrálních ztrát - Při tomto režimu jsou monitorovány všechny prekurzorové ionty, které podléhají vybrané neutrální ztrátě, a také se užívá pro selektivní identifikaci strukturně velmi blízkých látek.

Selektivní záznam více reakcí (MRM) - Režim trojitého kvadrupólu umožní sledování specifické fragmentační reakce vybraného iontu. Prvním kvadrupólem projde definovaná m/z prekurzorového iontu, ta je rozštěpena v kolizní cele, třetím kvadrupólem projde definovaná m/z produktového iontu a je následně detekována. Nejběžněji se tento typ skenu používá v kvantitativní analýze analytů přítomných ve složitých směsích [149, 150].

9.3 Stanovení CsA

Nejběžněji se CsA stanovuje prostřednictvím HPLC a imunoanalýzy. Nevýhodou imunologického stanovení je ale reakce monoklonálních protilátek s CsA metabolity, která může vést k falešně pozitivnímu zkreslení hladiny CsA v krvi. Toto zkreslení může vést ke zvýšení rizika pro pacienta v důsledku úzkého terapeutického indexu CsA [151, 152]. Proto je v současné době nejvíce používanou metodou pro detekci hladiny CsA HPLC [153-155] a nejnověji i UHPLC [156].

Velmi často se k separaci používá reverzních stacionárních fází, výjimečně bývá použita polární stacionární fáze [157]. Nejběžnější reverzní stacionární fází používanou pro analýzu CsA je oktadecylová stacionární fáze [154-156, 158]. Dále byl CsA analyzován na oktylové [153], kyanové [159] a fenylové [160] stacionární fázi.

Jako mobilní fáze jsou preferovány směsi acetonitril-voda [161], acetonitril-methanol-voda [154], isopropanol-acetonitril-voda [162], acetonitril-fosfátový pufr

[155], ale i méně rozšířené kombinace jako tetrahydrofuran-kyselina fosforečná [163] či nepolární hexan-isopropanol [157].

Pro stanovení CsA se hojně využívá spektrofotometrická detekce při 205 nm [164], 210nm [155], 212 nm [157], 220 nm [163] nebo 227 nm [162]. V komplikovaných matricích, kde vyvstává problém nízké odezvy CsA, popřípadě koeluce CsA s jinými komponentami matrice, byla aplikována hmotnostní detekce [153, 158, 161], například pro stanovení CsA v krvi [156], plasmě [165], moči [154] nebo vlasech [166].

Pro analýzu CsA v králičí krvi a plasmě byla použita oktadecylová stacionární fáze s mobilní fází methanol-voda s přidavkem mravenčí kyseliny v různých poměrech. Vzorky byly ionizovány elektrosprejem a CsA byl stanoven v SIM módu jako sodný adukt $[M + Na]^+$ (m/z 1224,7). Dalšími nalezenými adukty byl jeho draselný adukt $[M + K]^+$ (m/z 1240,7) a také byl detekován jeho protonovaný iont $[M + H]^+$ (m/z 1202,7) [167].

Stejně kolony bylo použito i pro separaci CsA v lidské krvi ovšem mobilní fází byla směs methanol-octan amonný (2mM) s přidavkem mravenčí kyseliny. K analýze vzorku byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu a přechodem m/z 1219,86 \rightarrow m/z 1202,66 a m/z 1219,86 \rightarrow m/z 1184,81 v MRM módu [156]. Ve stejné matrici byl separován CsA na oktylové koloně s mobilní fází methanol-octan amonný (50mM, pH 5,1). Vzorek byl také ionizován elektrosprejem a MRM přechod byl m/z 1203,0 \rightarrow m/z 425,4 [168].

CsA byl detekován i v opičí a krysí plasmě na oktadecylové stacionární fází s mobilní fází tetrahydrofuran-octanový pufr (5mM). Pro detekci byl zvolen pozitivní ionizační mód a MRM přechod z amonného aduktu CsA $[M + NH_4]^+$ na jeho protonovaný iont $[M + H]^+$ m/z 1220 \rightarrow 1203 [165].

V moči byl CsA stanoven pomocí oktadecylové stacionární fáze s mobilní fází acetonitril-methanol-voda. Bylo použito ionizace elektrosprejem a detekce byla v pozitivním módu s MRM přechodem m/z 1225 \rightarrow m/z 1122 [154].

9.4 Stanovení PTX

Stanovení PTX je nejčastěji prováděno pomocí HPLC s UV nebo hmotnostní detekcí. Nejběžněji se užívají různé typy kolon s oktadecylovou stacionární fází [169-172] nebo oktylovou stacionární fází [173]. Separace probíhá zejména ve směsi acetonitril-voda v různém poměru [169, 170, 173], acetonitril-octanový pufr [174] pro hmotnostní detekci se nejvíce používá směs methanolu s mravenčí kyselinou [175], nebo směs acetonitrilu s mravenčí kyselinou [176]. UV detekce je prováděna nejčastěji při vlnové délce 227 nm [169, 170, 172, 174], pro sledování PTX v krevní plasmě je možné použít 230 nm [173] nebo pro sledování uvolňování PTX z nanovláčkových materiálů 270 nm [177]. PTX je možné stanovit v různých typech matrice, nejčastěji v krevní plasmě [178] nebo při uvolňování PTX z nanovláčkových materiálů lze stanovit ve fosfátovém pufru (PBS) [169].

10 Komentáře k publikacím

10.1 Nanovláknenné nosiče pro lokální aplikaci léčiv – inkorporace a uvolňování modelových molekul, vliv jejich molekulové hmotnosti a druhu polymeru (Publikace 1)

Hřib, J.; Širc, J.; Hobzová, R.; Hampejsová, Z.; Bosáková, Z.; Munzarová, M.; Michálek, J.: Nanofibers for drug delivery – incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure. Belstein Journal of Nanotechnology, 6, 1939–1945 (2015).

Řada imunosupresivních a cytostatických léčiv je hydrofobní povahy, proto je jejich uvolňování z polymerních matric do vodného prostředí velmi limitované. Bylo zjištěno, že přidání amfifilního polymeru PEG do polymerační směsi by mohlo vést ke změně vlastností nanovláken s navázanými léčivy a ovlivnit tak profil uvolňování hydrofobních léčiv do vnějšího vodného prostředí [140]. V rámci systematického vývoje bylo tedy nutné nejprve popsat faktory ovlivňující uvolňování PEG z různých matric. Proto byl studován vliv inkorporace PEG o různé molekulové hmotnosti na kinetiku jeho uvolňování a získané výsledky byly publikovány v časopise *Belstein Journal of Nanotechnology*, roku 2015 (Publikace 1).

Pro hodnocení vlivu velikosti molekul PEG na rychlost uvolňování a celkového množství PEG uvolněného z nanovláken byla vytvořena vlákna z různých polymerů, a to z polykaprolaktonu (PCL), polyvinylalkoholu (PVA) a polylaktidu (PLA), do nichž byly inkorporovány molekuly PEG s různou molekulovou hmotností (2, 6, 10 a 20 kDa). Vlákna byla připravena prostřednictvím beztryskového elektrospinningu a proces zvláknění byl pro každý polymer optimalizován.

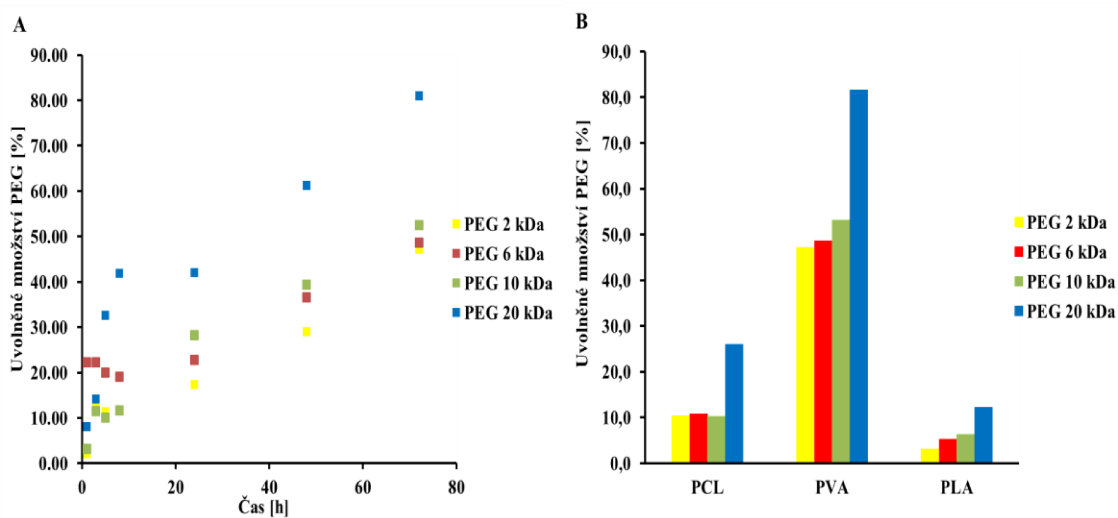
Morfologie vláken byla charakterizována metodou SEM. Bylo zjištěno, že všechna připravená nanovláknena jsou homogenní a neobsahují žádné shluky, perličky nebo jiné morfologické útvary. Vliv přídavku PEG na morfologii vláken také nebyl pozorován. Dále byla charakterizována tloušťka vláken, jejich porozita a plocha povrchu (tabulka 1).

Tabulka 1: Morfologické parametry nanovláken

	průměr vláken (nm)	porosita (%)	specifický povrch (m²/g)
PCL	179	77,4	6,0
PVA	157	78,2	7,7
PLA	282	86,6	4,7

V další části výzkumu byly provedeny experimenty studující kinetiku uvolňování PEG z nanovláknenných materiálů. Před vlastní inkorporací do vláken byly PEG derivatizovány prostřednictvím isokyanátů, jejichž aromatická jádra umožnila spektrofotometrickou detekci derivatizovaných PEG při 234 nm.

Naměřené profily uvolňování prokázaly, že rychlost uvolňování PEG z vláken do vodného prostředí závisí na jejich molekulové hmotnosti a také na typu nanovláknenného nosiče. Přestože bylo předpokládáno, že menší molekuly PEG se budou uvolňovat z vláken rychleji než větší, byl pozorován opačný efekt. Větší molekuly se uvolňovaly mnohem rychleji než ty menší (obr. 8A).



Obr. 8 Uvolňování PEG z PVA nanovláken (PEG 2, 6, 10, 20 kDa) (A). Výsledky ukazují, že s rostoucí molekulovou hmotností vzrůstá množství uvolněného PEG. Množství PEG o různé molekulové hmotnosti (2, 6, 10, 20 kDa) uvolněné z PCL, PVA a PLA nanovláken během 72 hodin při 20 °C (B). Opět je patrný vliv molekulové hmotnosti PEG na jeho uvolněné množství.

Nejvýraznější nárůst rychlosti uvolňování byl pozorován pro PEG 20 kDa, jehož uvolňování bylo přibližně o 30 % vyšší než pro PEG 10 kDa. Jedním z možných vysvětlení je, že delší řetězce PEG tvoří krystalické domény, které se rychleji uvolňují do okolního vodného prostředí. Kratší délka řetězců naopak tvoří amorfní struktury uvnitř nanovlákných struktur, které se uvolňují pomaleji. U dlouhých řetězců krystalického PEG může také docházet k rychlejšímu uvolňování, protože jejich části zůstávají na povrchu nanovlákného materiálu, jsou rychleji solvatovány a uvolněny do vodného prostředí.

Přestože se profily uvolňování modelových PEG molekul z různých polymerů lišily, trend závislosti různých molekulových hmotností byl u všech typů vláken stejný. Nejrychleji se uvolňovaly PEG s nejvyšší molekulovou hmotností (obr. 8B).

Rozdílné množství uvolněných PEG z různých typů vláken může být způsobeno jak odlišným chemickým složením vláken, tak jejich rozdílnou morfologií. Z chemického hlediska může docházet k interakci mezi PVA a molekulami vody během uvolňování. Molekulová struktura PVA obsahuje hydroxylové skupiny, které mohou interagovat s molekulami vody na úkor interakce s PEG, které se tak následně mohou uvolňovat rychleji. Nižší polarita PLC a PLA a tedy i slabší interakce s molekulami vody tak mohou vést k nižšímu uvolňování PEG z obou druhů nanovláken v porovnání s PVA nanovláknem. Dalším parametrem ovlivňujícím rychlost uvolňování PEG může být průměr nanovláken a jejich specifický povrch. Vyšší specifický povrch poskytuje větší plochu pro interakci PEG s vodným prostředím. Naopak větší průměr vláken prodlužuje dobu uvolňování, protože molekuly ze středu vlákna musí dále difundovat na jeho povrch. PVA vlákna měla nejmenší průměr a největší specifický povrch, proto u nich mohlo docházet k rychlejšímu uvolňování PEG proti vláknům z PCL nebo PLA (tabulka 1).

Získané výsledky potvrdily úspěšnou přípravu srovnatelných nanovlákných materiálů s inkorporovanými molekulami PEG. Bylo prokázáno, že kombinace odlišných polymerů a PEG o různých molekulových hmotnostech vede k odlišné kinetice uvolňování PEG. Přidání PEG s určitou molekulovou hmotností do struktury vláken společně s hydrofobním léčivem (CsA či PTX) tak může ovlivnit uvolňování těchto léčiv do vodných médií, ve kterých je rozpustnost těchto léčiv velmi nízká.

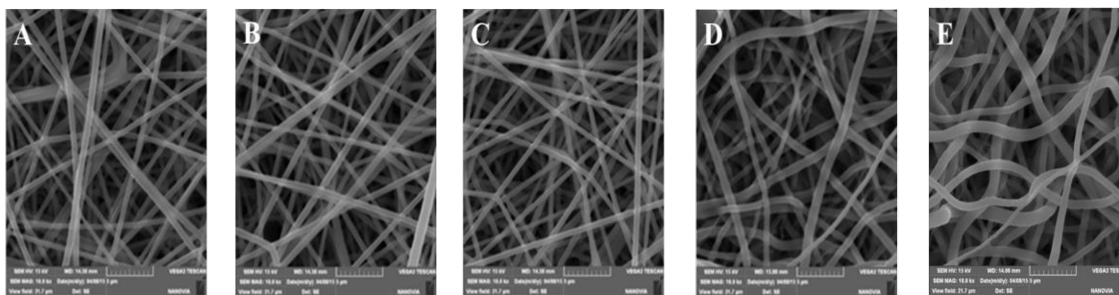
10.2 CsA/PLA/PEG nanovláčna s inkorporovaným léčivem sloužící k lokální imunosupresi (Publikace 2)

Širc, J.; Hampejsová, Z.; Trnovská, J.; Kozlík, P.; Hřib, J.; Hobzová R.; Zajícová, A.; Holáň, V.; Bosáková, Z.: *Cyclosporine A Loaded Electrospun Poly(D,L-Lactic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Nanofibers: Drug Carriers Utilizable in Local Immunosuppression. Pharmaceutical Research*, **34**, 7, 1391-1401, (2017).

Cyklosporin A (CsA) je imunosupresivní léčivo, velmi často užívané při transplantacích orgánů. Dalším potenciálním užitím CsA je jeho aplikace při léčbě poškození rohovky, kdy CsA zabraňuje procesu neovaskularizace [98]. CsA má velké množství závažných vedlejších účinků jako je poškození ledvin, jater, zvýšení tlaku či maligní onemocnění. Všechny výše zmíněné účinky jsou závislé na jeho celkové podané dávce. Léčba pacientů po transplantacích orgánů vyžaduje velmi vysoké dávky léčiva a dlouhou dobu podávání, proto se u pacientů projevují negativní vedlejší účinky [113]. Lokální aplikace CsA ve formě nanovláken má velký potenciál snížit množství léčiva podané pacientovi, a tedy i zmírnit jeho nežádoucí účinky.

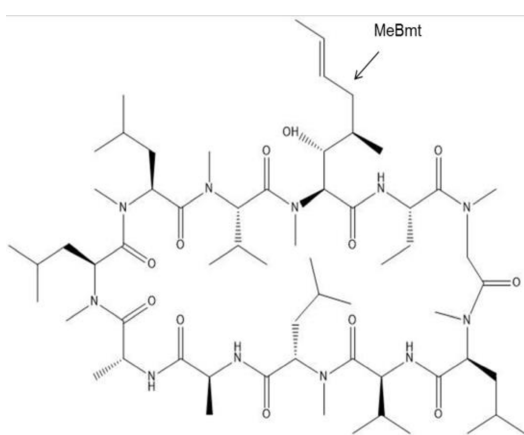
CsA je hydrofobní léčivo s velmi nízkou rozpustností ve vodném prostředí, proto byl testován vliv amfifilních molekul PEG o různých molekulových hmotnostech na kinetiku jeho uvolňování. Výsledky kinetiky uvolňování CsA z PLA nanovláken a vliv inkorporace PEG na kinetiku uvolňování byly publikovány v časopise *Pharmaceutical Research*, roku 2017 (Publikace 2).

PLA nanovláčna, obsahující hydrofobní léčivo CsA a amfifilní molekuly PEG o různé molekulové hmotnosti (6, 20, 35 kDa), byla připravena metodou beztryskového elektrospinningu. Charakterizace vláken byla provedena prostřednictvím skenovacího elektronového mikroskopu a bylo zjištěno, že připravená vlákna jsou homogenní a neobsahují žádné artefakty či shluky (obr. 9). Průměr vláken byl od 165 do 300 nm. Úspěšná inkorporace PEG a CsA byla potvrzena prostřednictvím infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. K další charakterizaci materiálu patřilo ověření celkového množství CsA ve vláknech prostřednictvím HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí. Bylo potvrzeno, že koncentrace CsA ve vláknech odpovídá množství CsA přítomnému v iniciační směsi.



Obr. 9 Obrázky SEM PLA nanovláken (A) s inkorporovaným CsA (10 hmot. %) (B) a s přidavkem PEG (15 hmot. %) 6 kDa (C), 20 kDa (D) a 35 kDa (E) ve zvětšení 10 000 krát.

Pro měření kinetiky uvolňování CsA do PBS a stanovení jeho celkové koncentrace v nanovláčenném materiálu byla optimalizována a validována HPLC metoda s tandemovou hmotnostní detekcí. Hmotnostní detekce uvolňování CsA do PBS byla provedena v MRM módu s hmotnostním přechodem m/z 1224,8 \rightarrow m/z 1112,8.



Obr. 10 CsA struktura s určením bočního řetězce MeBmt.

Jako molekulární iont byl detekován sodný adukt CsA $[M + Na]^+$, který potvrdil zachování struktury CsA při inkorporaci do nanovláken. Produktovým iontem byl detekován molekulární iont se ztrátou bočního řetězce MeBmt $[MNa-C_7H_{13}O]^+$ (obr. 10). Pro určení celkového množství CsA v nanovláčenném materiálu byl CsA uvolňován do methanolu a k jeho detekci byl použit hmotnostní přechod molekulárního iontu $[M + H]^+$ (m/z 1202,9 \rightarrow m/z 155,9). Optimalizovaná metoda HPLC-MS/MS poskytla uspokojivou ionizaci CsA, přijatelný retenční čas (3 minuty) a Gausovský tvar píku. Fenyl-hexylová stacionární fáze v kombinaci s mobilní fází methanol-octan amonný (5mM, pH 4,5), průtokem 0,7 ml/min, teplotou kolony 45 °C a nástřikem 5 μ l vykazovala lepší výsledky v porovnání s oktadecylovou stacionární fází, nejčastěji používanou k analýze CsA [153, 161].

Kalibrační křivka vykazovala linearitu ($y = 2,92x - 1,71$, $R^2 = 0,9998$) v celém kalibračním rozsahu od 10 ng/ml do 1 μ g/ml. Relativní standardní odchylky ($n = 5$) byly v rozmezí 0,41 až 5,71 %. Mez detekce určená jako trojnásobný poměr signál/šum byla 3 ng/ml a limit kvantifikace určený jako desetinasobek poměru signál/šum byl

10 ng/ml. Správnost, přesnost a opakovatelnost byly měřeny na třech koncentračních hladinách (10, 100 a 1000 ng/ml) v rámci jednoho dne a mezidenně (tabulka 2). Selektivita metody byla provedena porovnáním chromatogramů získaných extrakcí čistých nanovláken, vláken obsahujících CsA a vláken s CsA a PEG 35 kDa. Měření potvrdilo, že nedochází k žádné interferenci mezi extrahovanými látkami z vláken a CsA. Validace potvrdila, že vyvinutá metoda je selektivní, přesná, správná, lineární a citlivá.

Tabulka 2: Denní a mezidenní přesnost a správnost CsA ($n = 5$) naměřená prostřednictvím HPLC-MS/MS

c (CsA) teoretická [ng/mL]	denní naměřená [ng/mL]	správnost [%]	přesnost [%]	mezidenní naměřená [ng/mL]	správnost [%]	přesnost [%]
10	10,58±0,26	105,84	2,42	10,41±0,67	104,13	6,42
100	102,96±3,46	102,96	3,36	98,85±7,27	98,85	7,35
1000	999,32±52,06	99,93	5,21	1026,30±55,84	102,63	5,44

V další části výzkumu byla studována kinetika uvolňování CsA ze čtyř typů připravených nanovláken obsahujících 10 hmotnostních procent (hmot. %) hydrofobního CsA a 15 hmot. % amfifilního polymeru PEG o různé molekulové hmotnosti (6, 20, 35 kDa). V rámci optimalizace měření uvolňování CsA z nanovlákených materiálů byl vyzkoušen mód s postupnou výměnou PBS a kumulativní mód, ve kterém však nebyla pozorována významná časová změna koncentrace CsA v roztoku pravděpodobně kvůli rychlému ustavení koncentrační rovnováhy. CsA byl tedy uvolňován prostřednictvím postupné výměny PBS v časových úsecích 0,5; 1; 2; 3,5; 6,5; 10; 24; 48; 72 a 144 hodin. Následně byly kinetické profily vyhodnoceny a porovnány (tabulka 3). Rychlost uvolňování CsA byla vypočtena prostřednictvím rovnice (1):

$$v = \frac{m_n - m_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} \cdot \frac{1}{a} \quad (1)$$

ve které v je rychlost, m_n je množství CsA (ng) uvolněné v čase t_n (h), m_{n-1} je množství CsA (ng) uvolněné v čase t_{n-1} přepočtené vzhledem k vyměněné části PBS a a je plocha nanovlákených terčků (cm^2).

Z vypočtených rychlostí uvolňování (tabulka 3) je jasně patrný trend uvolňování. Z nanovláken obsahujících PEG bylo uvolněno několikanásobně více léčiva během prvních 24hodin než u nanovláken bez PEG. Také je patrné, že se snižující se molekulovou hmotností PEG vzrůstá množství uvolněného CsA.

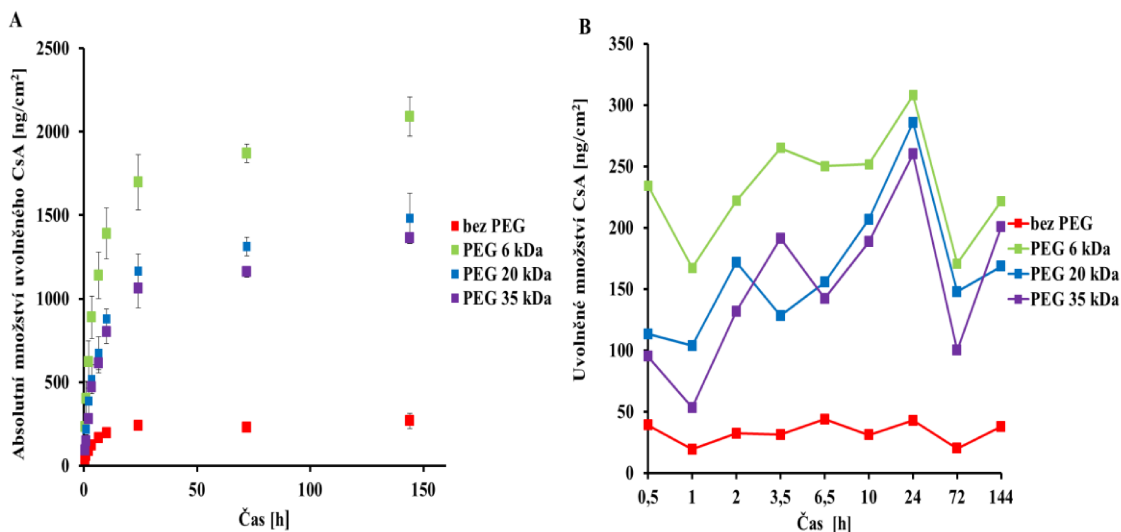
Tabulka 3: Porovnání kinetiky uvolňování CsA z nanovláčenných materiálů obsahujících 10 hmot. % CsA a 15 hmot. % PEG o různé molekulové hmotnosti

doba uvolnění	rychlost uvolnění CsA			
	v [ng/h.cm ²] ^a			
t [h]	bez PEG	PEG 6 kDa	PEG 20 kDa	PEG 35 kDa
0-0,5	58	469	226	190
0,5-1	39	334	207	107
1-2	32	222	172	132
2-3,5	21	177	86	127
3,5-6,5	15	83	52	47
6,5-10	9	72	59	54
10-24	3	22	20	19
24-72	0	4	3	2
72-144	1	3	4	3

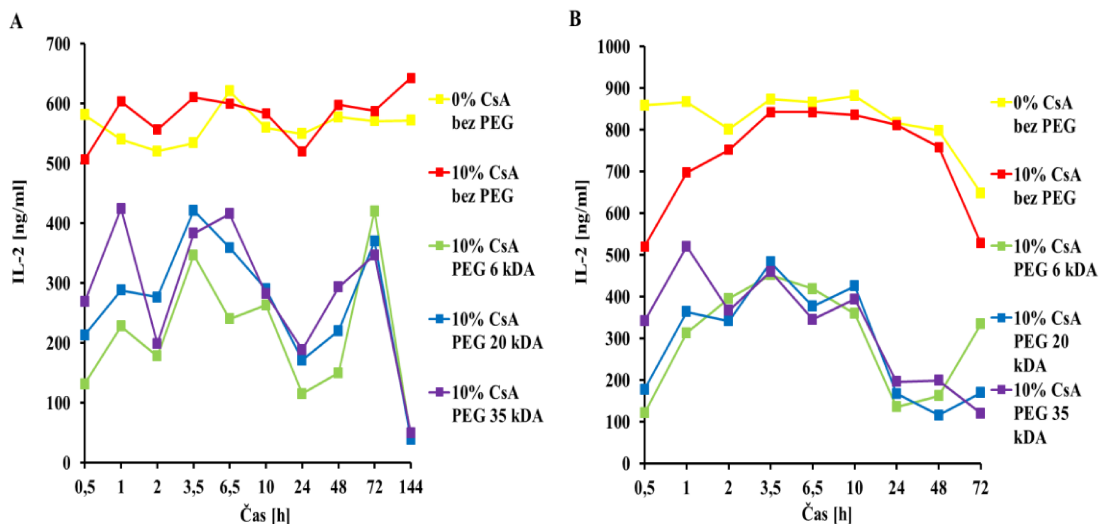
Dále byla určena celková množství uvolněného CsA a množství CsA uvolněného v jednotlivých krocích (obr. 11). Kinetické profily prokázaly, že množství uvolněného hydrofobního léčiva je ovlivněno přítomností amfifilního polymeru PEG. Z výsledků je patrné, že se snižující se molekulovou hmotností PEG roste množství uvolněného léčiva. Dále bylo zjištěno, že přidáním PEG do nanovláčenné směsi dochází k několikanásobnému nárůstu množství uvolněného léčiva v porovnání s nanovláčny obsahujícími pouze hydrofobní léčivo.

Výsledky biologických experimentů (obr. 12) byly ve shodě s výsledky naměřenými prostřednictvím HPLC. Nejvyšší uvolněné množství CsA tedy odpovídalo nejnižší schopnosti Con-A stimulovaných buněk sleziny produkovat interleukin-2 (IL-2) (obr.11B a 12A). Na obou grafech byl patrný jasný rozdíl v uvolňování CsA mezi nanovláčny obsahujícími PEG a těmi, které jej neobsahovaly. Nanovláčna obsahující

PEG o nejnižší molekulové hmotnosti (6 kDa) byla shodně vyhodnocena jako nejvhodnější pro další aplikace.



Obr. 11 Profily uvolňování CsA do PBS. Absolutní množství CsA (A) a uvolněné množství CsA v jednotlivých časových intervalech (B) stanovené z PLA nanovláken obsahujících 10 hmot. % CsA a 15 hmot. % PEG měřené prostřednictvím HPLC-MS/MS. Chybové úsečky u grafu A byly stanoveny za použití standardní odchylky ($n = 3$).



Obr. 12 Kinetika uvolňování CsA z PLA nanovláken bez CsA, obsahujících 10 hmot. % CsA a 15 hmot. % PEG (6, 20, 35 kDa) do PBS (A) nebo média (B). Vzorky s extrahovaným CsA byly testovány na schopnost inhibovat produkci IL-2 ConA aktivovanými buňkami sleziny.

Lze tedy shrnout, že byla studována kinetika uvolňování na čtyřech typech PLA nanovláknenných materiálů. Byla vyvinuta, optimalizována a validována nová HPLC-MS/MS metoda vhodná pro detekci a kvantifikaci CsA v prostředí PBS. Z výsledků kinetiky uvolňování vyplynulo, že přidáním PEG do struktury nanovláken dochází k významnému ovlivnění uvolňování hydrofobního léčiva do vodného prostředí. Přidáním PEG do nanovláknenné směsi totiž dochází k několikanásobnému nárůstu množství uvolněného léčiva v porovnání s nanovláknem obsahujícím pouze hydrofobní léčivo. Dále bylo pozorováno, že se snižující se molekulovou hmotností PEG vzrůstá množství uvolněného CsA. Bylo tedy potvrzeno, že přidáním PEG dochází k navýšení uvolňování hydrofobního léčiva do vodného prostředí a že připravená vlákna obsahující CsA a PEG by bylo možné použít jako účinné nosiče pro buněčné terapie, pro potlačení lokální zánětlivé reakce nebo odpovědi imunitního systému po transplantacích.

10.3 PLA/PEG vláknenné materiály jako nosiče uvolňující PTX, příprava a charakterizace vláken, uvolňování léčiva *in vitro* a jeho antiangiogenní aktivita (Publikace 3)

Hobzová, R.; Hampejsová Z.; Plch, J.; Hraběta, J.; Venclíková, K.; Jedelská J.; Bakowsky, U.; Bosáková, Z.; Lhotka, M.; Steinhart, M.; Kovářová J.; Michálek, J.; Širc, J.: Poly(D,L-lactide)/poly(ethyleneglycol) fibrous mats as paclitaxel-eluting carriers: Preparation and characterization of fibers, in vitro drug release and antiangiogenic activity, v recenzním řízení časopisu Materials Science and Engineering C (2018).

PTX stejně jako CsA patří mezi hydrofobní léčiva s velmi vážnými vedlejšími účinky. Lokální aplikace protinádorových léčiv může výrazně prodloužit dobu přítomnosti léčiva a jeho koncentraci v cílové tkáni, a tím snížit závažné vedlejší účinky ve srovnání se systémovým podáním léčiv. Vzhledem k intenzivnímu metabolismu v nádorové tkáni má tato tkáň specifické krevní řečiště. Mezi mechanismy účinku PTX jakožto protinádorového léčiva patří také jeho antiangiogenní účinky, které způsobují blokaci růstu krevního řečiště. Kontrola nádorové angiogeneze se tak stala důležitým úkolem v boji proti rakovině.

Příprava a charakterizace vláken, výsledky kinetiky uvolňování PTX z PLA vláken, vliv inkorporace PEG na kinetiku uvolňování a studium antiangiogenní aktivity PTX byly přijaty v časopise *Materials Science & Engineering C*, roku 2018 (Publikace 3).

Pomocí beztryskového elektrospinningu byla připravena PLA vlákna obsahující 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG o různých molekulových hmotnostech (6, 20 a 35 kDa). Struktura a vlastnosti vláken byly sledovány několika metodami: SEM, měřením izotermické adsorpce/desorpce dusíku, diferenciální skenovací kalorimetrií a měřením rentgenové difrakce (tabulka 4).

Dále byla vyvinuta, optimalizována a validována HPLC metoda s UV detekcí, sloužící ke stanovení celkového množství PTX ve vláknech a ke sledování uvolňování PTX z vláken do prostředí podobnému lidskému tělu. Jako prostředí vhodné k uvolňování léčiva byl použit PBS s 0,5 % detergentu Tween 80.

Tabulka 4: Přehled vlastností připravených PLA vláken

typ vzorku	PEG	PTX	specifický povrch ^d		objem pórů ^d	
	teoretické/ stanovené ^a	teoretické/ stanovené ^b	čerstvé	vymyté	čerstvé	vymyté
	wt%		m ² /g		mm ³ /g	
PLA	-	-	2,63 ± 0,09	3,14 ± 0,04	2,67	4,17
PLA-PEG (6 kDa)	15/14,5	-	3,24 ± 0,11	3,37 ± 0,05	3,16	4,20
PLA-PEG (20 kDa)	15/15,2	-	2,33 ± 0,05	4,05 ± 0,03	2,54	7,66
PLA-PEG (35 kDa)	15/15,1	-	2,90 ± 0,05	5,27 ± 0,07	3,61	16,53
PLA-PTX (10)	-	10/(9,96 ± 0,77)	3,13 ± 0,09	2,31 ± 0,02	4,48	2,80
PLA-PTX (10)-PEG (6 kDa)	15/ ^c	10/(10,78 ± 0,90)	1,69 ± 0,07	2,91 ± 0,01	1,43	3,92
PLA-PTX (10)-PEG (20 kDa)	15/ ^c	10/(9,20 ± 0,72)	2,01 ± 0,09	3,32 ± 0,04	1,87	4,68
PLA-PTX (10)-PEG (35 kDa)	15/ ^c	10/(9,19 ± 0,09)	1,79 ± 0,08	4,70 ± 0,04	1,62	8,56

^a ¹H NMR spektra, ^b měření extrakce prostřednictvím HPLC-UV ($n = 3$),

^c neměřeno, ^d stanoveny pomocí BET měření, objem pórů o velikosti < 40 nm

Použitá HPLC metoda byla optimalizována za použití kolony s oktadecylovou stacionární fází a mobilní fáze voda/acetonitril (50/50 v/v) s průtokem 0,5 ml/min. Teplota kolony byla nastavena na 35 °C, teplota vzorků na 25 °C a objem nástřiku byl 5 µl. Pro stanovení PTX byla použita vlnová délka 227 nm. Optimalizovaná metoda poskytla přijatelný retenční čas (4 minuty) a Gausovský tvar píku PTX.

Kalibrační závislost byla lineární v koncentračním rozsahu od 100 ng/ml do 15 µg/ml ($y = 0,02x - 0,44$, $R^2 = 0,9999$). Relativní standardní odchylky ($n = 5$) byly v rozmezí od 0,10 do 0,86 %. Hodnoty limitu detekce, respektive kvantifikace byly 50 a 100 ng/ml. Správnost, přesnost a opakovatelnost měření byly stanoveny na třech koncentračních hladinách (100, 1000, 10 000 ng/ml) opakovaným stanovením vzorků ve stejný den ($n = 5$) a ve dvou po sobě následujících dnech (tabulka 5).

Selektivita metody byla provedena porovnáním chromatogramů získaných vzorků extrakcí čistých PLA vláken (slepý vzorek) a PLA vláken obsahujících PTX a PEG (6 kDa). Získané údaje potvrdily, že vyvinutá metoda je selektivní, přesná, lineární a citlivá.

Tabulka 5: Denní a mezidenní přesnost a správnost změřená pro PTX ($n = 5$) metodou HPLC-UV

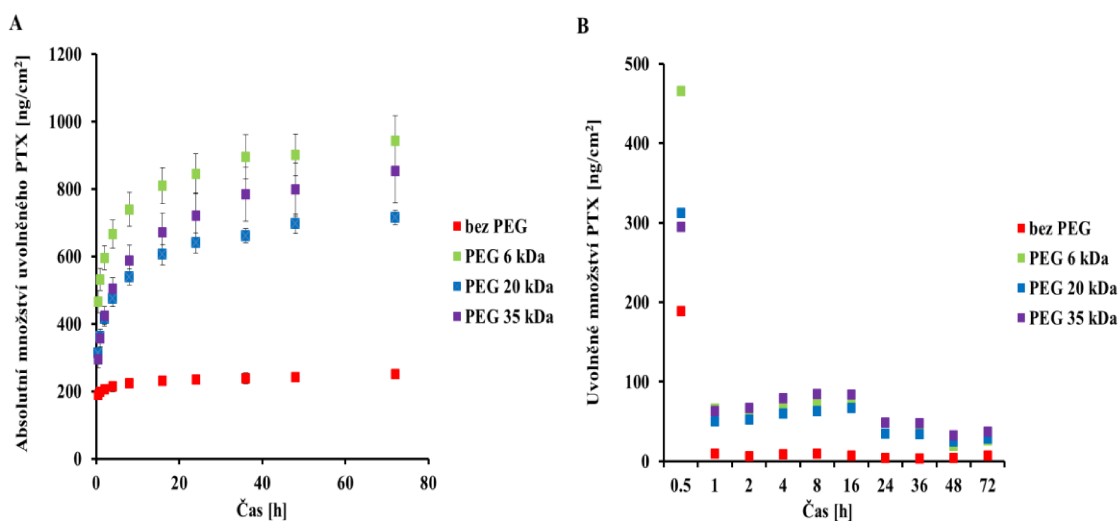
<i>c</i> (PTX) teoretická [ng/mL]	denní naměřená [ng/mL]	správnost [%]	přesnost [%]	mezidenní naměřená [ng/mL]	správnost [%]	přesnost [%]
100	100,34 ± 0,58	100,34	0,73	99,98 ± 0,84	99,98	0,84
1000	1001,3 ± 4,1	100,13	0,42	1001,5 ± 3,2	100,15	0,33
10000	10110 ± 12	100,75	0,12	1093 ± 29	100,93	0,29

Experimenty spojené s uvolňováním PTX do PBS s 0,5 % detergentu Tween 80 při 37 °C byly provedeny na čtyřech typech vláken, a to na PLA vláknech obsahujících 10 hmot. % PTX a těch, které obsahovaly 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG o různých molekulových hmotnostech (6, 20, 35 kDa). Režim postupné výměny pufru byl zvolen tak, aby lépe simuloval fyziologické podmínky.

Uvolňovací profily PTX jsou zobrazeny na obrázku 13, celkové kumulované množství uvolněného PTX v čase je ukázáno na obrázku 13A a množství uvolněného PTX odpovídající danému časovému úseku je znázorněno na obrázku 13B.

Výsledky ukázaly, že vlákna obsahující PEG uvolňují podstatně vyšší množství hydrofobního léčiva PTX a k jeho uvolňování dochází po delší dobu ve srovnání s vlákny bez PEG. Podobné výsledky byly získány i při uvolňování CsA z PLA vláken (Publikace 2).

Je zřejmé, že počáteční rychlé uvolnění PTX bylo následováno jeho konstantním pomalým uvolňováním. Rychlé počáteční uvolňování bylo nejvýraznější u PEG 6 kDa ve srovnání s ostatními vlákny obsahujícími PEG. Při znázornění absolutního uvolněného množství (obr. 13A) hraje roli vyšší množství PTX uvolněné v prvním časovém úseku, které zvýšilo celkový profil uvolňování PTX. V pozdější fázi uvolňování lze také pozorovat mírně vyšší uvolňování PTX z vláken obsahujících PEG o všech molekulových hmotnostech (obr. 13A a 13B). Tento účinek lze vysvětlit rozdíly v krystalinitě molekul PEG o různých molekulových hmotnostech a s tím související separaci fází jednotlivých složek ve zvláknovací směsi. Dlouhodobé uvolňování malého množství léčiva lze také přičítat zvýšené ploše povrchu mezi vlákny a okolní tekutinou po vymytí PEG, jak bylo prokázáno prostřednictvím měření BET (tabulka 4).

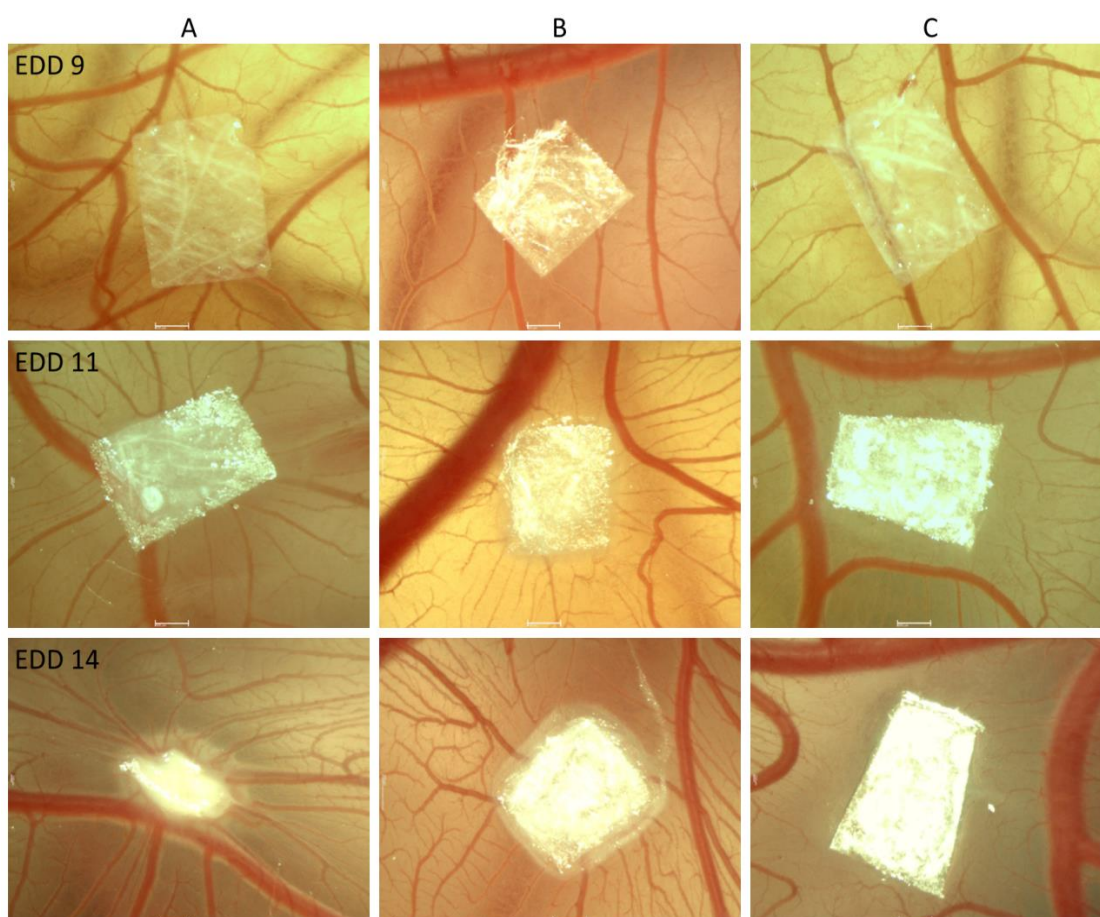


Obr. 13 Profily uvolňování PTX do PBS s 0,5 % detergentu Tween 80. Absolutní množství PTX (A) a uvolněné množství PTX v jednotlivých časových intervalech (B) stanovené z PLA vláken obsahujících 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG měřené prostřednictvím HPLC-UV. Chybové úsečky byly stanoveny za použití standardní odchylky ($n = 3$).

Ve spolupráci s univerzitou v Marburgu byla také studována biokompatibilita PLA/PEG vláken a antiangiogenní aktivita uvolňovaného PTX pomocí experimentů

na kuřecí chorioallantoické membráně (CAM). CAM je vysoce vaskularizovanou extraembryonální tkání ptačího embrya. V kuřecím embryu se tato tkáň tvoří mezi 4. a 5. dnem vývoje, kdy se vnější mezodermální vrstva spojí s mezodermální výstelkou chorionu a mezi těmito vrstvami dojde k vytvoření sítě cév. Centrální část CAM je pak vytvořena kolem 8. až 10. dne vývoje.

Ke studiu antiangiogenních účinků PTX bylo použito pět typů vláken, a to PLA-PEG (20 kDa) vlákna, PLA-PTX vlákna a PLA-PTX vlákna obsahující PEG (6, 20 a 35 kDa). Jako slepých vzorků bylo použito PLA-PEG vláken, na nichž byla potvrzena dobrá biokompatibilita s tkání embrya a nebyly pozorovány žádné zánětlivé ani antiangiogenní účinky (obr. 14A). PLA-PTX vlákna prokázala slabou antiangiogenní aktivitu během prvního dne aplikace (obr. 14B), další den došlo k formování nové kapilární sítě, totéž bylo pozorováno i u vláken obsahujících PTX a PEG 6 kDa.



Obr. 14 Antiangiogenní aktivita PLA materiálů na kuřecí CAM. PLA-PEG (20 kDa) znázorňují výbornou biokompatibilitu materiálu s tkání (A). U PLA-PTX vláken je možné pozorovat na obr. EDD9 (B) slabou antiangiogenní aktivitu a na obrázcích (C) PLA-PTX-PEG (20 kDa) došlo dokonce k vymizení cévní sítě v oblasti působení vláken. Měřítka je 500 μm , EDD znamená počet dní od aplikace vláken.

U vláken obsahujících PTX a PEG 20 kDa byla pozorována největší antiangiogenní aktivita, došlo dokonce k vymizení cévní sítě v oblasti působení vláken po dobu 5 dní (obr. 14C). Naproti tomu nízká antiangiogenní aktivita byla pozorována pro PEG 35 kDa.

CAM stanovení tedy potvrdilo dobrou biokompatibilitu s tkání. Přidání PEG do struktury vláken významně zvýšilo biologickou aktivitu vlákenného konstruktu uvolňujícího PTX. Zvláště pak vlákna obsahující PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa vykazovala velmi dobré antiangiogenní účinky. Získané profily uvolňování také mohou být považovány za velmi slibné k lokální aplikaci protinádorových léčiv.

Provedené experimenty stejně jako dosavadní lékařská praxe pro léčbu nádorových onemocnění ukázaly, že rychlé dodávání vysoké počáteční dávky léku může zabít nádorové buňky a následné pomalé uvolňování může být dostatečné k zabránění další regresi nádorového onemocnění.

10.4 PTX/PLA/PEG vlákna s dlouhodobou protinádorovou aktivitou jako potenciální nosič léku pro lokální chemoterapii (Publikace 4)

Plch, J.; Venclíková, K.; Janoušková, O.; Hraběta, J.; Eckschlager, T.; Kopečková, K.; Hampejsová, Z.; Bosáková, Z.; Širc, J.; Hobzová R.: Paclitaxel-Loaded Polylactide/Polyethylene Glycol Fibers with Long-Term Antitumor Activity as a Potential Drug Carrier for Local Chemotherapy, Macromolecular Bioscience, 18, 6, (2018).

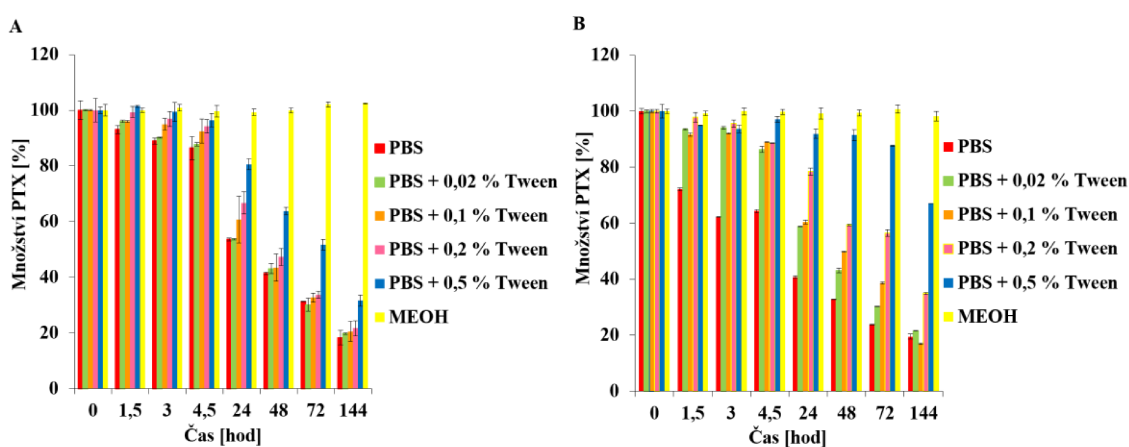
Velkým problémem současné onkologie je recidiva pevných nádorů po jejich chirurgickém odstranění či radioterapii. Použití intenzivnější radioterapie nebo radikálnějšího chirurgického zákroku ale často není možné kvůli možným nežádoucím komplikacím. Řešením by mohly být nové systémy umožňující uvolňování léčiva přímo v místě účinku, které by mohly snížit závažné vedlejší účinky související se systémovým podáním léčiva, dále významně snížit terapeutickou dávku léčiva a v neposlední řadě prodloužit dobu přítomnosti látky v cílové oblasti.

Stabilita PTX, kinetika uvolňování inkorporovaného PTX o obsahu 1 a 10 hmot. % z PLA vláken a vliv inkorporace PEG na kinetiku uvolňování byly publikovány v časopise *Macromolecular Bioscience*, roku 2018 (Publikace 4).

Stabilita PTX byla studována v různých typech média na koncentračních hladinách 100 ng/ml a 1 µg/ml (obr. 15). Jako médium byl použit PBS a PBS obsahující 0,02; 0,1; 0,2 a 0,5 % detergentu Tweenu 80. Methanol sloužil jako referenční médium inhibující rozklad PTX v čase. Stabilita PTX byla studována vyvinutou HPLC metodou popsanou v kapitole 10.3.

V samotném PBS došlo během 72 hodin k rozpadu více než 70 % PTX. Dále byla testována stabilita v roztoku PBS obsahujícím různé množství detergentu Tween 80, který se běžně používá ke zvýšení rozpustnosti PTX ve vodném prostředí. V 2% roztoku Tweenu 80 dosáhne PTX své rozpustnosti v krevním séru [179]. Bylo zjištěno, že s přibývajícím množstvím Tweenu 80 vzrůstá stabilita PTX v roztoku u obou testovaných koncentrací PTX. Výrazný účinek byl pozorován zejména u nižší koncentrace PTX za použití 0,5% přídatku Tweenu 80, kdy byla stabilita PTX po 72 hodinách téměř 90 %. Lze tedy shrnout, že stabilita PTX je vysoce závislá

na prostředí, do kterého je PTX uvolňován. Bylo zjištěno, že k degradaci PTX dochází hydrolyzou nebo epimerizací ve vodném prostředí [129]. Přidání Twenu 80 do vodného prostředí způsobí snížení hydrolyzy PTX. Molekuly detergentu pravděpodobně obklopi molekuly PTX a vytvoří tak micelární struktury, čímž sníží solvataci PTX molekulami vody a jeho následnou hydrolyzu [130]. Také inkorporace PTX do vláken může částečně omezit jeho rozklad, protože léčivo je zabudované ve struktuře vláken a k jeho degradaci může tedy dojít až po jeho uvolnění do okolního prostředí. Pro studium profilu uvolňování bylo zvoleno jako nejvhodnější médium PBS s 0,5% přídavkem Twenu 80, aby nedocházelo k částečnému rozkladu PTX, a tedy k ovlivnění výsledků měření.



Obr. 15 Stabilita PTX v různých médiích o koncentraci PTX 1 µg/mL (A) a 100 ng/mL (B). Chybové úsečky byly stanoveny za použití standardní odchylky ($n = 3$).

Prostřednictvím bezjehlového elektrospinningu bylo připraveno osm typů PLA vláken obsahující 1 a 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG o různé molekulové hmotnosti (6, 20 a 35 kDa). Vlákná byla charakterizována prostřednictvím SEM. Bylo zjištěno, že všechna připravená vlákna mají velmi podobnou vlákennou strukturu a že PTX i PEG byly úspěšně inkorporovány do vlákenné struktury.

Dále bylo stanoveno skutečné množství PTX extrakcí z vláken methanolem a následnou analýzou extraktů metodou HPLC-UV (kapitola 10.3). Výsledky ukázaly, že vlákna obsahují $1 \pm 0,25$ hmot. % a $10 \pm 0,8$ hmot. % PTX, tj. 75 až 125 %, respektive 92 až 108 % předpokládaného množství PTX na základě složení zvláknovací směsi. To potvrdilo dobrou shodu s obsahem PTX v počáteční polymerizační směsi. Vyšší odchylky stanovených množství vzhledem k teoretickým hodnotám u vláken

obsahujících pouze 1 hmot. % PTX byly dány pravděpodobně velmi nízkou stanovovanou koncentrací.

Následně byla měřena kinetika uvolňování PTX z vlákných materiálů v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 48 a 72 hodin v PBS s 0,5 % detergentu Tween 80 při 37 °C. Uvolňování bylo prováděno v módu postupné výměny, aby se co nejvíce podobalo uvolňování do prostředí živého organismu. Koncentrace PTX v určitém časovém úseku byly měřeny prostřednictvím HPLC-UV a následně byly vypočteny rychlosti uvolňování pro jednotlivé časové periody prostřednictvím rovnice (1, str. 44), obdobně jako pro CsA (Publikace 2).

Tabulka 6: Porovnání rychlostí uvolňování PTX z PLA vláken obsahujících 1 a 10 hmot. % PTX a 15 hmot. %PEG o různé molekulové hmotnosti

doba uvolnění <i>t</i> [h]	rychlost uvolnění <i>v</i> [ng/h.cm ²] ^a							
	PLA-PTX		PLA-PTX-PEG (6 kDa)		PLA-PTX-PEG (20 kDa)		PLA-PTX-PEG (35 kDa)	
	10%	1%	10%	1%	10%	1%	10%	1%
	PTX	PTX	PTX	PTX	PTX	PTX	PTX	PTX
0-0,5	378	33	947	59	614	43	538	68
0,5-1	18	2	136	5	96	4	119	5
1-2	6	1	67	3	51	3	66	3
2-4	5	0	35	1	30	1	38	1
4-8	2	0	19	0	16	0	20	1
8-16	1	0	9	0	8	0	10	0
16-24	1	0	4	0	4	0	5	0
24-36	0	0	3	0	3	0	4	0
36-48	0	0	2	0	2	0	2	0
48-72	0	0	1	0	1	0	1	0

^a rychlost uvolnění PTX vypočtené podle rovnice (1, str. 44)

Vypočtené rychlosti uvolňování PTX (tabulka 6) ukázaly, že z vláken obsahujících PEG se uvolňuje významně vyšší množství PTX a také že dochází k prodloužení doby uvolňování léčiva v porovnání s vlákny obsahujícími pouze PTX.

Tento trend byl v souladu s uvolňováním CsA z PLA vláken obsahujících různé množství PEG (Publikace 2). Uvolňování probíhalo ve dvou fázích, počáteční rychlé několikahodinové uvolňování bylo následováno pomalým konstantním uvolňováním. Počáteční rychlé uvolňování lze vysvětlit difuzí léčiva z povrchu vláken do volného média.

Při sledování vlivu molekulové hmotnosti PEG na kinetiku uvolňování je zřejmé, že k uvolnění nejvyššího množství PTX došlo u vláken obsahujících PEG o molekulové hmotnosti 6 kDa během první hodiny, zatímco u vláken s PEG o vyšších molekulových hmotnostech (20 a 35 kDa) byl PTX uvolňován po delší časovou periodu. Pozorované trendy byly výraznější u vzorků obsahujících 10 hmot. % PTX.

Dále byla sledována *in vitro* cytotoxicita PTX na několika typech buněčných linií MCF-7, LNCAP, SH-SY5Y a UKF-NB-3. Bylo zjištěno, že nejvíce citlivou linií na přítomnost PTX byla linie UKF-NB-3, u níž byla jako u jediné prokázána aktivita PTX u vláken obsahujících 1 hmot. % PTX a jejich cytotoxicita. Na všech typech linií byla následně prokázána aktivita PTX (10 hmot. %) po dobu několika dní. Lze také říci, že přidáním PEG o různé molekulové hmotnosti lze ovlivnit profily uvolňování PTX z vláken specificky pro určité typy rakovinových buněk.

Přestože byly *in vitro* experimenty provedeny za podmínek odlišných od reálného prostředí lidského těla, získané výsledky mohou být považovány za slibné pro navržení lokální léčby recidivujících nádorů, neboť rychlé dodání dostatečné počáteční dávky zabijí nádorové buňky a následné pomalé uvolňování může zabránit další recidivě nádoru.

10.5 Pilotní studie uvolňování hydrofobního léčiva PTX do 2-hydroxyethylmethakrylátových hydrogelů

10.5.1 Materiály

PLA nanovlána obsahující 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa byla připravena metodou beztryskového elektrospinningu a charakterizována metodami popsány v publikacích, věnujících se uvolňování PTX (Publikace 3 a 4). 2-Hydroxyethylmethakrylát (HEMA, monomer), ethylenglykoldimethakrylát (EDMA, síťovací činidlo) a 2-hydroxy-2-methylpropiofenon (Darocur, 1173, UV iniciátor), acetonitril, methanol (pro HPLC), fosfátový pufr (PBS) a Tween 80 byly získány od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká Republika).

10.5.2 Stanovení celkového množství PTX v terčících

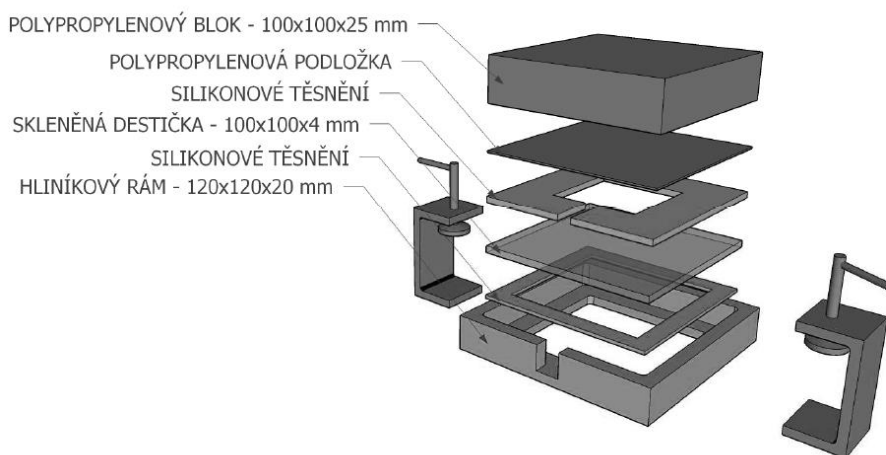
Pro potvrzení inkorporace PTX do vláken bylo nutné stanovit celkové množství PTX ve vlákenných materiálech. Celkové množství PTX bylo stanoveno zvážením pěti terčků vláken a uvolněním PTX z těchto terčků do 10 ml methanolu. Tento roztok byl 10krát zředěn. Stanovené množství PTX v roztoku bylo porovnáno s teoretickým množstvím PTX ve vlastních vláknech. Měření koncentrací PTX bylo provedeno optimalizovanou a validovanou HPLC-UV metodou popsanou v Publikaci 3. Měření bylo provedeno v tripletu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Tímto stanovením bylo potvrzeno, že veškeré množství PTX vložené do polymerační směsi bylo úspěšně inkorporováno do vlákenné struktury a že vlákna obsahují definované množství PTX.

Tabulka 7: Množství PTX v PLA vláknech

typ vláken	teoretické množství PTX (%)	naměřené množství PTX (%)
PLA-PTX	10	9,95 ± 0,51
PLA-PTX-PEG (20kDa)	10	9,88 ± 0,49

10.5.3 Příprava hydrogelů a stanovení množství vody v rovnovážně zbotnaném stavu

Hydrogely byly připraveny radikálovou polymerizací iniciovanou UV zářením. Polymerační směs byla připravena ze směsi HEMA/voda v poměru 60/40 (w/w), dále bylo do směsi přidáno 0,5 hmot. % síťovacího činidla EDMA a 0,5 hmot. % UV iniciátoru Darocur vzhledem k množství monomeru HEMA. Polymerizační směs byla 5 minut probublána dusíkem z důvodu odstranění kyslíku inhibujícímu radikálovou polymerizaci a pomocí injekční stříkačky vpravena do připravených forem. Forma se sestávala z hliníkového rámečku s otvorem pro další komponenty. Do ní byla vložena postupně silikonová těsnění, skleněná destička umožňující průchod záření k polymerizační směsi, distanční vložka ze silikonu, která určovala tloušťku polymerizovaného vzorku, tenká polypropylenová podložka a tvrdý polypropylenový blok, který rámeček uzavíral. Rámeček se všemi komponentami byl následně zajištěn dvojicí hliníkových svorek. Schéma formy je zobrazeno na obr. 16. Forma byla plněna skrz otvor v distanční vložce a rámečku.



Obr. 16 Schéma formy k přípravě hydrogelů.

Vzorky byly polymerizovány 30 min pomocí UV lampy ReptiGlo 8.0 (60 W). Po polymerizaci byly vzorky vyjmuty z formy a ponořeny do destilované vody, za účelem vymytí nízkomolekulárních reziduí z polymerizace a dosažení rovnovážně zbotnaného stavu. Následně pak byly přebotnány po dobu jednoho týdne do PBS s 0,5 % detergentu Tween 80 pro zvýšení stability PTX v následujících uvolňovacích procesech. Poté byly rozměry gelů upraveny na 2,5 x 7 x 0,1 cm a opět ponechány jeden

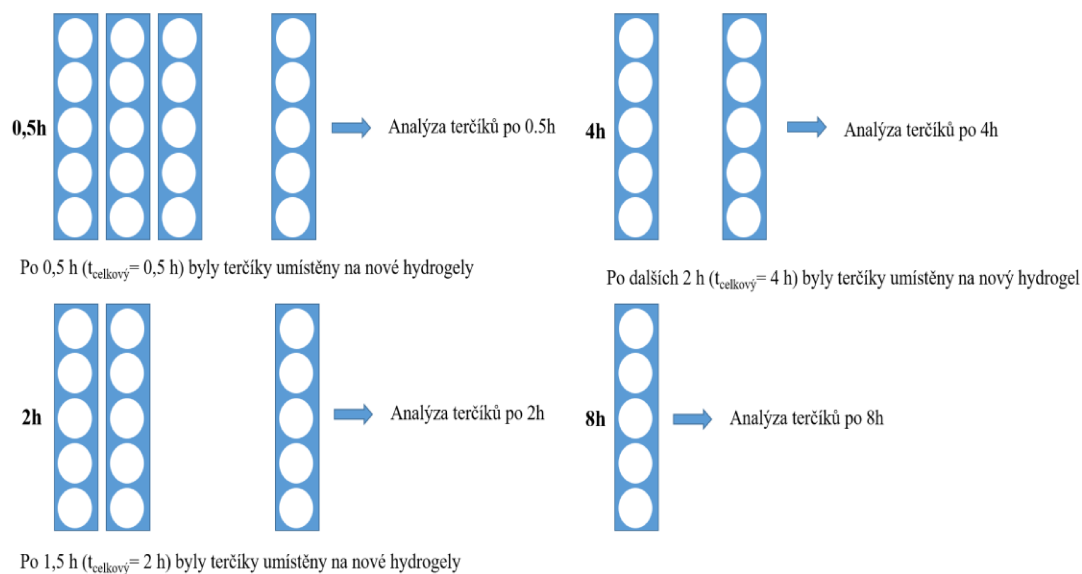
den v roztoku PBS s detergentem Tween 80. Tyto hydrogelové proužky byly následně použity pro uvolňovací experimenty. Dále bylo z hydrogelů připraveno pět čtverců o rozměrech 2 x 2 cm, které byly zváženy a poté vysušeny do konstantní hmotnosti. Tento experiment sloužil ke stanovení množství vodné složky ve struktuře hydrogelu. Bylo zjištěno, že hydrogely v rovnovážném zbotnaném stavu obsahují $37,47 \pm 0,27$ % vody.

10.5.4 Měření uvolňování PTX do hydrogelů

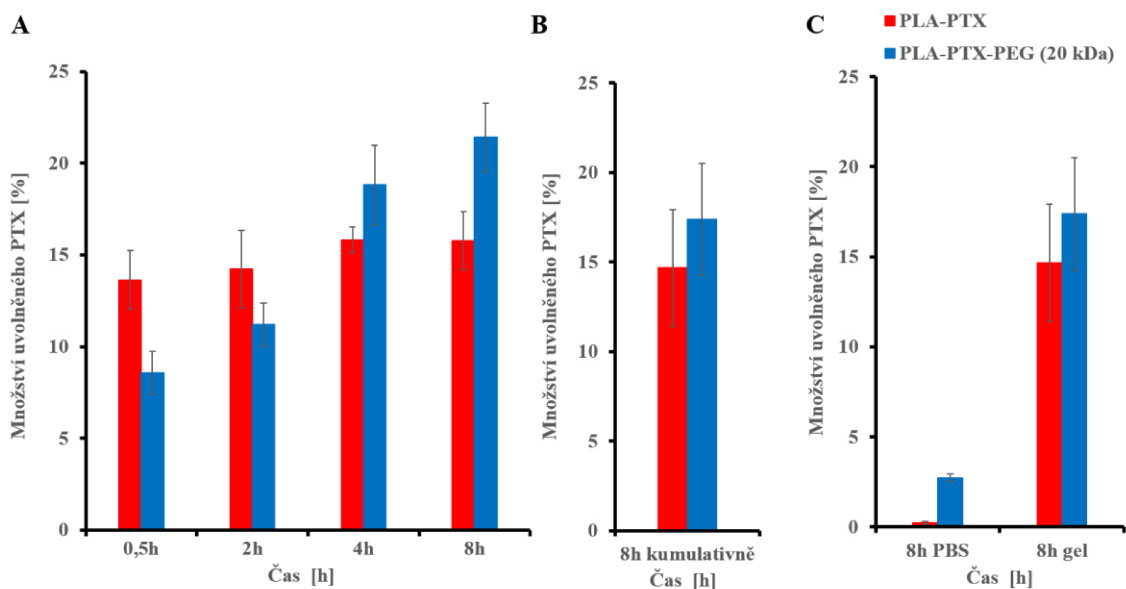
Pro studium uvolňování PTX do hydrogelů byly použity dva typy vláken, které obsahovaly 10 hmot. % PTX a jeden ze vzorků dále obsahoval 15 hmot. % PEG s molekulovou hmotností 20 kDa. Z proužků gelu byla osušením odstraněna vodná fáze na jejich povrchu. Mezi dva proužky gelů bylo vždy nanášeno pět terčičků vlákenného materiálu, které byly předem zváženy pro stanovení teoretického množství PTX v daných pěti terčicích. Gely s terčičky byly umístěny ve vodní lázni v inkubátoru (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Riga, Lotyšsko) při teplotě 37 °C po dané časové úseky 0,5; 2; 4 a 8h. Hydrogely byly měněny v daných časových úsecích. Pro každý časový úsek byl experiment proveden v pěti replikacích. Postup pokusu je znázorněn na obr. 17. Vždy po uplynutí daných časových úseků byly terčičky z gelů umístěny do 10 ml methanolu a třepány po dobu 2 hodin pro kvantitativní převedení PTX do roztoku. Tyto roztoky byly 10krát zředěny a bylo z nich stanoveno zbytkové množství PTX v terčicích prostřednictvím optimalizované a validované HPLC-UV metody (Publikace 3). Poté bylo vypočteno uvolněné množství PTX z terčičků. Všechna měření byla provedena pětkrát. Pro časový úsek 8 hodin bylo také změřeno kumulativní množství PTX uvolněné do jedné série hydrogelových proužků (tzn. bez výměny gelů).

Po experimentech zaměřených na stanovení celkového množství PTX byla dále studována kinetika jeho uvolňování do hydrogelů na bázi methakrylátu (obr. 18A, 18B). Důvodem použití hydrogelů oproti vodným médiím, použitým v předchozích pracích, byla snaha přiblížit podmínky uvolňování léčiva z vlákenných nosičů reálnému prostředí organismu, především potlačit vliv konvekce kapalného média nalézajícího se v okolí vlákenných terčičků při třepání. Bylo zjištěno, že u vláken obsahujících pouze 10 hmot. % PTX dochází k rychlému uvolnění PTX během první půl hodiny a poté k mírnému uvolňování malého množství PTX. Oproti tomu u vláken obsahující PEG

20 kDa docházelo k postupnému uvolnění přibližně čtvrtiny celkového množství PTX ve vláknech.



Obr. 17 Schéma experimentu postupného uvolňování PTX, pro každý časový úsek byl experiment proveden v pěti replikacích.



Obr. 18 Uvolňování PTX z PLA a PLA-PEG (20 kDa) vláken do různého typu médií: Uvolňování s postupnou výměnou hydrogelů (A) a uvolňování do hydrogelů bez výměny hydrogelů (kumulativní mód) po dobu 8 hodin (B). Porovnání kumulativních uvolňování do prostředí PBS a hydrogelu (C). Chybové úsečky byly stanoveny za použití standardní odchylky ($n = 5$).

Přítomnost PEG tedy výrazně zvýšila množství PTX uvolněného z PLA vláken. Obdobný trend byl pozorován i při sledování kinetiky uvolňování PTX do PBS (Publikace 3, 4).

Počáteční rychlé uvolňování je pravděpodobně způsobeno difuzí léčiva z povrchu vláken do kapalného média vyplňujícího mezivláčenné prostory a dále do struktury hydrogelu. U vláken s inkorporovanými amfifilními molekulami PEG je patrné zvýšené uvolňování léčiva.

Při srovnání postupného módu uvolňování (obr. 18A) s kumulativním módem PTX (obr. 18B) je jasně patrný významný vliv postupné výměny okolního prostředí na uvolňování PTX, kdy je dosaženo mnohem vyššího uvolnění léčiva. Důvodem je postupná výměna nových gelů, a tedy přístup nenasyčeného gelu k léčivu.

Dále byly provedeny experimenty porovnávající vliv prostředí, do kterého je uvolňován PTX z nanovláken (obr. 18C). Zde byl patrný rozdíl mezi uvolňováním do vodného média (PBS) a do struktury hydrogelu. Do struktury hydrogelu bylo uvolněno mnohem více léčiva než do roztoku PBS.

Důvodem vyššího uvolňování hydrofobního PTX do methakrylátového gelu je pravděpodobně skutečnost, že gel obsahuje pouze 37 % vodné složky na rozdíl od čistě vodného fosfátového média.

Závěrem lze shrnout, že z vláken obsahujících PEG se uvolňuje významně vyšší množství PTX a také že dochází k prodloužení doby uvolňování léčiva v porovnání s vlákny obsahujícími pouze PTX. Stejný trend byl pozorován i při uvolňování léčiva PTX do kapalného roztoku PBS (Publikace 3, 4) a také při sledování vlivu PEG na uvolňování imunosupresiva CsA do kapalného prostředí (Publikace 2). Také je jasně patrný rozdíl mezi uvolňováním hydrofobního léčiva do vodného prostředí a do prostředí hydrogelu obsahujícího 37 % vodné složky. Z výsledků vyplývá, že konvekce kapalného media nehraje tak důležitou roli jako interakce uvolňovaného léčiva s okolní maticí. Na celkově uvolněné množství hydrofobního léčiva má tedy vliv nejen modifikace vláken přítomností PEG, ale zejména typ prostředí, do kterého se léčivo uvolňuje. Vhodně zvolený systém tvořený správně zvoleným hydrogelem tak může dobře aproximovat reálné *in vivo* prostředí.

11 Závěr

Byla připravena a testována polymerní nanovlákná s přídavkem amfifilních PEG metodou beztryskového elektrospinningu vhodná pro následnou inkorporaci hydrofobních léčiv. Z řady syntetických polymerů byl vybrán PLA, polymer s odpovídajícími vlastnostmi pro použití v lidském organismu, který byl spolu s hydrofobními léčivy CsA a PTX zvlákněn. Dále byl do zvláknovací směsi přidán PEG o různé molekulové hmotnosti pro ovlivnění kinetiky uvolňování hydrofobních léčiv.

Byly vypracovány, optimalizovány a validovány analytické HPLC metody s tandemovou hmotnostní detekcí nebo UV detekcí pro sledování kinetiky uvolňování léčiv do fosfátového pufru, fosfátového pufru s přídavkem detergentu a hydrogelů na bázi methakrylátu vybraných tak, aby částečně simulovaly reálné prostředí lidského organismu.

Výsledky biologických experimentů a analytických pokusů ve shodě potvrdily, že interakce mezi hydrofobními léčivy (CsA, PTX) a PEG hraje významnou roli při uvolňování léčiv z nanovláken. Byl zjištěn jasný rozdíl v uvolňování léčiv z vláken bez PEG a s ním. Přidáním PEG do nanovláken došlo k signifikantnímu nárůstu uvolněného množství léčiv a prodloužení doby uvolňování v porovnání s nanovláknou neobsahujícími PEG.

Byl také potvrzen vliv prostředí, do kterého bylo léčivo uvolňováno. Byl pozorován významný nárůst uvolněného léčiva do hydrogelů v porovnání s uvolňováním do vodných médií.

Přestože byly *in vitro* experimenty uvolňování CsA a PTX provedeny za podmínek odlišných od reálného prostředí lidského těla, připravená nanovlákná obsahující CsA a PEG by bylo možné použít pro potlačení lokální zánětlivé reakce nebo odpovědi imunitního systému. Výsledky získané sledováním uvolňování PTX zase mohou být považovány za slibné pro navržení lokální léčby recidivujících nádorů, neboť rychlé dodání dostatečné počáteční dávky zabijí nádorové buňky a následné pomalé uvolňování může zabránit další proliferaci a migraci nádorových buněk.

12 Citace

- [1] Khang D., Carpenter J., Chun Y. W., Pareta R., Webster T. J.: Nanotechnology for regenerative medicine. *Biomedical Microdevices*, **12**, 575-587 (2010).
- [2] Liu W., Thomopoulos S., Xia Y.: Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine. *Advanced Healthcare Materials*, **1**, 10-25 (2012).
- [3] Steffens D., Lersch M., Rosa A., Scher C., Crestani T., Morais M. G., et al.: A new biomaterial of nanofibers with the microalga *Spirulina* as scaffolds to cultivate with stem cells for use in tissue engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **9**, 710-718 (2013).
- [4] Chen D. W., Hsu Y. H., Liao J. Y., Liu S. J., Chen J. K., Ueng S. W.: Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, **430**, 335-341 (2012).
- [5] Choi J. S., Leong K. W., Yoo H. S.: In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials*, **29**, 587-596 (2008).
- [6] Peng H., Zhou S., Guo T., Li Y., Li X., Wang J., et al.: In vitro degradation and release profiles for electrospun polymeric fibers containing paracetamol. *Colloids and Surfaces: B, Biointerfaces*, **66**, 206-212 (2008).
- [7] Ghosh S., Chaganti S. R., Prakasham R. S.: Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme l-asparaginase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **74**, 132-137 (2012).
- [8] Ondaçuhu T., Joachim C.: Drawing a single nanofibre over hundreds of microns. *Europhysic Letters*, **42**, 215-220 (1998).
- [9] Xing X., Wang Y., Li B.: Nanofibers drawing and nanodevices assembly in poly(trimethylene terephthalate). *Optics Express*, **16**, 10815-10822 (2008).
- [10] Ali G., Maqbool M.: Fabrication of cobalt-nickel binary nanowires in a highly ordered alumina template via AC electrodeposition. *Nanoscale Research Letters*, **8**, 352-352 (2013).
- [11] Schönenberger C., van der Zande B. M. I., Fokkink L. G. J., Henny M., Schmid C., Krüger M., et al.: Template Synthesis of Nanowires in Porous Polycarbonate

Membranes: Electrochemistry and Morphology. *The Journal of Physical Chemistry B*, **101**, 5497-5505 (1997).

[12] Tao S. L., Desai T. A.: Aligned Arrays of Biodegradable Poly(ϵ -caprolactone) Nanowires and Nanofibers by Template Synthesis. *Nano Letters*, **7**, 1463-1468 (2007).

[13] Zhang K., Wang Y., Hillmyer M. A., Francis L. F.: Processing and properties of porous poly(l-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials*, **25**, 2489-2500 (2004).

[14] Ma P. X., Zhang R.: Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research*, **46**, 60-72 (1999).

[15] Zhao J., Han W., Chen H., Tu M., Zeng R., Shi Y., et al.: Preparation, structure and crystallinity of chitosan nano-fibers by a solid-liquid phase separation technique. *Carbohydrate Polymers*, **83**, 1541-1546 (2011).

[16] Horii A., Wang X., Gelain F., Zhang S.: Biological Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Significantly Enhance Osteoblast Proliferation, Differentiation and 3-D Migration. *PLOS ONE*, **2**, (2007).

[17] Lee Y. E., Wadsworth L. C.: Fiber and web formation of melt-blown thermoplastic polyurethane polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, **105**, 3724-3727 (2007).

[18] Greiner A., Wendorff J. H.: Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie - International Edition*, **46**, 5670-5703 (2007).

[19] Jirsák O., Sanertnik F., Lukáš D., Kotek V., Martinová L., Chaloupek J. A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. Patent EP 1 673 493 B1. Czech Republic (2004).

[20] Taylor S. G.: Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London A Mathematical and Physical Sciences*, **313**, 453 (1969).

[21] Bhardwaj N., Kundu S. C.: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, **28**, 325-347 (2010).

[22] Jiang H., Wang L., Zhu K.: Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *Journal of Controlled Release*, **193**, 296-303 (2014).

[23] Yarin A. L.: Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies*, **22**, 310-317 (2011).

- [24] Teo W. E., Ramakrishna S.: A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, **17**, 89-106 (2006).
- [25] Lin T., Wang H., Wang X.: Self-Crimping Bicomponent Nanofibers Electrospun from Polyacrylonitrile and Elastomeric Polyurethane. *Advanced Materials*, **17**, 2699-2703 (2005).
- [26] Niu H., Lin T., Wang X.: Needleless electrospinning. I. A comparison of cylinder and disk nozzles. *Journal of Applied Polymer Science*, **114**, 3524-3530 (2009).
- [27] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W.-E., Lim T.-C. Ma Z.: An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, *World Scientific*, (2005).
- [28] Bellan L. M., Craighead H. G.: Applications of controlled electrospinning systems. *Polymers for Advanced Technologies*, **22**, 304-309 (2011).
- [29] Thompson C. J., Chase G. G., Yarin A. L., Reneker D. H.: Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer*, **48**, 6913-6922 (2007).
- [30] Reneker D. H., Yarin A. L.: Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, **49**, 2387-2425 (2008).
- [31] Elektrosppinnig elektrospraying equipment.
<https://www.nanoscience.com/products/electrospinning-equipment> (12.9.2018).
- [32] Tan S. H., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S.: Systematic Parameter Study for Ultra-Fine Fiber Fabrication Via Electrospinning Process. *Polymer*, **46**, 6128-6134 (2005).
- [33] Gupta P., Elkins C., E. Long T., L. Wilkes G.: Electrospinning of Linear Homopolymers of Poly(Methyl Methacrylate): Exploring Relationships Between Fiber Formation, Viscosity, Molecular Weight and Concentration in a Good Solvent. *Polymer*, **46**, 4799-4810 (2005).
- [34] Liu H., Hsieh Y.-L.: Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **40**, 2119-2129 (2002).
- [35] Pham Q. P., Sharma U., Mikos A. G.: Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Biomacromolecules*, **7**, 2796-2805 (2006).

- [36] Shin Y. M., Hohman M. M., Brenner M. P., Rutledge G. C.: Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer*, **42**, 09955-09967 (2001).
- [37] Nair L. S., Bhattacharyya S., Laurencin C. T.: Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold Based Approach. *Nanotechnologies for the Life Sciences: Wiley*, 2007.
- [38] Haghgi A. K., Akbari M.: Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Physica Status Solidi (a)*, **204**, 1830-1834 (2007).
- [39] Wei Q.: Functional nanofibers and their applications. *Woodhead Publishing Series in Textiles, Elsevier*, (2012).
- [40] Yuan X., Zhang Y., Dong C., Sheng J.: Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer International*, **53**, 1704-1710 (2004).
- [41] Laurencin C. T., Kumbar S. G., Nukavarapu S. P., James R., Hogan M. V.: Recent Patents on Electrospun Biomedical Nanostructures: An Overview. *Recent Patents on Biomedical Engineering*, **1**, 68-78 (2008).
- [42] Mit-uppatham C., Nithitanakul M., Supaphol P.: Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **205**, 2327-2338 (2004).
- [43] Casper C. L., Stephens J. S., Tassi N. G., Chase D. B., Rabolt J. F.: Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules*, **37**, 573-578 (2004).
- [44] Baumgarten P. K.: Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, **36**, 71-79 (1971).
- [45] Tripatanasuwan S., Zhong Z., Reneker D. H.: Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution. *Polymer*, **48**, 5742-5746 (2007).
- [46] Nezarati R. M., Eifert M. B., Cosgriff-Hernandez E.: Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **19**, 810-819 (2013).

- [47] Sirc J., Hobzova R., Kostina N., Munzarova, M., Juklickova M., Lhotka M., et al.: Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, 14 (2012).
- [48] Li W. J., Laurencin C. T., Cateson E. J., Tuan R. S., Ko F. K.: Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, **60**, 613-621 (2002).
- [49] Brunauer S., Emmett P. H., Teller E.: Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, **60**, 309-319 (1938).
- [50] Nayak R.: Polypropylene Nanofibers: Melt Electrospinning Versus Meltblowing, *Springer*, (2017).
- [51] Ricard-Blum S.: The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**, (2011).
- [52] Rho K. S., Jeong L., Lee G., Seo B. M., Park Y. J., Hong S. D., et al.: Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*, **27**, 1452-1461 (2006).
- [53] Balakrishnan B., Jayakrishnan A.: Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, **26**, 3941-3951 (2005).
- [54] Chong E. J., Phan T. T., Lim I. J., Zhang Y. Z., Bay B. H., Ramakrishna S., et al.: Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta biomaterialia*, **3**, 321-330 (2007).
- [55] Dubsky M., Kubinova S., Sirc J., Voska L., Zajicek R., Zajicova A., et al.: Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **23**, 931-941 (2012).
- [56] Gui-Bo Y., You-Zhu Z., Shu-Dong W., De-Bing S., Zhi-Hui D., Wei-Guo F.: Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **93**, 158-163 (2010).
- [57] Noh H. K., Lee S. W., Kim J.-M., Oh J.-E., Kim K.-H., Chung C.-P., et al.: Electrospinning of chitin nanofibers: Degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials*, **27**, 3934-3944 (2006).
- [58] Homayoni H., Ravandi S. A. H., Valizadeh M.: Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*, **77**, 656-661 (2009).

- [59] Mengistu Lemma S., Bossard F., Rinaudo M.: Preparation of Pure and Stable Chitosan Nanofibers by Electrospinning in the Presence of Poly(ethylene oxide). *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 1790 (2016).
- [60] Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P. T., Nair S. V., Tamura H.: Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, **29**, 322-337 (2011).
- [61] Ueno H., Mori T., Fujinaga T.: Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **52**, 105-115 (2001).
- [62] Cho Y.-W., Cho Y.-N., Chung S.-H., Yoo G., Ko S.-W.: Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials*, **20**, 2139-2145 (1999).
- [63] Arkoun M., Daigle F., Heuzey M. C., Aji A.: Antibacterial electrospun chitosan - based nanofibers: A bacterial membrane perforator. *Food Science & Nutrition*, **5**, 865-874 (2017).
- [64] Zheng Shu X., Liu Y., Palumbo F. S., Luo Y., Prestwich G. D.: In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, **25**, 1339-1348 (2004).
- [65] Li J., He A., Han C. C., Fang D., Hsiao B. S., Chu B.: Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends. *Macromolecular Rapid Communications*, **27**, 114-120 (2006).
- [66] Brenner E. K., Schiffman J. D., Thompson E. A., Toth L. J., Schauer C. L.: Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers*, **87**, 926-929 (2012).
- [67] Uppal R., Ramaswamy G. N., Arnold C., Goodband R., Wang Y.: Hyaluronic acid nanofiber wound dressing-production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **97**, 20-29 (2011).
- [68] Ji Y., Ghosh K., Li B., Sokolov J. C., Clark R. A. F., Rafailovich M. H.: Dual-Syringe Reactive Electrospinning of Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience*, **6**, 811-817 (2006).
- [69] Hakkarainen M.: Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products. Berlin, Heidelberg, *Springer*, **157**, 113-138 (2002).

- [70] Liu M., Duan X. P., Li Y. M., Yang D. P., Long Y. Z.: Electrospun nanofibers for wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, **76**, 1413-1423 (2017).
- [71] Yoshimoto H., Shin Y. M., Terai H., Vacanti J. P.: A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **24**, 2077-2082 (2003).
- [72] Kim P.-H., Cho J.-Y.: Myocardial tissue engineering using electrospun nanofiber composites. *BMB Reports*, **49**, 26-36 (2016).
- [73] Baker S. R., Banerjee S., Bonin K., Guthold M.: Determining the mechanical properties of electrospun poly- ϵ -caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique. *Materials Science and Engineering: C*, **59**, 203-212 (2016).
- [74] Chaturvedi T. P., Srivastava R., Srivastava A. K., Gupta V., Verma P. K.: Evaluation of metronidazole nanofibers in patients with chronic periodontitis: A clinical study. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, **2**, 213-217 (2012).
- [75] Park K. E., Kang H. K., Lee S. J., Min B.-M., Park W. H.: Biomimetic Nanofibrous Scaffolds: Preparation and Characterization of PGA/Chitin Blend Nanofibers. *Biomacromolecules*, **7**, 635-643 (2006).
- [76] Aghdam Rouhollah M., Najarian S., Shakhesi S., Khanlari S., Shaabani K., Sharifi S.: Investigating the effect of PGA on physical and mechanical properties of electrospun PCL/PGA blend nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, **124**, 123-131 (2011).
- [77] Boland E. D., Telemeco T. A., Simpson D. G., Wnek G. E., Bowlin G. L.: Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **71**, 144-152 (2004).
- [78] Itoh H., Li Y., Chan K. H. K., Kotaki M.: Morphology and mechanical properties of PVA nanofibers spun by free surface electrospinning. *Polymer Bulletin*, **73**, 2761-2777 (2016).
- [79] Alavarse A. C., de Oliveira Silva F. W., Colque J. T., da Silva V. M., Prieto T., Venancio E. C., et al.: Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, **77**, 271-281 (2017).

- [80] Kenawy E.-R., Abdel-Hay F. I., El-Newehy M. H., Wnek G. E.: Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. *Materials Science and Engineering: A*, **459**, 390-396 (2007).
- [81] Liu X., Lin T., Fang J., Yao G., Zhao H., Dodson M., et al.: In vivo wound healing and antibacterial performances of electrospun nanofibre membranes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **94**, 499-508 (2010).
- [82] Linh N. T., Lee B. T.: Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application. *Journal of Biomaterials Applications*, **27**, 255-266 (2012).
- [83] Elsayy M. A., Kim K. H., Park J. W., Deep A.: Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **79**, 1346-1352 (2017).
- [84] Lim H. A., Raku T., Tokiwa Y.: Hydrolysis of polyesters by serine proteases. *Biotechnology Letters*, **27**, 459-464 (2005).
- [85] Tokiwa Y., Calabia B. P.: Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**, 244-251 (2006).
- [86] Liu L., Li S., Garreau H., Vert M.: Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) blend films. *Biomacromolecules*, **1**, 350-359 (2000).
- [87] Stepczyńska M., Rytlewski P.: Enzymatic degradation of flax-fibers reinforced polylactide. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **126**, 160-166 (2018).
- [88] Li S., McCarthy S.: Influence of Crystallinity and Stereochemistry on the Enzymatic Degradation of Poly(lactide)s. *Macromolecules*, **32**, 4454-4456 (1999).
- [89] Li S., Tenon M., Garreau H., Braud C., Vert M.: Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from l-, dl- and meso-lactides. *Polymer Degradation and Stability*, **67**, 85-90 (2000).
- [90] Luzi F., Fortunati E., Puglia D., Petrucci R., Kenny J. M., Torre L.: Study of disintegrability in compost and enzymatic degradation of PLA and PLA nanocomposites reinforced with cellulose nanocrystals extracted from *Posidonia Oceanica*. *Polymer Degradation and Stability*, **121**, 105-115 (2015).
- [91] Makadia H. K., Siegel S. J.: Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, **3**, 1377-1397 (2011).

- [92] Hakkarainen M., Karlsson S., Albertsson A. C.: Rapid (bio)degradation of polylactide by mixed culture of compost microorganisms—low molecular weight products and matrix changes. *Polymer*, **41**, 2331-2338 (2000).
- [93] Hammonds Ryan L., Gazzola William H., Benson Roberto S.: Physical and thermal characterization of polylactic acid meltblown nonwovens. *Journal of Applied Polymer Science*, **131**, (2014).
- [94] Casasola R., Thomas N. L., Georgiadou S.: Electrospinning of poly(lactic acid): Theoretical approach for the solvent selection to produce defect-free nanofibers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **54**, 1483-1498 (2016).
- [95] Haddad T., Noel S., Liberelle B., El Ayoubi R., Aji A., De Crescenzo G.: Fabrication and surface modification of poly lactic acid (PLA) scaffolds with epidermal growth factor for neural tissue engineering. *Biomatter*, **6**, e1231276 (2016).
- [96] Maria S., Dilyana P., Nevena M., Philip R., Iliya R.: Electrospun Chitosan-Coated Fibers of Poly(L-lactide) and Poly(L-lactide)/Poly(ethylene glycol): Preparation and Characterization. *Macromolecular Bioscience*, **8**, 153-162 (2008).
- [97] Buschle-Diller G., Cooper J., Xie Z. W., Wu Y., Waldrup J., Ren X. H.: Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. *Cellulose*, **14**, 553-562 (2007).
- [98] Di Tommaso C., Bourges J. L., Valamanesh F., Trubitsyn G., Torriglia A., Jeanny J. C., et al.: Novel micelle carriers for cyclosporin A topical ocular delivery: in vivo cornea penetration, ocular distribution and efficacy studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **81**, 257-264 (2012).
- [99] Dahlin R. L., Kasper F. K., Mikos A. G.: Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B*, **17**, 349-364 (2011).
- [100] Thomas S.: Wound management and dressings. *Pharmaceutical Press*, **1**, 37-57 (1990).
- [101] Ignatova M., Manolova N., Markova N., Rashkov I.: Electrospun Non-Woven Nanofibrous Hybrid Mats Based on Chitosan and PLA for Wound-Dressing Applications. *Macromolecular Bioscience*, **9**, 102-111 (2009).
- [102] Babaeijandaghi F., Shabani I., Seyedjafari E., Naraghi Z. S., Vasei M., Haddadi-Asl V., et al.: Accelerated epidermal regeneration and improved dermal reconstruction achieved by polyethersulfone nanofibers. *Tissue Engineering Part A*, **16**, 3527-3536 (2010).

- [103] Liao S. S., Cui F. Z., Zhang W., Feng Q. L.: Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*, **69**, 158-165 (2004).
- [104] Pavlov M. P., Mano J. F., Neves N. M., Reis R. L.: Fibers and 3D mesh scaffolds from biodegradable starch-based blends: production and characterization. *Macromolecular Bioscience*, **4**, 776-784 (2004).
- [105] Zong X., Bien H., Chung C. Y., Yin L., Fang D., Hsiao B. S., et al.: Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials*, **26**, 5330-5338 (2005).
- [106] Sirc J., Kubinova S., Hobzova R., Stranska D., Kozlik P., Bosakova Z., et al.: Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 5315-5325 (2012).
- [107] Shi Y., Wei Z., Zhao H., Liu T., Dong A., Zhang J.: Electrospinning of ibuprofen-loaded composite nanofibers for improving the performances of transdermal patches. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **13**, 3855-3863 (2013).
- [108] Illangakoon U. E., Gill H., Shearman G. C., Parhizkar M., Mahalingam S., Chatterton N. P., et al.: Fast dissolving paracetamol/caffeine nanofibers prepared by electrospinning. *International Journal of Pharmaceutics*, **477**, 369-379 (2014).
- [109] Chen D. W., Liao J. Y., Liu S. J., Chan E. C.: Novel biodegradable sandwich-structured nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: an in vitro and in vivo study. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 763-771 (2012).
- [110] Zong X., Kim K., Fang D., Ran S., Hsiao B. S., Chu B.: Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, **43**, 4403-4412 (2002).
- [111] Ran Y., Zhao L., Xu Q., Yalkowsky S. H.: Solubilization of cyclosporin A. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, **2**, 23-26 (2001).
- [112] Ismailos G., Reppas C., Dressman J. B., Macheras P.: Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **43**, 287-289 (1991).
- [113] „Sandimmun - SPC“.
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0015643&tab=texts&lang=1>.
 (12.9.2018)

- [114] Osman M. M., Lulic D., Glover L., Stahl C. E., Lau T., van Loveren H., et al.: Cyclosporine-A as a neuroprotective agent against stroke: Its translation from laboratory research to clinical application. *Neuropeptides*, **45**, 359-368.
- [115] Maza A., Montaudié H., Sbidian E., Gallini A., Aractingi S., Aubin F., et al.: Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **25**, 19-27 (2011).
- [116] Cejkova J., Cejka C., Trosan P., Zajicova A., Sykova E., Holan V.: Treatment of alkali-injured cornea by cyclosporine A-loaded electrospun nanofibers - An alternative mode of therapy. *Experimental Eye Research*, **147**, 128-137 (2016).
- [117] Kymionis G. D., Bouzoukis D. I., Diakonis V. F., Siganos C.: Treatment of chronic dry eye: focus on cyclosporine. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*, **2**, 829-836 (2008).
- [118] Zhang X., Yi Y., Qi J., Lu Y., Tian Z., Xie Y., et al.: Controlled release of cyclosporine A self-nanoemulsifying systems from osmotic pump tablets: near zero-order release and pharmacokinetics in dogs. *International Journal of Pharmaceutic* **452**, 233-240 (2013).
- [119] Lonjon N., Boniface G., Feifel R., Endres R., Gimenez y Ribotta M., Privat A., et al.: Potential adverse effects of cyclosporin A on kidneys after spinal cord injury. *Spinal Cord*, **49**, 472-479 (2011).
- [120] Erdem Ş. R., Emre-Aydınğöz S., Atilla P., Çakar A. N., Dalkara T., Bolay H., et al.: Cyclosporine A-induced acute hepatotoxicity in guinea pigs is associated with endothelin-mediated decrease in local hepatic blood flow. *Life Sciences*, **88**, 753-760 (2011).
- [121] Hoorn E. J., Walsh S. B., McCormick J. A., Zietse R., Unwin R. J., Ellison D. H.: Pathogenesis of calcineurin inhibitor-induced hypertension. *Journal of Nephrology*, **25**, 269-275 (2012).
- [122] Robert N., Wong G. W., Wright J. M.: Effect of cyclosporine on blood pressure. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **20**, (2010).
- [123] Luo Y., Rana P., Will Y.: Cyclosporine A and palmitic acid treatment synergistically induce cytotoxicity in HepG2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **261**, 172-180 (2012).

- [124] Tian Y. F., Tsai C. S., Lee P. C., Chu S. H., Chien Y. S., Loong C. C., et al.: New-Onset Diabetes Mellitus in Cyclosporine-Treated Organ Transplant Patients in Taiwan: Interim Analysis (6 Months) of Postmarketing Surveillance. *Transplantation Proceedings*, **44**, 661-666 (2012).
- [125] Aksungur P., Demirbilek M., Denkbaş E. B., Vandervoort J., Ludwig A., Ünlü N.: Development and characterization of cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *Journal of Controlled Release*, **151**, 286-294 (2011).
- [126] Karn P. R., Kim H. D., Kang H., Sun B. K., Jin S. E., Hwang S. J.: Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 3791-3800 (2014).
- [127] Holan V., Chudickova M., Trosan P., Svobodova E., Krulova M., Kubinova S., et al.: Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *Journal of Controlled Release*, **156**, 406-412 (2011).
- [128] Singla A. K., Garg A., Aggarwal D.: Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **235**, 179-192 (2002).
- [129] Tian J., Stella V. J.: Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**, 1224-1235 (2008).
- [130] Amini-Fazl M. S., Mobedi H., Barzin J.: Investigation of aqueous stability of taxol in different release media. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **40**, 519-526 (2014).
- [131] Bocci G., Di Paolo A., Danesi R.: The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis*, **16**, 481-492 (2013).
- [132] Elstad N. L., Fowers K. D.: OncoGel (ReGel/paclitaxel) — Clinical applications for a novel paclitaxel delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**, 785-794 (2009).
- [133] Nehate C., Jain S., Saneja A., Khare V., Alam N., Dhar Dubey R., et al.: Paclitaxel Formulations: Challenges and Novel Delivery Options. *Current Drug Delivery*, **11**, 666-686 (2014).

- [134] Feng S.-S., Mu L., Win K. Y., Huang G.: Nanoparticles of Biodegradable Polymers for Clinical Administration of Paclitaxel. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 413-424 (2004).
- [135] Westedt U., Kalinowski M., Wittmar M., Merdan T., Unger F., Fuchs J., et al.: Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment. *Journal of Controlled Release*, **119**, 41-51 (2007).
- [136] Kang Y., Yin G., Ouyang P., Huang Z., Yao Y., Liao X., et al.: Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). *Journal of Colloid and Interface Science*, **322**, 87-94 (2008).
- [137] Ma G., Liu Y., Peng C., Fang D., He B., Nie J.: Paclitaxel loaded electrospun porous nanofibers as mat potential application for chemotherapy against prostate cancer. *Carbohydrate Polymers*, **86**, 505-512 (2011).
- [138] Ranganath S. H., Wang C. H.: Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials*, **29**, 2996-3003 (2008).
- [139] Ding Q., Li Z., Yang Y., Guo G., Luo F., Chen Z., et al.: Preparation and therapeutic application of docetaxel-loaded poly(D,L-lactide) nanofibers in preventing breast cancer recurrence. *Drug Delivery*, **23**, 2677-2685 (2016).
- [140] Herrmann S., Winter G., Mohl S., Siepmann F., Siepmann J.: Mechanisms controlling protein release from lipidic implants: effects of PEG addition. *Journal of Controlled Release*, **118**, 161-168 (2007).
- [141] Wang X., Venkatraman S. S., Boey F. Y. C., Loo J. S. C., Tan L. P.: Controlled release of sirolimus from a multilayered PLGA stent matrix. *Biomaterials*, **27**, 5588-5595 (2006).
- [142] Tan L. P., Venkatraman S. S., Sung P. F., Wang X. T.: Effect of plasticization on heparin release from biodegradable matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, **283**, 89-96 (2004).
- [143] Kang E., Robinson J., Park K., Cheng J.-X.: Paclitaxel distribution in poly(ethylene glycol)/poly(lactide-co-glycolic acid) blends and its release visualized by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Controlled Release*, **122**, 261-268 (2007).

- [144] Huang C. L., Steele T. W. J., Widjaja E., Boey F. Y. C., Venkatraman S. S., Loo J. S. C.: The influence of additives in modulating drug delivery and degradation of PLGA thin films. *NPG Asia Materials*, **5**, (2013).
- [145] Steele T. W., Huang C. L., Widjaja E., Boey F. Y., Loo J. S., Venkatraman S. S.: The effect of polyethylene glycol structure on paclitaxel drug release and mechanical properties of PLGA thin films. *Acta Biomaterialia*, **7**, 1973-1983 (2011).
- [146] Nováková L., Douša M et al: Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Praha (i.e. Hradec Králové), *Lucie Nováková*, (2013).
- [147] Nguyen D. T., Guillaume D., Rudaz S., Veuthey J. L.: Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science*, **29**, 1836-1848 (2006).
- [148] Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W.: Introduction to Modern Liquid Chromatography, **3**, *Wiley-Blackwell*, (2011).
- [149] Dass C.: Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, *Wiley-Blackwell*, (2007).
- [150] Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A. M., Kraj A., Desiderio D. M., Nibbering N. M.: Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications, *Wiley-Blackwell*, (2008).
- [151] Ansermot N., Fathi M., Veuthey J. L., Desmeules J., Rudaz S., Hochstrasser D.: Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique. *Clinical Biochemistry*, **41**, 910-913 (2008).
- [152] Tszysznick W., Borowiec A., Pawłowska E., Jazwiec R., Zochowska D., Bartłomiejczyk I., et al.: Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay. *Journal of Chromatography B*, **928**, 9-15 (2013).
- [153] Zaater M. F., Tahboub Y. R., Najib N. M.: Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric determination of cyclosporin A in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 223-230 (2005).
- [154] Fang Z. G., You B. G., Chen Y. G., Zhang J. K., Liu Y. Q., Zhang X. N., et al.: Analysis of cyclosporine A and its metabolites in rat urine and feces by liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **878**, 1153-1162 (2010).
- [155] Amini H., Ahmadiani A.: Simple determination of cyclosporine in human whole blood by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, **795**, 209-214 (2003).
- [156] Jung H. J., Gwon M. R., Park J., Seo J. J., Seong S. J., Kim E. H., et al.: Quantitative determination of cyclosporine in human whole blood by ultra-performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences*, **30**, 293-298 (2014).
- [157] Khoshsorur G., Semmelrock H. J., Rodl S., Auer T., Petek W., Iberer F., et al.: Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporin A and its metabolites M1, M17 and M21. *Journal of Chromatography B*, **690**, 367-372 (1997).
- [158] Magni F., Pereira S., Leoni M., Grisenti G., Galli Kienle M.: Quantitation of cyclosporin A in whole blood by liquid chromatography/stable isotope dilution electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **36**, 670-676 (2001).
- [159] Hatsis P., Volmer D. A.: Evaluation of a cyano stationary phase for the determination of tacrolimus, sirolimus and cyclosporin A in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **809**, 287-294 (2004).
- [160] Golabi N., Tajerzadeh H., Ghassempour A.: A rapid and selective LC method for simultaneous determination of cyclosporin a and its major metabolite (AM1) in human serum at room temperature. *Talanta*, **59**, 1089-1094 (2003).
- [161] Vollenbroeker B., Koch J. H., Fobker M., Suwelack B., Hohage H., Muller U.: Determination of cyclosporine and its metabolites in blood via HPLC-MS and correlation to clinically important parameters. *Transplantation proceedings*, **37**, 1741-1744 (2005).
- [162] Ouyang J., Baeyens W. R., Duan J., Delanghe J.: Improvement of cyclosporin A determination in whole blood by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, **17**, 404-410 (2003).

- [163] Bonifacio F. N., Giocanti M., Reynier J. P., Lacarelle B., Nicolay A.: Development and validation of HPLC method for the determination of cyclosporin A and its impurities in neoral capsules and its generic versions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **49**, 540-546 (2009).
- [164] Chimalakonda A. P., Shah R. B., Mehvar R.: High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin A in rat blood and liver using a commercially available internal standard. *Journal of Chromatography B*, **772**, 107-114 (2002).
- [165] Li A. C., Li Y. H., Guirguis M. S., Caldwell R. G., Shou W. Z.: Advantages of using tetrahydrofuran-water as mobile phases in the quantitation of cyclosporin A in monkey and rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**, 277-284 (2007).
- [166] Muller A., Jungen H., Iwersen-Bergmann S., Sterneck M., Andresen-Streichert H.: Analysis of cyclosporin a in hair samples from liver transplanted patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, **35**, 450-458 (2013).
- [167] Huang Y., Xu Z. S., Zheng S. L., Hou Y.: A rapid LC-MS/MS Method for the Quantification of Cyclosporine A in Rabbit Whole Blood and Plasma. *Latin American Journal of Pharmacy*, **32**, 1035-1041 (2013).
- [168] Taylor P. J., Jones C. E., Martin P. T., Lynch S. V., Johnson A. G., Pond S. M.: Microscale high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry assay for cyclosporin A in blood. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **705**, 289-294 (1998).
- [169] Xia X. J., Peng J., Zhang P. X., Jin D. J., Liu Y. L.: Validated HPLC Method for the Determination of Paclitaxel-related Substances in an Intravenous Emulsion Loaded with a Paclitaxel–Cholesterol Complex. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **75**, 672-679 (2013).
- [170] Zeng J., Yang L., Liang Q., Zhang X., Guan H., Xu X., et al.: Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *Journal of Controlled Release*, **105**, 43-51 (2005).
- [171] Ooya T., Lee J., Park K.: Effects of ethylene glycol-based graft, star-shaped, and dendritic polymers on solubilization and controlled release of paclitaxel. *Journal of Controlled Release*, **93**, 121-127 (2003).

- [172] Ruan G., Feng S.-S.: Preparation and characterization of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid) (PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials*, **24**, 5037-5044 (2003).
- [173] Kim D. W., Yousaf A. M., Li D. X., Kim J. O., Yong C. S., Cho K. H., et al.: Development of RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and curcumin in rat plasma: Validation and stability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12**, 105-113 (2017).
- [174] Rezazadeh M., Emami J., Mostafavi A., Rostami M., Hassanzadeh F., Sadeghi H., et al.: A Rapid and Sensitive HPLC Method for Quantitation of Paclitaxel in Biological Samples using Liquid-Liquid Extraction and UV Detection: Application to Pharmacokinetics and Tissues Distribution Study of Paclitaxel Loaded Targeted Polymeric Micelles in Tumor Bearing Mice. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **18**, 647-660 (2015).
- [175] Tong X., Zhou J., Tan Y.: Determination of Paclitaxel in Rat Plasma by LC—MS—MS. *Journal of Chromatographic Science*, **44**, 266-271 (2006).
- [176] Sottani C., Minoia C., D'Incalci M., Paganini M., Zucchetti M., Traldi P.: High - performance liquid chromatography tandem mass spectrometry procedure with automated solid phase extraction sample preparation for the quantitative determination of paclitaxel (Taxol®) in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **12**, 251-255 (1998).
- [177] Liu W., Wei J., Chen Y.: Electrospun poly(l-lactide) nanofibers loaded with paclitaxel and water-soluble fullerenes for drug delivery and bioimaging. *New Journal of Chemistry*, **38**, 6223-6229 (2014).
- [178] Kim S. C., Yu J., Lee J. W., Park E.-S., Chi S.-C.: Sensitive HPLC method for quantitation of paclitaxel (Genexol®) in biological samples with application to preclinical pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**, 170-176 (2005).
- [179] Lovich M. A., Creel C., Hong K., Hwang C. W., Edelman E. R.: Carrier proteins determine local pharmacokinetics and arterial distribution of paclitaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **90**, 1324-1335 (2001).

13 Publikace

13.1 Publikace 1

Hřib, J.; Širc, J.; Hobzová, R.; Hampejsová, Z.; Bosáková, Z.; Munzarová, M.; Michálek, J.: Nanofibers for drug delivery – incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure. Belstein Journal of Nanotechnology, 6, 1939–1945 (2015).



Nanofibers for drug delivery – incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure

Jakub Hrib¹, Jakub Sirc^{*1}, Radka Hobzova¹, Zuzana Hampejsova², Zuzana Bosakova², Marcela Munzarova³ and Jiri Michalek¹

Full Research Paper

[Open Access](#)

Address:

¹The Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic, ²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic and ³Nanovia Ltd., Podkrusnohorska 271, 436 03 Litvinov-Chuderin, Czech Republic

Email:

Jakub Sirc^{*} - sirc@imc.cas.cz

* Corresponding author

Keywords:

nanofibers; nanofibrous carriers; needle-free electrospinning; release kinetics

Beilstein J. Nanotechnol. **2015**, *6*, 1939–1945.

doi:10.3762/bjnano.6.198

Received: 07 May 2015

Accepted: 14 September 2015

Published: 25 September 2015

Associate Editor: K. Koch

© 2015 Hrib et al; licensee Beilstein-Institut.

License and terms: see end of document.

Abstract

Nanofibers were prepared from polycaprolactone, polylactide and polyvinyl alcohol using Nanospider™ technology. Polyethylene glycols with molecular weights of 2 000, 6 000, 10 000 and 20 000 g/mol, which can be used to moderate the release profile of incorporated pharmacologically active compounds, served as model molecules. They were terminated by aromatic isocyanate and incorporated into the nanofibers. The release of these molecules into an aqueous environment was investigated. The influences of the molecular length and chemical composition of the nanofibers on the release rate and the amount of released polyethylene glycols were evaluated. Longer molecules released faster, as evidenced by a significantly higher amount of released molecules after 72 hours. However, the influence of the chemical composition of nanofibers was even more distinct – the highest amount of polyethylene glycol molecules released from polyvinyl alcohol nanofibers, the lowest amount from polylactide nanofibers.

Introduction

To date, numerous drug delivery systems have been developed, such as hydrogels that carry drugs or highly sophisticated electronic microchips [1,2]. The required release rates of the therapeutic agents depend on the medicinal application; for example, the optimal release time of hormones is in the range of months, while peroral administration requires that the drug is released as

fast as possible [3]. Nano-shaped materials are advantageous for the rapid release of the drugs due to their high surface area/volume ratio.

Due to the internal architecture, nanofibers are well suited for various medicinal applications, such as carriers for cell cultiva-

tion [4,5], tissue engineering scaffolds [6] or wound dressings [7]. The incorporation of biologically or pharmacologically active compounds into the nanofibers may be very useful for these applications [8].

Although several methods of nanofiber preparation have been invented [9], electrospinning technique can be considered as a simple and versatile method for the production of continuous polymeric nanofibrous mats formed of nano- to micro-sized fibers [10-14]. Moreover, this fabrication enables to set-up process parameters for facile control of nanofibrous mat properties such as surface area, fiber diameter, porosity, and thickness [15].

In the recent years, much effort has been devoted to modifying the electrospinning process, so coaxial, multi-jet, or side-by-side techniques were developed [16,17]. However, these techniques are of a little interest in terms of potential mass production.

In contrast, NanospiderTM technology as an alternative approach based on a needle-free method represents the perspectives for industry due to the high production capacity, stability and easy maintenance [18,19]. This technology is relatively universal and nanofibrous materials from a variety of polymers can be obtained. Moreover, adjusting the process parameters such as the concentration of polymer in solution, electric field strength, tip-to-collector distance or temperature the materials enables to control the final structure of the prepared materials [6,20].

Generally, nanofibers that carry drugs follow several basic designs – nanofibers with homogenous structures in which the drug is dispersed throughout the polymer matrix, core-shell nanofibers for which the matrix carrying the drug is covered by pure polymer [21,22] and nanofibers with the pharmacologically active compounds immobilized on their surface [16,23]. Nowadays, also more sophisticated structures of nanofibrous mats are described, such as multilayer constructs [16]. The two basic fiber designs are the primary factors that affect the diffusion mechanism and drug release. For homogenous nanofibers, the rate of release decreases with time, because the drug must travel progressively longer distances to diffuse to the fiber periphery, which requires more time. Contrary, the core-shell

design provides the delivery system with the diffusion rate of the therapeutic agent stable throughout the life. The structure of the nanofibrous drug delivery system plays a key role in the drug release process. The fiber diameter, specific surface area, size and total volume of pores significantly influence the convection and diffusion of the liquid in which the nanofibers are immersed. Therefore, the drug release is also influenced. The great advantage of nanofibrous materials is that their structure, i.e., their fiber diameter, density and thickness of the nanofibrous layer, can be tailored to various requirements by varying the process parameters [24].

In this work, we designed a nanofibrous carrier in which the model molecule is dispersed throughout the polymer matrix. For the purposes to evaluate the influence of molecular size on the release rate and the total released amount in general, polyethylene glycols with molecular weights of 2,000, 6,000, 10,000 and 20,000 g/mol were selected as model molecules. Polyethylene glycol (PEG) is a hydrophilic polyether commercially available in various molecular weights with narrow distribution. It is widely used in various medical applications, for example as surfactant, solvent or tablet excipient. Apart from these applications the PEG has significant effect on the drug release. It has been shown that addition of PEG molecules is an efficient way to modify the release of hydrophobic paclitaxel from poly(lactic acid-co-glycolic acid) matrix [25] or proteins from lipidic implants [26]. In present work the PEGs were added to the solutions of polymers and were incorporated in nanofibers made from polycaprolactone (PCL), polylactide (PLA) and polyvinyl alcohol (PVA) during electrospinning. The release behavior of these molecules into the water environment was investigated and the results are discussed in terms of molecular weight of PEGs and chemical composition of nanofibers.

Results and Discussion

Prior to use, linear PEGs were terminated with phenyl isocyanate to incorporate spectrophotometrically detectable groups (Figure 1). The reaction products were confirmed by NMR, elemental analysis, IR spectroscopy and melting point measurements.

The needle-free electrospinning process was optimized for each type of nanofiber with respect to the different physicochemical properties of polymers. SEM images revealed that the textures

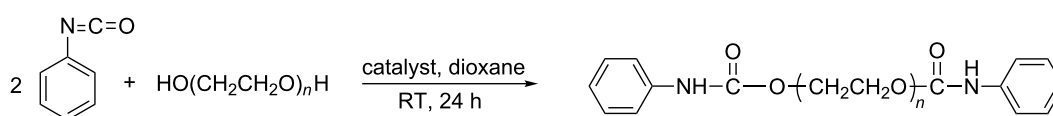


Figure 1: Derivatization reaction scheme of PEG with phenyl isocyanate.

of all resultant samples were homogenous and free of heterogeneities or artifacts (Figure 2a–c). It can be expected that the addition of PEGs will change the physicochemical properties of

the polymer solution in electrospinning, however, it was not noticeable in concentration of PEG 3%. The addition of PEG molecules to the electrospun mixture did not noticeably influ-

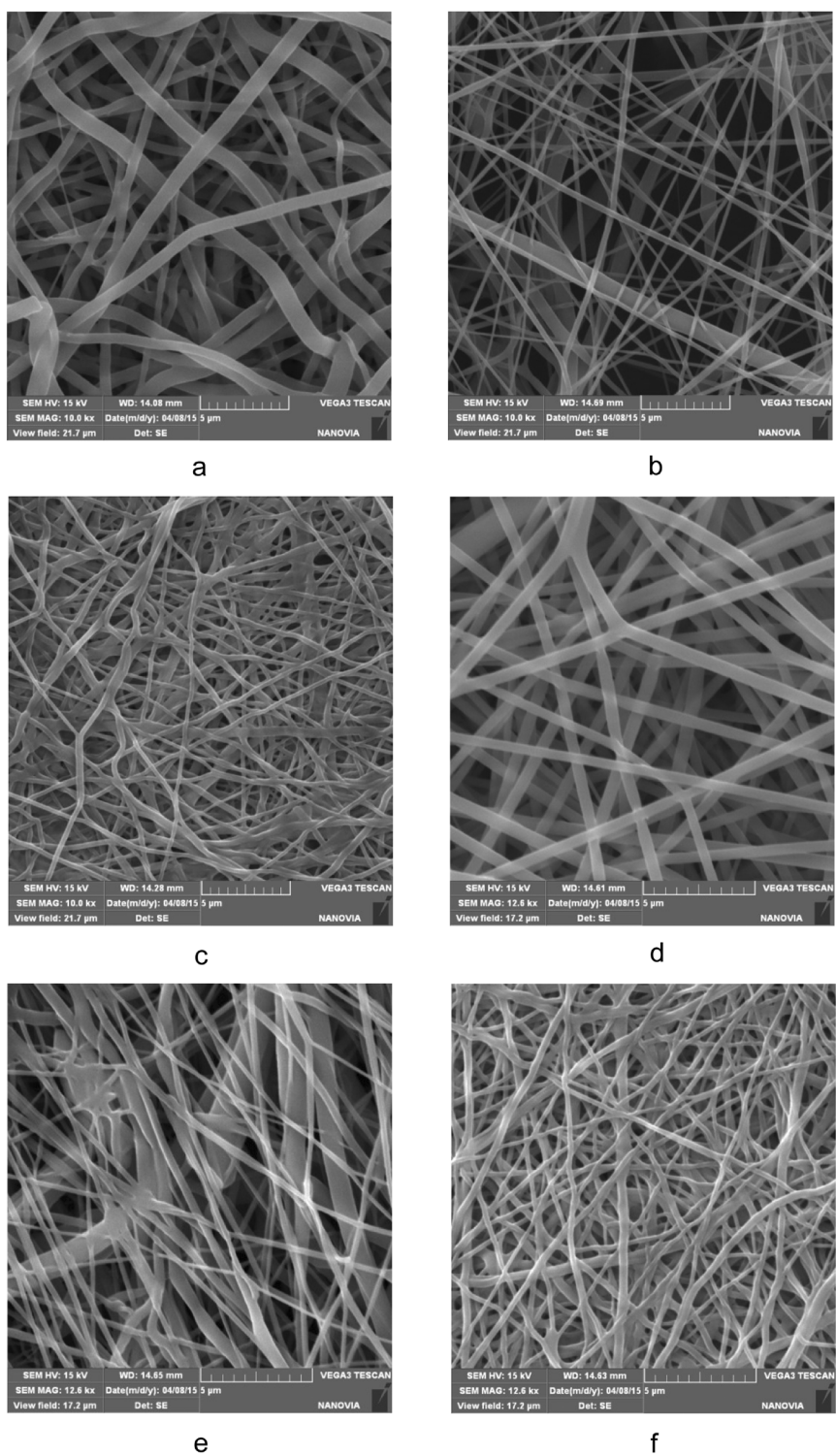


Figure 2: SEM images of PLA (a, d), PCL (b, e) and PVA (c, f) nanofibers prepared without (a–c) and with (d–f) addition of PEG 20 molecules.

ence the nanofiber structure. According to the results of morphological characterization, the nanofibrous structures remained similar to those of nanofibers without model molecules, even for nanofibers that contained PEG 20 (Figure 2d–f). Clusters or other artifacts were not detected.

The properties and behavior of each polymer during electrospinning were unique. The process parameters, such as the polymer mixture composition, voltage, electrode distance, temperature or humidity, were individually and precisely adjusted in order to produce structures that were as similar as possible. However, the morphological characterization revealed several differences in the parameters of resultant samples (Table 1). The thinnest fibers with a mean fiber diameter 157 nm were prepared from PVA, and the thickness of PCL nanofibers (179 nm) was almost similar to this value. PLA fibers were the thickest, with a diameter of 282 nm. The surface areas corresponded to the fiber diameters; the surface area was largest for the thinnest PVA fibers (7.7 m²/g) and smallest for PLA (4.7 m²/g). These differences are due to the needle-free electrospinning method. Needle-free electrospinning does not allow the fine-tuning of parameters, but the disadvantage of this method is balanced by the fact that it may allow the large-scale production. The possible effect of these characteristics is discussed further below.

Table 1: Morphological characterization of nanofibrous carriers.

	fiber diameter (nm)	porosity (%)	surface area (m ² /g)
PCL	179	77.4	6.0
PVA	157	78.2	7.7
PLA	282	86.6	4.7

The porosities determined by mercury porosimetry ranged from 77.4% for PCL nanofibers to 86.6% for PLA nanofibers. These differences may have slightly influenced the release of incorporated molecules. However, the mercury porosimetry measurements were conducted in a vacuum. In an aqueous environment, in which the nanofibers are supposed to be used, the porosity may differ due to the variable water content between nanofibers, which is the result of their variable swelling.

The release experiments revealed two trends – the release rate depends on the molecular weight of model PEGs as well as on the type of nanofibrous carrier. Although we expected that long molecules will be anchored in nanofibrous structures and so more strongly retained, we observed the opposite effect. Larger molecules were apparently released faster than smaller ones (see Figure 3). Figure 4 depicts the amount of PEG molecules released within 72 hours. Except for the amount of PEG 10

released from PCL nanofibers, which we attribute to random error, the percentage of PEG that was released positively correlated with molecular size. The most distinct increase in the release rate was observed for PEG 20, whose release was approximately 30% higher than that of PEG 10. This effect was attributed to the insufficient interweaving of PEG and chains of the polymer matrix during the electrospinning process. Expecting the well interweaving of PEG molecules, their release is primarily influenced by the dissolution rate and consequent transport through the material, i.e., the molecules with lower molecular weight and so higher mobility should release faster. However, our samples behaved differently. Our findings suggest that chains of PEG likely form domains that are separated from nanofibers and these domains accelerate their release from the material. This effect is more apparent in longer chains. Shorter chains are more mobile, which allows them to partially penetrate the nanofibers. In this case, the distance from the surface controls the dissolution rate. The longer chains of PEG 20 contain parts of molecules which remain near

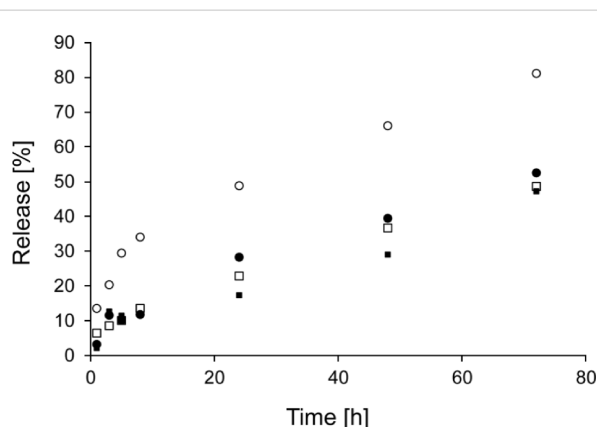


Figure 3: Release of PEG from PVA nanofibers, PEG 2 (filled squares), PEG 6 (open squares), PEG 10 (filled circles), PEG 20 (open circles).

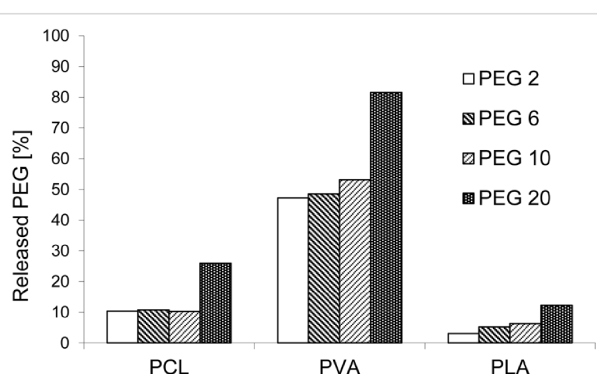


Figure 4: Amount of PEG molecules of various molecular weights released from PCL, PVA and PLA nanofibers immersed to distilled water within 72 h at 20 °C.

the surface and are more accessible to water. This effect accelerates the release of longer PEG chains compared to shorter ones.

The formation of PEG domains can be also supported by the formation of a crystalline phase. Larger PEGs are more likely to crystallize. During the formation of a crystalline phase, the domains of the crystalline polymer are formed separately from the remaining system, which makes them more accessible to water and easier to release.

The release of PEG molecules from PCL, PVA and PLA nanofibers varied, as evidenced by the amount of released model molecules after 72 h (Figure 4) compared to the amount of PEG 2 released from various nanofibers (Figure 5). PEGs of other molecular weights also followed similar trends. This effect may be partly due to the varied chemical composition of nanofibers as well as differences in their morphologies. From a chemical point of view, the fact that PEGs released fastest from PVA nanofibers can be explained by the interaction of PVA with water molecules during immersion – the PVA molecular structure contains hydroxy groups, which interact with water molecules at the expense of the interaction with PEG molecules, which are consequently released faster. The lower polarity of PCL and PLA and therefore weaker interaction with water molecules may result in such distinct differences between the release rates from PVA. The higher amount of released PEG from PVA brings the question whether it is not related to the dissolution of the fibers in an aqueous environment. Therefore, the SEM images of PVA nanofibers after release experiments were made (Figure 6). No significant changes in structure compared to starting material are apparent suggesting that the thermal crosslinking of the PVA fibers during the preparation ensures sufficient stability of the fibrous structure during the immersion into the water. Therefore, it can be concluded that the release kinetics are given by effects discussed above.

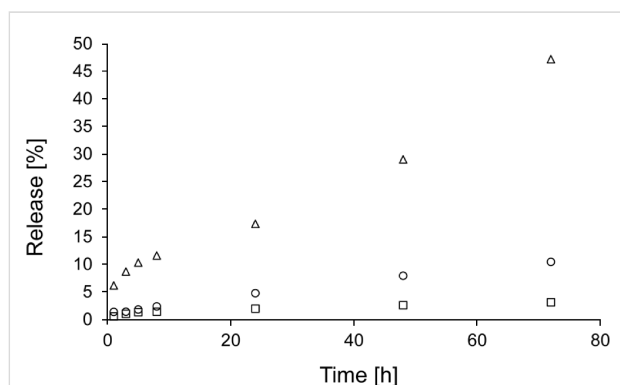


Figure 5: Release of PEG 2 from nanofibers prepared from PCL (open circles), PLA (open squares) and PVA (open triangles).

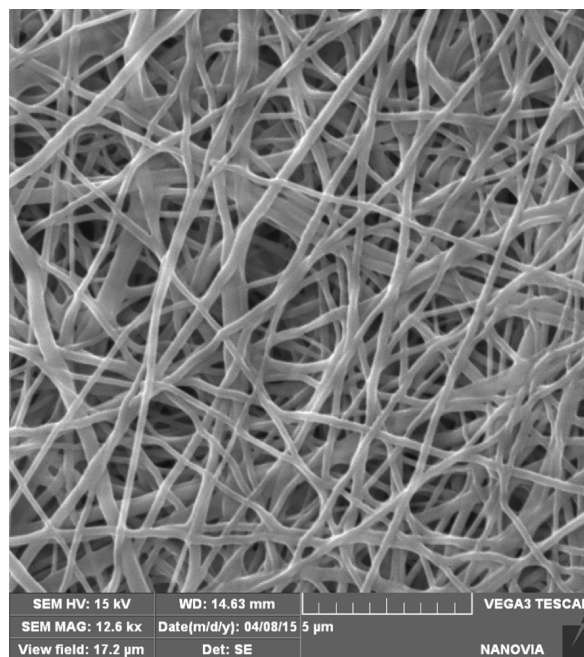


Figure 6: SEM image of PVA nanofibers containing PEG 20 after immersion into the water for 72 h.

Despite attempts to ensure the similar nanofibrous structures, the varied morphology may be also responsible for the variation in the PEG release rate. The release of model molecules directly correlated with the specific surface areas and inversely correlated with the fiber diameters. A higher specific surface area provides a larger area for interaction with the surrounding liquid and consequent faster release of drug molecules. A larger fiber diameter increases the distance that molecules located in the middle of fiber must diffuse through to reach the periphery of the material, which prolongs release times. The porosity of nanofibers did not appear to affect the release rate. A larger porosity may increase the volume of liquid that surrounds the fibers and consequently accelerate the release, but this effect was not observed and may have been suppressed by other factors, i.e., the degree of hydrophilicity of nanofibers.

The obtained results showed the successful preparation of morphologically comparable nanofibrous materials with incorporated PEG molecules. It was demonstrated that combination of chemically different polymers and PEG of various molecular weights leads to materials with significantly different release kinetics of PEGs. These basic findings on relationships between PEG size and polymer structure on release kinetics were done in respect that even PEG serves as additive compound it has main effect on the release of potentially incorporated drug [27,28]. Especially, the addition of PEG has a great impact in systems

with hydrophobic drugs (e.g., cyclosporine, paclitaxel) in which it can overcome the complication with homogenous dispersion of drug in the polymer matrix and mainly can facilitate the release into aqueous media in which the solubility of such drugs are very low.

Conclusion

The release kinetics of polyethylene glycol molecules of various molecular weights from nanofibers prepared from polycaprolactone, polylactide and polyvinyl alcohol were assessed. The release rate and the total released amount positively correlated with molecular weight of the incorporated molecules. This trend was observed for all of the prepared nanofibrous carriers. The strongest effect appeared for PVA fibers containing hydroxy functional groups, i.e., 90% of PEG 20 model molecules released within 72 h. These findings can be applied to develop nanofibrous drug carriers for the local delivery of hydrophobic pharmacologically active compounds, because the release of auxiliary hydrophilic molecules can effectively control the drug release kinetics.

Experimental

Reagents

PCL ($M_w \approx 80$ kDa) and trifluoroacetic acid were obtained from Sigma, St. Louis, MO, USA. PVA was provided by Nippon Gohsei, Osaka, Japan. PLA ($M_w \approx 100$ kDa) was kindly provided as a sample from Natureworks, Blair, NE, USA. Phosphoric acid (85 wt % aqueous solution), *N,N*-dimethylformamide, tetrahydrofuran and dichloromethane were obtained from Penta, Prague, Czech Republic. The deionized water was produced by Milli-Q Millipore, Bedford, MA. Polypropylene nonwoven spunbond material used as a substrate for all polymers was purchased from ATEX, Milan, Italy. Polyethylene glycols with molecular weights of 2,000, 6,000, 10,000 and 20,000 were supplied by RAPP Polymere GmbH, Tübingen, Germany.

Synthesis of derivatized polyethylene glycols

Prior to the derivatization reaction, the PEGs were dried as follows: the PEGs were dissolved in dry butyl acetate to obtain 10 wt % solutions, 4 Å molecular sieves were added and the solutions were stirred at room temperature (RT) for 3 days. The water content was determined using the Karl-Fischer method and was reduced from ca. 6000 ppm (not dried) to ca. 400 ppm (dried).

The derivatization reaction scheme is shown in Figure 1. Ten grams of PEG was dissolved in 80 mL of dry dioxane, and a 5% excess of the derivatization agent phenyl isocyanate was added. Dibutyltin dilaurate (500 ppm) was used to increase the reaction rate between phenyl isocyanate and the hydroxy groups and

to ensure the double derivatization of PEGs. The reaction solution was stirred for 7 h. The reaction yield was 89.5%.

Preparation of nanofibers

The nanofibers were prepared with the Nanospider™ technology [21,22]. The process parameters used for each polymer were optimized in order to produce nanofiber samples of similar structures and a thickness (weight per unit area) of 5 g/m². Model PEGs of various molecular weights were added to the polymer mixtures at a concentration of 3 wt %. PCL was dissolved in a 1:1 (w/w) mixture of tetrahydrofuran and *N,N*-dimethylformamide at a concentration of 10 wt %. The electrospinning parameters were 6 rpm, 15 cm and 5.5 kV/cm. The maximum temperature was 30 °C, and the maximum relative humidity was 35%. PLA was dissolved in a 2:1 (w/w) mixture of dichloromethane and trifluoroacetic acid at a concentration of 12 wt %. This mixture was held at 22 °C to maintain the viscosity of this polymer (due to very fast solvent evaporation). The electrospinning parameters were 4 rpm, 15 cm and 5.3 kV/cm. PVA was dissolved in water/phosphoric acid at a concentration of 11 wt %. The electrospinning parameters were 2 rpm, 13 cm and 45–55 kV/cm. The relative humidity was 25–30%, and the temperature was 22 °C. The PVA layers were crosslinked thermally in a drying oven at 145 °C for 15 min to reach their proper stability [27,28].

Characterization of nanofibers

The structures of the prepared nanofibers were observed with a scanning electron microscope TS 5130 VEGA, TESCAN, Czech Republic. The samples were dried at 80 °C under vacuum overnight and platinum sputtered. Similar preparation procedure was used for the samples after immersion into the water for 72 h. The mean fiber diameter was determined from 30 measurements on the SEM images at a magnification of 5000×. Mercury porosimetry measurements were made using an Autopore IV 9500 porosimeter, Micromeritics, USA, and the specific surface areas were calculated based on nitrogen adsorption/desorption isotherms recorded on an ASAP 2020 apparatus Micromeritics, USA.

In vitro polyethylene glycol release assay

Samples of nanofibers (0.3 g) were placed into glass vials filled with 5 mL of distilled water. The samples were continuously shaken at room temperature for 5 days. At specific time points, 0.5 mL of solution was withdrawn, and the same amount of fresh water was added. The concentration of PEG was determined based on a calibration curve using a high performance liquid chromatography apparatus Shimadzu Prominence 20, USA with UV detection at a wavelength of 234 nm. The accumulative weight and relative percentage of the released PEGs were then calculated. This experiment was conducted for each

of the above-mentioned nanofibers (PCL, PLA and PVA) and PEGs of various molecular weights.

Acknowledgement

The financial support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant No. EE2.3.30.0029), the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 13-00939S), the Charles University in Prague (project no. 307115 and project SVV) and BIOCEV, the European Regional Development Fund (grant number CZ.1.05/1.1.00/02.0109) is gratefully acknowledged.

References

- Langer, R.; Peppas, N. A. *AIChE J.* **2003**, *49*, 2990–3006. doi:10.1002/aic.690491202
- Geipel, A.; Goldschmidtboeing, F.; Jantschke, P.; Esser, N.; Massing, U.; Woias, P. *Biomed. Microdevices* **2008**, *10*, 469–478. doi:10.1007/s10544-007-9147-2
- Nagy, Zs. K.; Nyúl, K.; Wagner, I.; Molnár, K.; Marosi, Gy. *eXPRESS Polym. Lett.* **2010**, *4*, 763–772. doi:10.3144/expresspolymlett.2010.92
- Ahmed, I.; Ponery, A. S.; Nur-E-Kamal, A.; Kamal, J.; Meshel, A. S.; Sheetz, M. P.; Schindler, M.; Meiners, S. *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *301*, 241–249. doi:10.1007/s11010-007-9417-6
- Shih, Y.-R. V.; Chen, C.-N.; Tsai, S.-W.; Wang, Y. J.; Lee, O. K. *Stem Cells* **2006**, *24*, 2391–2397. doi:10.1634/stemcells.2006-0253
- Barnes, C. P.; Sell, S. A.; Boland, E. D.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 1413–1433. doi:10.1016/j.addr.2007.04.022
- Rieger, K. A.; Birch, N. P.; Schiffman, J. D. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4531–4541. doi:10.1039/c3tb20795a
- Leung, V.; Ko, F. *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 350–365. doi:10.1002/pat.1813
- Jayaraman, K.; Kotaki, M.; Zhang, Y.; Mo, X.; Ramakrishna, S. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2004**, *4*, 52–65. doi:10.1166/jnn.2004.078
- Huang, Z.-M.; Zhang, Y.-Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. *Compos. Sci. Technol.* **2003**, *63*, 2223–2253. doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7
- Luo, C. J.; Stoyanov, S. D.; Stride, E.; Pelan, E.; Edirisinghe, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4708–4735. doi:10.1039/c2cs35083a
- Bellan, L. M.; Craighead, H. G. *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 304–309. doi:10.1002/pat.1790
- Sun, B.; Long, Y. Z.; Zhang, H. D.; Li, M. M.; Duvail, J. L.; Jiang, X. Y.; Yin, H. L. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 862–890. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002
- Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 325–347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- Thompson, C. J.; Chase, G. G.; Yarin, A. L.; Reneker, D. H. *Polymer* **2007**, *48*, 6913–6922. doi:10.1016/j.polymer.2007.09.017
- Hu, X.; Liu, S.; Zhou, G.; Huang, Y.; Xie, Z.; Jing, X. *J. Controlled Release* **2014**, *185*, 12–21. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.018
- Persano, L.; Camposeo, A.; Tekmen, C.; Pisignano, D. *Macromol. Mater. Eng.* **2013**, *298*, 504–520. doi:10.1002/mame.201200290
- Jirsak, O.; Sanetrik, F.; Lukas, D.; Kotek, L.; Martinova, L.; Chaloupek, J. Method of nanofibers production from polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. U.S. Patent 20060290031, 2006.
- Lukas, D.; Sarkar, A.; Pokorny, P. *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*, 084309. doi:10.1063/1.2907967
- Ryu, Y. J.; Kim, H. Y.; Lee, K. H.; Park, H. C.; Lee, D. R. *Eur. Polym. J.* **2003**, *39*, 1883–1889. doi:10.1016/S0014-3057(03)00096-X
- Xu, X.; Chen, X.; Ma, P.; Wang, X.; Jing, X. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 165–170. doi:10.1016/j.ejpb.2008.03.010
- Jiang, H.; Wang, L.; Zhu, K. *J. Controlled Release* **2014**, *193*, 296–303. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.025
- Son, Y. J.; Kim, W. J.; Yoo, H. S. *Arch. Pharmacol. Res.* **2014**, *37*, 69–78. doi:10.1007/s12272-013-0284-2
- Saraf, A.; Baggett, L. S.; Raphael, R. M.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G. *J. Controlled Release* **2010**, *143*, 95–103. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.009
- Steele, T. W. J.; Huang, C. L.; Widjaja, E.; Boey, F. Y. C.; Loo, J. S. C.; Venkatraman, S. S. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1973–1983. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.002
- Herrmann, S.; Winter, G.; Mohl, S.; Siepmann, F.; Siepmann, J. *J. Controlled Release* **2007**, *118*, 161–168. doi:10.1016/j.jconrel.2006.11.001
- Sirc, J.; Kubinova, S.; Hobzova, R.; Stranska, D.; Kozlík, P.; Bosakova, Z.; Marekova, D.; Holan, V.; Sykova, E.; Michálek, J. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 5315–5325. doi:10.2147/IJN.S35781
- Širc, J.; Hobzová, R.; Kostina, N.; Munzarová, M.; Jukličková, M.; Lhotka, M.; Kubinová, Š.; Zajícová, A.; Michálek, J. *J. Nanomater.* **2012**, No. 327369. doi:10.1155/2012/327369

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Nanotechnology* terms and conditions: (<http://www.beilstein-journals.org/bjnano>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: [doi:10.3762/bjnano.6.198](https://doi.org/10.3762/bjnano.6.198)

13.2 Publikace 2

Širc, J.; Hampejsová, Z.; Trnovská, J.; Kozlík, P.; Hřib, J.; Hobzová R.; Zajícová, A.; Holáň, V.; Bosáková, Z.: Cyclosporine A Loaded Electrospun Poly(D,L-Lactic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Nanofibers: Drug Carriers Utilizable in Local Immunosuppression. *Pharmaceutical Research*, **34**, 7, 1391-1401, (2017).

Cyclosporine A Loaded Electrospun Poly(D,L-Lactic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Nanofibers: Drug Carriers Utilizable in Local Immunosuppression

Jakub Sirc¹ · Zuzana Hampejsova² · Jana Trnovska² · Petr Kozlik² · Jakub Hrib¹ · Radka Hobzova¹ · Alena Zajicova³ · Vladimir Holan³ · Zuzana Bosakova²

Received: 24 November 2016 / Accepted: 31 March 2017 / Published online: 12 April 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

ABSTRACT

Purpose The present study aims to prepare poly(D,L-lactic acid) (PLA) nanofibers loaded by the immunosuppressant cyclosporine A (CsA, 10 wt%). Amphiphilic poly(ethylene glycol)s (PEG) additives were used to modify the hydrophobic drug release kinetics.

Methods Four types of CsA-loaded PLA nanofibrous carriers varying in the presence and molecular weight (MW) of PEG (6, 20 and 35 kDa) were prepared by needleless electrospinning. The samples were extracted for 144 h in phosphate buffer saline or tissue culture medium. A newly developed and validated LC-MS/MS method was utilized to quantify the amount of released CsA from the carriers. *In vitro* cell experiments were used to evaluate biological activity.

Results Nanofibers containing 15 wt% of PEG showed improved drug release characteristics; significantly higher release rates were achieved in initial part of experiment (24 h). The highest released doses of CsA were obtained from the nanofibers with PEG of the lowest MW (6 kDa). *In vitro* experiments on ConA-stimulated spleen cells revealed the biological activity of the released CsA for the whole study period of 144 h and

nanofibers containing PEG with the lowest MW exhibited the highest impact (inhibition).

Conclusions The addition of PEG of a particular MW enables to control CsA release from PLA nanofibrous carriers. The biological activity of CsA-loaded PLA nanofibers with PEG persists even after 144 h of previous extraction. Prepared materials are promising for local immunosuppression in various medical applications.

KEY WORDS cyclosporine A · drug release kinetics · LC-MS/MS · poly(D,L-lactic acid) nanofibers · poly(ethylene glycol)

ABBREVIATIONS

ConA	Concanavalin
CsA	Cyclosporine A
HPLC	High-performance liquid chromatography
IL-2	Interleukin-2
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
MW	Molecular weight
PBS	Phosphate buffer saline
PEG	Poly(ethylene glycol)
PLA	Poly(D,L-lactic acid)
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
SEM	Scanning electron microscopy

Jakub Sirc and Zuzana Hampejsova have contributed equally to this work.

✉ Zuzana Bosakova
bosakova@natur.cuni.cz

¹ Department of Polymer Networks and Gels, Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

³ Department of Transplantation Immunology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

INTRODUCTION

Cyclosporine A (CsA) is a widely-used immunosuppressive drug prescribed particularly for patients undergoing organ transplantation. However, systemic CsA therapy is connected with serious side effects, such as renal dysfunction, hypertension, malignancies or liver impairment. The effects

are dose-dependent. Thus, transplant patients are highly susceptible to the side effects, as their treatment requires high doses that are administered for long time periods (1). The local administration of CsA has the potential to reduce the incidence of adverse reactions connected with its systemic administration. CsA encapsulated in liposomes has been studied by several authors (2–4) to enhance its therapeutic effect on ocular diseases, such as dry eye syndrome. To control CsA release and enhance its oral bioavailability, self-nanoemulsifying drug delivery systems based on osmotic pump tablets have been proposed (3). Other studies have been focused on the cellular toxicity, release kinetics and tissue penetration in rats using CsA-loaded poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles (4,5).

CsA can be quantified by immunoassays and high-performance liquid chromatography (HPLC). The main disadvantage of immunoassays is the cross-reaction of monoclonal antibodies with CsA metabolites, which leads to positive bias in CsA blood levels that may increase the risk for the patient because of the narrow therapeutic index of CsA (6,7). Therefore, HPLC is widely applied in the analyses of CsA using UV (8–10) or mass spectrometric detection (11–13). Recently liquid chromatography methods in combination with tandem mass spectrometric detection (LC-MS/MS) have been applied for the determination of CsA in human and animal biological samples (14–16).

Nanofibers formed from natural and synthetic polymers are perspective materials for use in various biological fields (17). In medicine, nanofibers can be used for the facilitation of wound healing (18,19), drug delivery systems (20–22) or scaffolds for tissue engineering or cell-based therapy (23–26). The application of nanofibers based on poly(D,L-lactic acid) (PLA), poly(ϵ -caprolactone), polyurethane, or PLGA as drug carriers for various antibiotics has been tested (27–29). Polymeric materials are particularly useful because of their biocompatibility and ability to adjust the degradation rate, physical, and mechanical properties over a wide range by varying the morphology and chemical composition of the co(polymers).

PLA nanofibers were loaded with CsA to study their pharmacological activity, release profile in culture medium and the ability of these nanofibers to serve as scaffolds in cell-based therapy (25). The release experiments proved that these nanofibers with CsA had pharmacological activity for at least 96 h, with the highest amount released during the first 12 h. However, the total amount of released CsA was relatively low because of the hydrophobic character of the drug.

It has been shown that the properties of drug-loaded nanofibers and the release profile of hydrophobic drugs can be modified by varying the composition of the polymer solution during nanofiber preparation, particularly through the addition of the amphiphilic polymer poly(ethylene glycol) (PEG) (30–32). The influence of PEG added to paclitaxel-loaded

PLGA thin films on the release kinetics of paclitaxel was observed (31). The development of biocompatible nanofibers serving as a scaffold and carrier of drugs with adjustable release kinetics controlled by additive molecules represents a promising approach for local drug administration, especially in the case of hydrophobic compounds.

The aim of this study was to assess the modification of the release profile of the hydrophobic immunosuppressive drug CsA from electrospun PLA nanofibers produced by needleless electrospinning. First, a HPLC-MS/MS method suitable for the quantitation of CsA in release medium was developed and validated. Secondly, the extraction of CsA from PLA nanofibers was performed with nanofibers with and without PEG with different MWs, and the kinetics of CsA release was a) monitored by HPLC-MS/MS method and b) detected by a bioassay.

MATERIALS AND METHODS

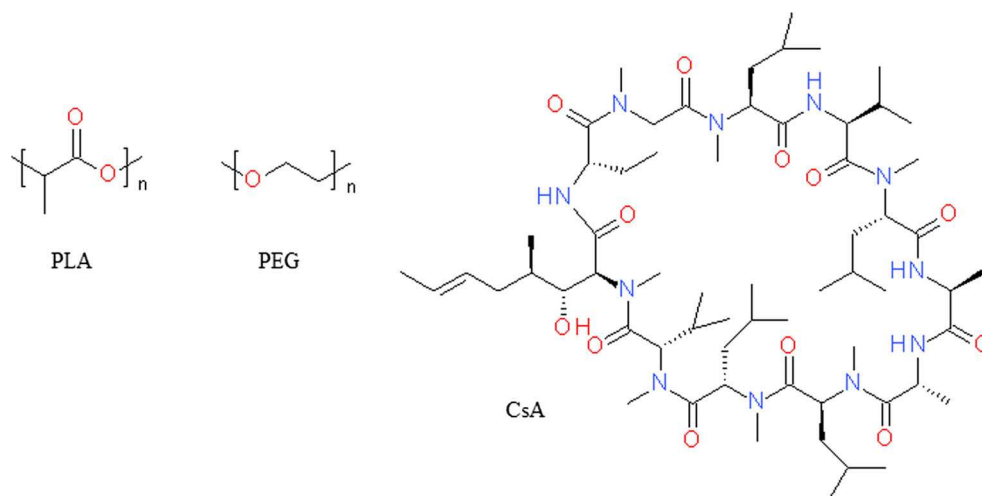
Materials

PLA was purchased from Nature Works, LLC (Minnetonka, MN, USA). PEGs with MW 6 and 20 kDa were purchased from Rapp Polymere GmbH (Tuebingen, Germany), and 35 kDa PEG was purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). CsA was purchased from TEVA Czech Industries (Opava, Czech Republic). The chemical structures of used components are shown in Fig. 1. Chloroform, 1,2-dichloroethane and ethyl acetate were purchased from PENTA (Prague, Czech Republic). Methanol (LC-MS grade), ammonium acetate (p.a.), and phosphate buffered saline (PBS) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

Preparation and Characterization of Nanofibers

The nanofibers were prepared by needleless electrospinning (Nanovia Ltd., Litvinov, Czech Republic) using Nanospider™ technology (33) (see illustrative photo on Fig. 2). Polymer PLA (7 wt%) was dissolved in chloroform (54 wt%), and then, two other solvents, 1,2-dichloroethane (29 wt%) and ethyl acetate (10 wt%), were added to this solution. The CsA and PEG were added to the polymer solution at a concentration of 10 wt% and 15 wt%, respectively. Both, PEG and CsA were soluble in polymer solution and homogeneous mixtures were obtained before electrospinning. The electrospinning parameters were as follows: the distance between the electrode and collector 22 cm, voltage 20–60 kV, relative humidity 25–30% and temperature 20°C. The following five nanofibrous materials were prepared: blank PLA, CsA-loaded PLA, and three CsA-loaded PLA with 15 wt% PEG of MWs 6, 20, and 35 kDa. The area weight of nanofibrous materials was ranging from 8.5 to 11.5 g/m². The morphology of the nanofibers was

Fig. 1 The structures of components used for the preparation of nanofibrous materials.



analyzed using scanning electron microscopy (SEM), microscope TS 5130 VEGA (TESCAN, Brno, Czech Republic). The samples were dried at laboratory temperature under vacuum overnight and platinum sputtered. The fiber diameters were determined by measuring the diameter of at least 30 fibers from each SEM micrograph at a magnification of 1000x using software ImageJ. The fiber distribution was calculated as frequency of the fiber diameters and expressed in percentage.

The chemical structure of the nanofibers was analyzed by FT-IR spectroscopy. FT-IR spectra were recorded on a Perkin – Elmer Paragon 1000PC FT-IR spectrometer using the reflective ATR (Attenuated total reflection) technique Specac MKII Golden Gate Single Reflection ATR System with a diamond crystal with the angle of incidence 45°. All



Fig. 2 Representative image of needleless electrospinning. Photo: Elmarco, Ltd.

spectra were measured at wavenumber range 4400–450 cm^{-1} with resolution 4 cm^{-1} and with 32 scans. Software Spectrum v2.00 was used for processing the spectra. The samples were directly put on the diamond crystal and measured.

Loading Experiments

The CsA was added to the polymer solution in concentration of 10 wt% (relative to the PLA polymer) before electrospinning. To determine CsA amounts loaded to the prepared nanofibrous materials the extraction experiments using methanol (in which CsA is soluble) were done. CsA-loaded nanofibers were immersed into methanol for 48 h. The concentration of extracted CsA was quantified using HPLC method. The HPLC conditions were similar to those used for the determination of CsA release kinetics to PBS solution which are described in detail below (with exception of m/z 1202.9 \rightarrow m/z 155.9 fragmentation used for methanolic extract of CsA). The concentration of CsA in nanofibrous materials quantified by HPLC was calculated to be 10 wt%, i.e. it is in agreement with the amount of CsA present in the initial electrospun mixture.

Optimization and Validation of HPLC-MS/MS Method

The HPLC-MS/MS analyses were performed on an Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) containing a quaternary pump coupled with a Triple Quad 6460 tandem mass spectrometer. For data acquisition, the Mass Hunter Workstation software was used. The HPLC-MS/MS method was optimized for the quantitation of CsA released into PBS solution. An XSelect CSH Phenyl-Hexyl XP column (100 x 4.6 mm, particle size 2.5 μm) from Waters (Milford, MA, USA) was used with the mobile phase containing methanol/5 mM ammonium acetate (pH 4.5). The run consisted of a fast gradient from 90–100% methanol over 0 to 2 min followed by

100% methanol from 2 to 5.5 min with a flow rate of 0.7 ml/min. The temperature of the column was kept at 45°C, the samples were maintained at 20°C and the injection volume was 5 µL.

The mass spectrometric detection was performed in selected reaction monitoring mode using electrospray ionization in positive mode. Nitrogen was used as the collision, nebulizing and desolvating gas. The optimized values were performed with a fragmentor voltage of 300 V, collision energy of 60 V, drying gas flow rate of 10 L/min, drying gas temperature of 350°C, and nebulizer gas flow rate of 50 psi. The recorded fragmentation was m/z 1224.8 \rightarrow m/z 1112.8. The molecular ion was detected as a sodium adduct of CsA $[M + Na]^+$, which confirms the stability of CsA during its incorporation into the nanofibers and the product ion was detected as a molecular ion with loss of the side chain MeBmt $[MNa-C_7H_{13}O]^+$. The optimized HPLC-MS/MS system provided satisfactory ionization of CsA, acceptable retention time (3.0 min) and favorable peak shape. Compared to the C18 stationary phase, which has frequently been used for the analysis of CsA (12,13) these conditions showed better results.

The stock solution of CsA standard was prepared by dissolving 10 mg of CsA in 10 mL of methanol. Due to necessity to measure calibration dependence of CsA in PBS and poor solubility of CsA in polar solvents, the working solution at concentration of 20 µg/mL was prepared by diluting the stock solution in the mixture of methanol and water (6/4, v/v). After that it was possible to dilute working solution solely with PBS to obtain calibration standards and standard solutions for assessment of validation parameters.

The data obtained for the dependence of peak areas *versus* concentrations showed linearity ($y = 2.92x - 1.71$, $R^2 = 0.9998$) in the whole measured calibration range from 10 ng/mL to 1 µg/mL. Relative standard deviations ($n = 5$) varied from 0.41 to 5.71%. The limit of detection (determined as three times ratio signal to noise) was 3 ng/mL, the limit of quantitation (determined as ten times ratio signal to noise) was 10 ng/mL. The accuracy, precision and repeatability were measured at three concentration levels (10, 100 and 1000 ng/mL). Intra-day and inter-day accuracy and precision (each, $n = 5$) were determined by repeatedly assaying samples on the same day and on two consecutive days, respectively. The results are summarized in Table I. The data obtained

confirm that the method developed is selective, precise, linear, sensitive, and hence stands validated. Selectivity of the method was conducted by comparing chromatograms of i) the blank obtained by extraction of pure PLA nanofibers, ii) the blank spiked with CsA and iii) the sample obtained by extraction of PLA nanofibers containing CsA with addition of PEG (35 kDa) and no substances in extract interfered with CsA.

Cyclosporine A Release Experiments in PBS

CsA release experiments were conducted in a tempered shaker, an Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Riga, Latvia) at 37°C and 140 rpm. Five round targets (diameter 12.5 mm) were cut from the CsA-loaded nanofibrous materials with approximately 10 g/m² area weight for each experiment. All release experiments were performed in triplicate. Kinetic studies of CsA release were conducted in a mode with continuous exchange of a part of the solution as follows: five targets were put in 10 mL of PBS. At the given time period, 4 mL of the solution were removed for the analysis of CsA content, and 4 mL of fresh PBS were added into the extraction bottles. The aliquots were collected at 0.5, 1, 2, 3.5, 6.5, 10, 24, 72 and 144 h after immersion. The kinetic studies of the CsA release were performed for four different types of CsA-loaded PLA nanofibers varying in presence and MW of the added PEGs. Blank PLA nanofibers were used as a reference.

Cyclosporine A Release in Tissue Culture Medium

Samples of nanofibers (3 x 3 mm size, 10 g/m² area weight, 10 wt% CsA, with or without PEG) were soaked in wells in a 24-well tissue culture plate (Corning, Inc., Corning, NY, USA) with 600 µL of RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) with antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin) at laboratory temperature. The nanofibers were repeatedly transferred after 0.5, 1, 2, 3.5, 6.5, 10, 24, 48, 72 and 144 h into new wells containing fresh medium. The supernatants from the individual wells after each transfer were harvested, stored at -20°C and tested with a bioassay for the inhibition of interleukin-2 (IL-2) production by Concanavalin (ConA)-activated mouse spleen cells.

Table I Intra-day and Inter-day Accuracy and Precision of HPLC-MS/MS Determination of CsA ($n = 5$)

c (CsA) Teoretical [ng/mL]	Intra-day Measured [ng/mL]	Accuracy [%]	Precision [%]	Inter-day Measured [ng/mL]	Accuracy [%]	Precision [%]
10	10.58 ± 0.26	105.84	2.42	10.41 ± 0.67	104.13	6.42
100	102.96 ± 3.46	102.96	3.36	98.85 ± 7.27	98.85	7.35
1000	999.32 ± 52.06	99.93	5.21	1026.30 ± 55.84	102.63	5.44

Inhibition of IL-2 Production by CsA Released from Nanofibers

Single cell suspensions of spleen cells from BALB/c mice were prepared in RPMI 1640 medium (Sigma) containing 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin), 10 mmol/L HEPES buffer and 5×10^{-5} mol/L 2-mercaptoethanol. The cells (0.6×10^6 /mL) were cultured in a volume of 500 µL of complete RPMI 1640 medium in 48-well tissue culture plates (Corning, NY), and they were left unstimulated or stimulated with 1.0 µg/mL of ConA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). To determine pharmacological activity of CsA released from the nanofibers, the supernatants obtained after the extraction of the nanofibers were added to the cell cultures at a final concentration of 25 vol%. The concentrations of IL-2 in the cell culture supernatants after 24-h incubation were assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using capture and detection anti-cytokine antibodies purchased from PharMingen (San Diego, CA, USA) following the instructions of the manufacturer.

Determination of Immunosuppressive Properties of CsA-Loaded Nanofibers after their Extraction in PBS or Culture Medium

Nanofibers containing 0 wt% CsA, 10 wt% CsA and 10 wt% CsA with PEGs with a MW of 6, 20 or 35 kDa were extracted in PBS or culture medium for 144 h as described above. The samples of the extracted nanofiber material were transferred into wells of spleen cells (0.6×10^6 /mL) stimulated with ConA (1.0 µg/mL). The concentrations of IL-2 in the cell culture supernatants were assessed after a 24-h incubation period using an ELISA.

Statistical Analysis

The results are expressed as the mean values \pm SD. Comparisons between two groups were analyzed by Student's *t* test, and multiple comparisons were analyzed by an ANOVA. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of CsA-Loaded and PEG-Containing Nanofibers

Needleless electrospinning is a versatile method for the formation of fibers from tens of nanometers to tens of micrometers in diameter and with thicknesses (area weight) ranging from 1

to 100 g per m². In this study, PLA nanofibrous materials with a mass per unit area of ca. 10 g/m² were prepared.

Scanning Electron Microscopy Measurements

SEM measurements revealed that after the proper optimization of the electrospinning process parameters, PLA nanofibrous materials with reproducible morphologies were obtained. SEM images representing pure PLA nanofibers did not show any inhomogeneities or artifacts in the nanofibrous structures (see Fig. 3a). Figure 3b-e show the structure of CsA-loaded PLA nanofibers with or without the addition of PEG with different MWs. No considerable differences in the morphologies; i.e., no effect on nanofiber density, porosity or architecture; were observed. The homogeneous incorporation of the hydrophobic drug and auxiliary PEG molecules into the PLA nanofibers was confirmed.

The determination of fiber diameters from SEM images was processed within the distribution curves as shown in the graphs below the corresponding SEM images (see Fig. 3a-e). The overall range of fiber diameters was from 50 to 700 nm with the average fiber diameter from 165 to 300 nm. Within the connotation of nanotechnology, nanomaterials generally refer to a dimension less than 100 nm. However, in scientific literature dealing with fibers particularly for biomedical applications are fibers with diameters in the range of hundreds of nanometers (up to 1000 nm) referred as nanofibers (34,35). Quite narrow diameter distributions (from 100 to 300 nm, see Fig. 3a-c) exhibited the pure PLA nanofibers as well as CsA-loaded PLA and CsA-loaded PLA with PEG of the lowest MW (6 kDa). The slightly broader diameter distribution was found for nanofibers containing higher MW PEGs (20 and 35 kDa) (see Fig. 3d-e) which can be attributed to the changes of electrospinning conditions, i.e. the addition of these higher MW compounds may cause an increase of viscosity which is crucial parameter influencing the electrospinning process and final properties of nanofibers such as diameter.

FTIR Analysis

The successful incorporation of PEG, CsA, or both was checked by FT-IR spectroscopy. A set of representative FT-IR spectra are showed in Fig. 4. (The spectra for nanofibers containing PEG of 20 or 35 kDa were almost identical and therefore not shown). In all spectra the characteristic bands at 1752 and 1184 cm⁻¹ associated with polyester PLA were observed. The presence of PEG is demonstrated by appearance of two new bands at 960 and 840 cm⁻¹. In the case of CsA-loaded nanofibers the new band at 1640 cm⁻¹ appeared corresponding to the amide groups in CsA structure.

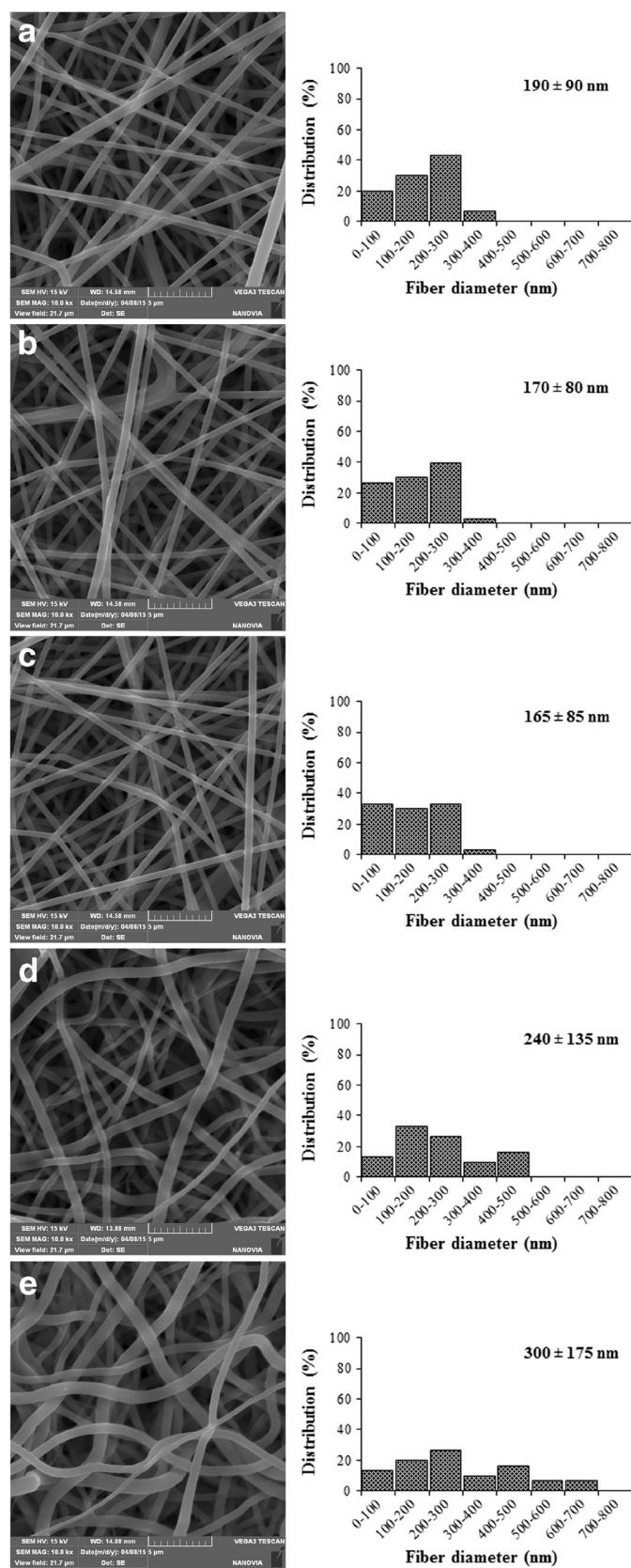
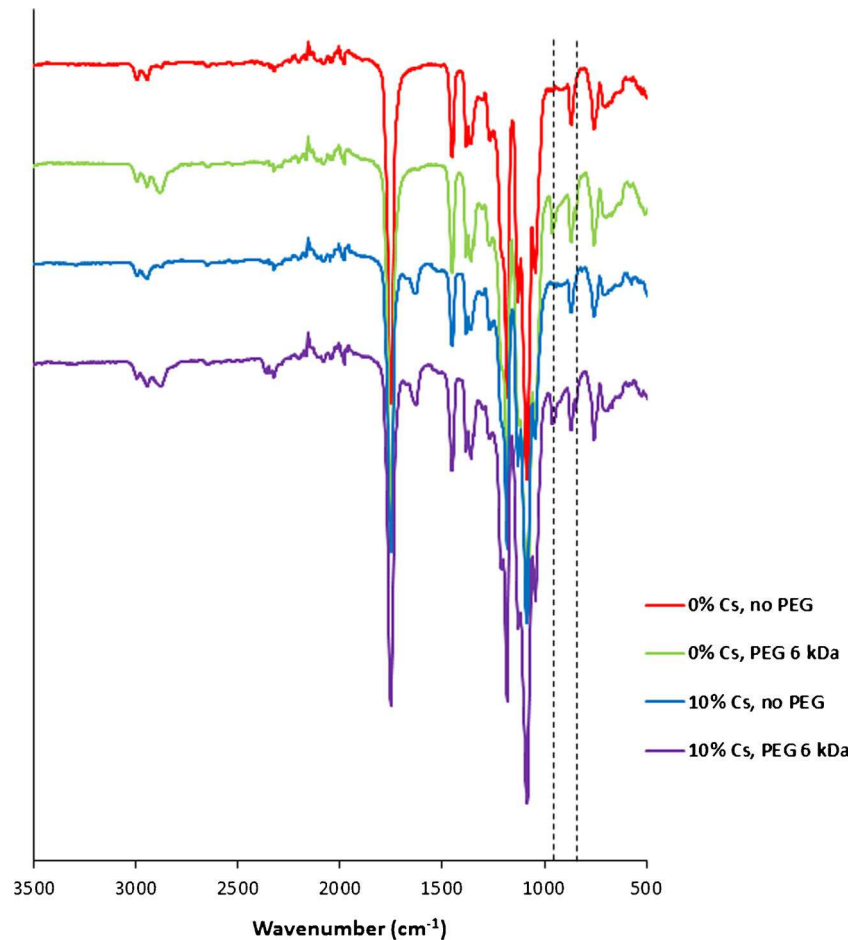


Fig. 3 The SEM images and fiber diameter distributions of the prepared PLA nanofibers. **(a)** Blank PLA nanofibers **(b)** with incorporated CsA (10 wt%) and with the addition of **(c)** PEG of 6 kDa (15 wt%), **(d)** PEG of 20 kDa (15 wt%) and **(e)** PEG of 35 kDa (15 wt%). Magnification of SEM images is 10,000x.

Fig. 4 The FT-IR spectra of prepared nanofibers: blank PLA, PLA containing PEG of 6 kDa, CsA-loaded PLA, and CsA-loaded PLA containing PEG of 6 kDa.



The Kinetics of CsA Release in PBS Detected by HPLC-MS/MS

Four nanofibrous materials were studied. Each contained 10 wt% CsA, and three of them contained 15 wt%

Table II Comparison of the CsA Release Rates from PLA Nanofibers Containing 10 wt% CsA and 15 wt% PEGs of Various MWs

Time period <i>t</i> [h]	Release rate <i>v</i> [ng/h.cm ²] ^a			
	no PEG	PEG 6 kDa	PEG 20 kDa	PEG 35 kDa
0–0.5	58	469	226	190
0.5–1	39	334	207	107
1–2	32	222	172	132
2–3.5	21	177	86	127
3.5–6.5	15	83	52	47
6.5–10	9	72	59	54
10–24	3	22	20	19
24–72	0	4	3	2
72–144	1	3	4	3

^a Release rate calculated according to Eq. (1)

hydrophilic PEG with different MWs (6, 20 and 35 kDa). The kinetic release profiles of CsA were evaluated and compared. The continuous exchange mode was chosen to better simulate physiological conditions. The release rates of CsA in a particular time period were calculated according to Eq. (1):

$$v = \frac{m_n - m_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} \cdot \frac{1}{a} \quad (1)$$

where *v* is the release rate, *m_n* is the amount of CsA (ng) in an aliquot collected at *t_n* (h), *m_{n-1}* is the amount of CsA (ng) in an aliquot collected at *t_{n-1}* (h) reduced in regard to the exchanged part of the media and *a* is the square area of the nanofibrous targets (cm²).

The calculated release rates of CsA are summarized in Table II. The total cumulative amounts of released CsA in time course are shown in Fig. 5a, and the amounts of released CsA corresponding to the given time period are depicted in Fig. 5b. The results indicate that nanofibers containing PEGs significantly released higher amounts of CsA compared to the nanofibers containing CsA only. Apparently, the amount of CsA released increased, and the release profiles prolonged with the decreasing MW of the added PEGs.

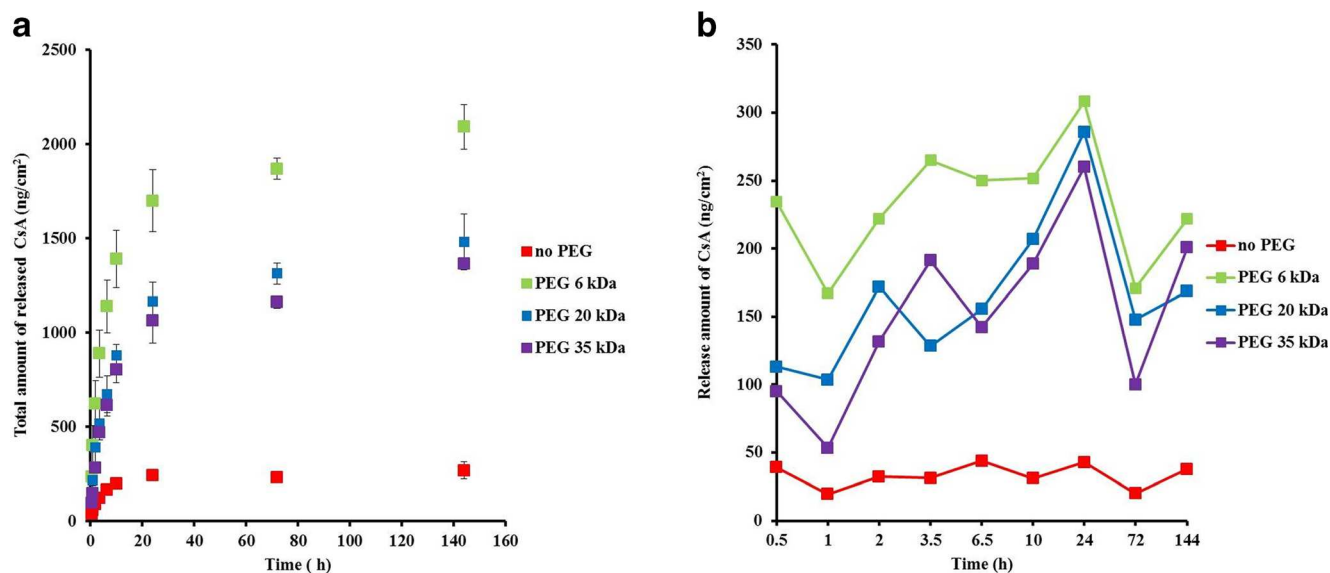


Fig. 5 The release profiles of CsA into PBS. **(a)** The total amounts and **(b)** the individual amounts of CsA released from PLA nanofibers containing 10 wt% CsA and 15 wt% PEGs of various MWs determined by HPLC-MS/MS. Error bars were calculated using the standard deviations ($n = 3$).

In our previous work, we examined the release of PEGs with MWs of 2, 6, 10 and 20 kDa from PLA, polycaprolactone and polyvinyl alcohol fibers. With all the tested nanofibers, we observed higher release rates of PEGs with higher MW (36). This trend agrees with the results of a study by Huang *et al.* (32), who tested the effect of PEG of 0.4 and 10 kDa on the release of hydrophobic paclitaxel from PLGA films. Their experiments showed a higher release rate of the hydrophobic drug from nanofibers containing PEG of higher MW (10 kDa). PEG of low MW, such as 0.4 kDa, were found to be less effective in drug release modification. Steele *et al.*

incorporated PEGs of 8 and 35 kDa into PLGA films at various contents to moderate paclitaxel release (31). Their experiments with the same percentage of added PEGs (15 wt%) as in our study showed a constant hydrophobic drug release for 30 days. In the case of PEG of 35 kDa, there was an observed burst release within the first 2 days approximately, which was explained by the higher crystallinity of PEG of 35 kDa, the phase separation of the polymer matrix and the subsequent fast release of PEG with paclitaxel into the aqueous media. However, in our system, this effect was not observed. We suppose that it can be caused by different preparation

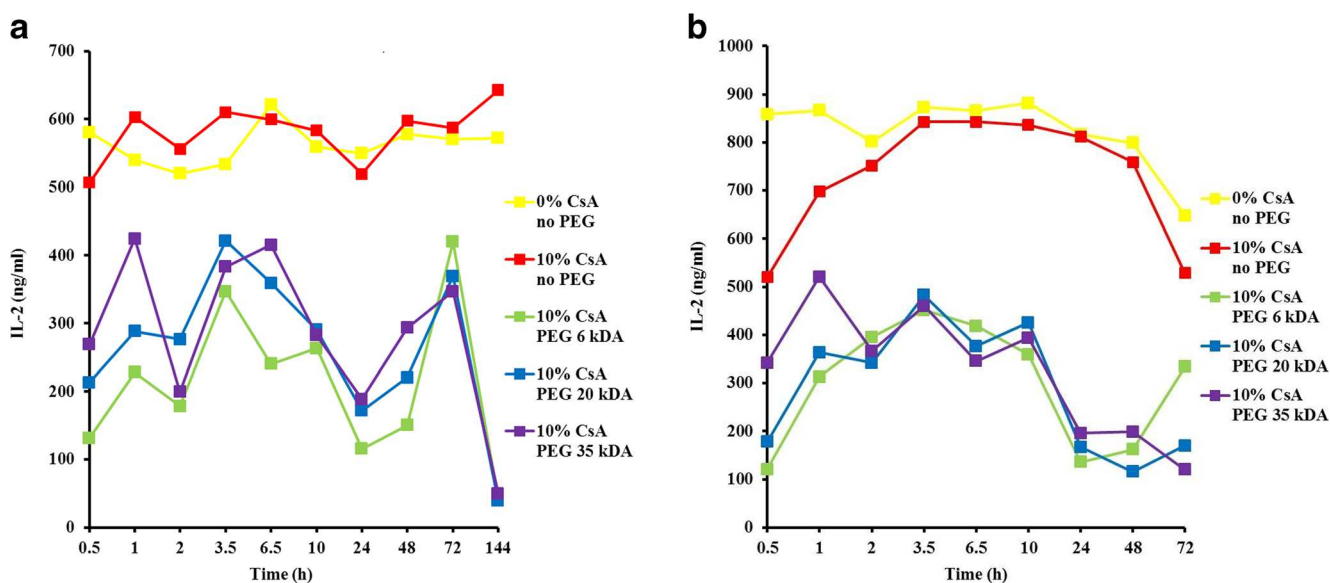


Fig. 6 The kinetics of the CsA release from nanofibers detected by a bioassay. CsA-free and CsA-loaded nanofibers with or without PEGs were soaked in **(a)** PBS or **(b)** culture medium for the indicated time intervals. The samples with extracted CsA were harvested and tested for their ability to inhibit IL-2 production by Con A-stimulated spleen cells.

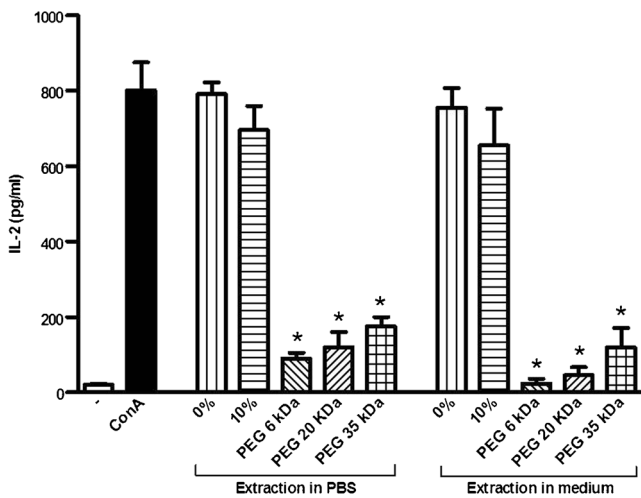


Fig. 7 The persistence of a significant drug release from PEG-containing nanofibers after the extraction of nanofibers (containing 0 wt% CsA, 10 wt% CsA or 10 wt% CsA and PEG of 6 kDa, 20 kDa or 35 kDa) in PBS or culture medium. Each bar represents the mean \pm SD from 3 experiments. The values with an asterisk represent the significant inhibition of IL-2 production (* $P < 0.001$).

procedure, resulting in different polymer matrix morphology, i.e. polymer films *versus* nanofibers. PLA fibrous materials with relatively high surface areas are created by electrospinning, and faster solvent evaporation leads to lower crystalline formations. The other electrospinning parameters, such as temperature or the distance of electrodes, influence solvent evaporation and final polymer matrix behavior. Apparently, also interaction of additive molecules (PEG) with the releasing hydrophobic drug also plays an important role. With the similar weight concentration of PEGs in electrospun mixture, larger amount of molecules of PEG 6 kDa may lead to better solvation of hydrophobic drug molecules. This effect can increase and prolong the drug release.

The Kinetics of CsA Release in PBS and Culture Medium Detected by a Bioassay

To study the kinetics of CsA release from CsA-loaded nanofibers with or without PEG, samples of the nanofiber materials were soaked at laboratory temperature in PBS or RPMI 1640 medium, and at the indicated time intervals, the nanofibers were transferred into the same volume of fresh medium. The presence of pharmacologically active CsA released from the nanofibers was assessed using its ability to inhibit IL-2 production by ConA-activated spleen cells. As demonstrated in Fig. 6, a significant amount of CsA was detected in the media from nanofibers without PEG, which were harvested only at the very beginning of the extraction. However, in nanofibers containing PEGs, a biologically significant amount of CsA was released within 0.5 h, and the profound release continued for the whole observation period (144 h). These biological data agree with the results determined by HPLC-MS/MS. Thus,

the higher released amount of CsA corresponds to a lower ability of IL-2 production by ConA-stimulated spleen cells (Fig. 5b *versus* Fig. 6a).

To demonstrate the ability of PEG-containing nanofibers to release the drug, even after a 6-day extraction in PBS or in culture medium (with a regular exchange of the solution), the samples of CsA-free nanofibers and nanofibers with 10 wt% CsA or with 10 wt% CsA and PEGs of different MWs were extracted for 144 h and then added to the cultures of ConA-stimulated spleen cells. The production of IL-2 was determined by an ELISA. As shown in Fig. 7, CsA-free samples or CsA-loaded nanofibers without PEGs had not a considerable effect on IL-2 production, while the samples of nanofibers containing CsA and PEGs significantly inhibited the production of IL-2. It was confirmed by the values with asterisks which are significantly different (* $P < 0.001$) from the control represented by ConA-stimulated spleen cells. In accordance with the results above, the highest inhibition of IL-2 production (corresponding to the highest CsA release) was detected in samples containing PEG with the lowest MW (6 kDa). These results clearly demonstrate that nanofibers extracted for 144 h still retain, and continue to release a sufficient amount of CsA to inhibit production of IL-2 by ConA-activated T cells. It is important that CsA-loaded nanofibers containing PEG with the lowest MW, which have the highest release of CsA at the beginning of extraction, preserve the highest release also after the prolonged (144 h) incubation period.

It has been demonstrated that concentrations of the drug as low as 50–200 ng/g of tissue are sufficient to suppress T-cell reactivity and inflammation (37). We have recently shown that the amount of CsA released from CsA-loaded nanofibers without PEG, applying onto damage ocular surface, is sufficient to suppress a rapid inflammatory reaction developing shortly after tissue damage (38). A rapid CsA release can be beneficial to attenuate rapidly developing immune response after allogeneic transplantation as it was demonstrated in mouse model. Covering skin allografts with nanofibers containing CsA attenuates a local rejection reaction and modifies mechanisms of transplantation reaction (39). Thus, the advantages of described CsA-loaded nanofibers containing PEG additives can be seen in the enhanced drug release efficacy and the kinetic of drug release might be useful for suppression of rapid inflammatory or transplantation reaction.

CONCLUSIONS

The release kinetics of cyclosporine A (CsA) were studied with four different types of CsA-loaded poly(D,L-lactide) (PLA) nanofibers. A newly developed HPLC-MS/MS method was proven to be simple, sensitive, reproducible, and suitable for the detection and quantitation of CsA in PBS release solution. The results showed that the release of drug from CsA-loaded

nanofibers containing PEG was significantly higher in comparison with the PEG-free nanofibers. Particularly, the addition of PEG with the lowest MW (6 kDa) yielded promising results, significantly increased amounts of CsA and prolonged the release of CsA. It was found that the interaction of CsA with PEG plays an important role for moderating drug release. *In vitro* experiments on ConA-stimulated spleen cells revealed the biological activity of the PLA nanofibers with incorporated CsA, even after 144 h of previous extraction.

To the best of our knowledge, there are no studies concerning nanofibrous carriers of hydrophobic CsA using PEG molecules to moderate drug release. Our findings suggest possibilities for the application of CsA-loaded and PEG-containing nanofibers as an effective scaffold for cell-based therapies using allogeneic cells and are a promising tool for the local suppression of inflammatory reaction or immune response after transplantation.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

This work was supported by the Charles University in Prague [project number 307115 and SVV260440], the Grant Agency of the Czech Republic [project number 16-04863S] and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the National Sustainability Program II [Project BIOCEV-FAR LQ1604] and by the project “BIOCEV” [CZ.1.05/1.1.00/02.0109]. The authors thank to Nanovia Ltd. for cooperation in needleless electrospinning.

REFERENCES

- Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1993;24(6):472–95.
- Karn PR, Kim HD, Kang H, Sun BK, Jin SE, Hwang SJ. Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:3791–800.
- Zhang X, Yi Y, Qi J, et al. Controlled release of cyclosporine A self-nanoemulsifying systems from osmotic pump tablets: near zero-order release and pharmacokinetics in dogs. *Int J Pharm.* 2013;452(1–2):233–40.
- Aksungur P, Demirbilek M, Denkbaz EB, Vandervoort JTP, Ludwig A, Unlu N. Development and characterization of cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *J Control Release.* 2011;151(3):286–94.
- Di Tommaso C, Bourges JL, Valamanesh F, et al. Novel micelle carriers for cyclosporin A topical ocular delivery: in vivo cornea penetration, ocular distribution and efficacy studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81(2):257–64.
- Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Rudaz S, Hochstrasser D. Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique. *Clin Biochem.* 2008;41(10–11):910–3.
- Tszyrsznic W, Borowiec A, Pawlowska E, et al. Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;928:9–15.
- Ouyang J, Baeyens WR, Duan J, Delanghe J. Improvement of cyclosporin A determination in whole blood by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2003;17(6):404–10.
- Bonifacio FN, Giocanti M, Reynier JP, Lacarelle B, Nicolay A. Development and validation of HPLC method for the determination of Cyclosporin A and its impurities in Neoral capsules and its generic versions. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(2):540–6.
- Khoschorur G, Semmelrock HJ, Rodl S, et al. Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporin A and its metabolites M1, M17 and M21. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;690(1–2):367–72.
- Magni F, Pereira S, Leoni M, Grisenti G, Galli KM. Quantitation of cyclosporin A in whole blood by liquid chromatography/stable isotope dilution electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2001;36(6):670–6.
- Zaater MF, Tabboub YR, Najib NM. Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric determination of cyclosporin A in human plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2005;382(1):223–30.
- Vollenbroeker B, Koch JH, Fobker M, Suwelack B, Hohage H, Muller U. Determination of cyclosporine and its metabolites in blood via HPLC-MS and correlation to clinically important parameters. *Transplant Proc.* 2005;37(4):1741–4.
- Muller A, Jungen H, Iwersen-Bergmann S, Sterneck M, Andresen-Streichert H. Analysis of cyclosporin a in hair samples from liver transplanted patients. *Ther Drug Monit.* 2013;35(4):450–8.
- Fang ZG, You BG, Chen YG, et al. Analysis of cyclosporine A and its metabolites in rat urine and feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(15–16):1153–62.
- Li AC, Li Y, Guirguis MS, Caldwell RG, Shou WZ. Advantages of using tetrahydrofuran-water as mobile phases in the quantitation of cyclosporin A in monkey and rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(1):277–84.
- Kai D, Liow SS, Loh XJ. Biodegradable polymers for electrospinning: towards biomedical applications. *Mater Sci Eng C.* 2014;45:659–70.
- Jayakumar R, Prabaharan M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(3):322–37.
- Dubsky M, Kubinova S, Sirc J, et al. Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(4):931–41.
- Hu X, Liu S, Zhou G, Huang Y, Xie Z, Jing X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *J Control Release.* 2014;185:12–21.
- Chou S-F, Carson D, Woodrow KA. Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. *J Control Release.* 2015;220(Part B):584–91.
- Sebe I, Kallai-Szabo B, Zelko R, Szabo D. Polymers and formulation strategies of nanofibrous systems for drug delivery application and tissue engineering. *Curr Med Chem.* 2015;22(5):604–17.
- Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm.* 2015;484(1–2):57–74.
- James R, Toti U, Laurencin C, Kumbar S. Electrospun Nanofibrous scaffolds for engineering soft connective tissues. *Biomed Nanotechnol.* 2011;726:243–58.

25. Holan V, Chudickova M, Trosan P, *et al.* Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *J Control Release.* 2011;156(3):406–12.
26. Zajicova A, Pokorna K, Lencova A, *et al.* Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds. *Cell Transplant.* 2010;19(10):1281–90.
27. Buschle-Diller G, Cooper J, Xie ZW, Wu Y, Waldrup J, Ren XH. Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. *Cellulose.* 2007;14(6):553–62.
28. Chen DW, Liao JY, Liu SJ, Chan EC. Novel biodegradable sandwich-structured nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: an in vitro and in vivo study. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:763–71.
29. Sirc J, Kubinova S, Hobzova R, *et al.* Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5315–25.
30. Herrmann S, Winter G, Mohl S, Siepman F, Siepman J. Mechanisms controlling protein release from lipidic implants: effects of PEG addition. *J Control Release.* 2007;118(2):161–8.
31. Steele TW, Huang CL, Widjaja E, Boey FY, Loo JS, Venkatraman SS. The effect of polyethylene glycol structure on paclitaxel drug release and mechanical properties of PLGA thin films. *Acta Biomater.* 2011;7(5):1973–83.
32. Huang CL, Steele TWJ, Widjaja E, Boey FYC, Venkatraman SS, Loo JS. The influence of additives in modulating drug delivery and degradation of PLGA thin films. *NPG Asia Mater.* 2013;5:e54.
33. Jirsák O, inventor, Lukáš D, Kotek V, Martinová L, Chaloupek J, assignees. A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. United States patent 20060290031. 2004 Sept 8.
34. Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, Parameswaran S, Ramkumar SS. Electrospinning of nanofibers. *J Appl Polym Sci.* 2005;96:557–69.
35. Zhang Y, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J Mater Sci-Mater Med.* 2005;16:933–46.
36. Hrib J, Sirc J, Hobzova R, *et al.* Nanofibers for drug delivery - incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015;6:1939–45.
37. Kaswan RL. Intraocular penetration of topically applied cyclosporine. *Transplant Proc.* 1988;20(2 Suppl 2):650–5.
38. Cejkova J, Cejka C, Trosan P, Zajicova A, Sykova E, Holan V. Treatment of alkali-injured cornea by cyclosporine A-loaded electrospun nanofibers - an alternative mode of therapy. *Exp Eye Res.* 2016;147:128–37.
39. Hajkova M, Javorkova E, Zajicova A, Trosan P, Holan V, Krulova M. A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;29 doi:10.1002/term.2044.

13.3 Publikace 3

Hobzová, R.; Hampejsová Z.; Plch, J.; Hraběta, J.; Venclíková, K.; Jedelská J.; Bakowsky, U.; Bosáková, Z.; Lhotka, M.; Steinhart, M.; Kovářová J.; Michálek, J.; Širc, J.: Poly(D,L-lactide)/poly(ethyleneglycol) fibrous mats as paclitaxel-eluting carriers: Preparation and characterization of fibers, in vitro drug release and antiangiogenic activity, v recenzním řízení časopisu Materials Science and Engineering C (2018)

Poly(D,L-lactide)/polyethylene glycol fibrous mats as paclitaxel-eluting carriers: Preparation and characterization of fibers, *in vitro* drug release and antiangiogenic activity

Radka Hobzova^a, Zuzana Hampejsova^b, Johana Plch^c, Jan Hrabeta^c, Kristyna Venclikova^a, Jarmila Jedelska^d, Udo Bakowsky^d, Zuzana Bosakova^b, Miloslav Lhotka^e, Milos Steinhart^a, Jana Kovarova^a, Jiri Michalek^a, Jakub Sirc^{a*}

^a Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^c Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Medical Faculty, Charles University in Prague and Motol University Hospital, V uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

^d Department of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, University of Marburg, Robert Koch Strasse 4, 35037 Marburg, Germany

^e Institute of Chemical Technology, Technicka 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic

* Corresponding author: Jakub Sirc, Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, Heyrovsky Sq. 2, 162 06, Prague 6, Czech Republic. E-mail: sirc@imc.cas.cz

Abstract

Poly(D,L-lactide)/polyethylene glycol (PLA/PEG) micro/nanofibers loaded with paclitaxel (PTX, 10 wt%) were prepared by needleless electrospinning technology, which allows large scale production for real medicinal practice. Fiber structure and properties were investigated by several methods: scanning electron microscopy, nitrogen adsorption/desorption isotherm measurements, differential scanning calorimetry, and X-ray diffraction measurements in order to examine their morphology (fiber diameter distribution, specific surface area, and total pore volume), composition, drug loading efficiency, and physical state. HPLC-UV method was optimized and validated to quantify *in vitro* PTX release into PBS. The results showed that presence of PEG in fibers ensured the release of higher amounts of PTX for prolonged time compared to fibers without PEG. *In vitro* cell assay proved the biocompatibility of PLA/PEG fibrous materials and showed significant cytotoxicity of PTX-loaded PLA fibers against human breast cancer MDA-MB-231 cell line. Chick chorioallantoic membrane assay proved that PTX-loaded fibers exhibited antiangiogenic activity with pronounced effect in the case of the PEG containing fibers.

Keywords:

PLA/PEG fibers, needleless electrospinning, morphology, paclitaxel determination, cytotoxicity, antiangiogenesis

1. Introduction

Nanofibrous polymeric materials are currently one of the most intensively studied materials for applications in medicinal field [1–3]. Their internal architecture with relatively high surface area, high surface-to-volume ratio, macroporosity and other attributes predisposes them to be promising as novel drug delivery systems for various therapeutic agents [4–7]. Nanofibrous carriers of antibiotics [8–10], analgesics [11], or anticancer drugs, such as doxorubicin [12–15], paclitaxel [16,17], cisplatin [18–20], or camptothecin [21,22] were fabricated, generally based on needle electrospinning. This technique provides an appropriate control of the process parameters and consequent structural characteristics [23]; however, it is strongly limited by its pure production capacity enabling preparation of nanofibrous mats for laboratory uses or research purposes but not for a wide use in medicinal field. On the other hand, the needleless technology does not contain any needles or nozzles [24,25], the polymeric jets are spontaneously formed from liquid surfaces due to high intensity electrostatic field [26,27]. This method allows the creation of micro/nanofibrous materials in very high production capacity, stability, and easy maintenance compared to other known nozzle or needle based technologies. With appropriate control of the process parameters it is possible to prepare nanofibers of required structure from various polymers [5,28,29] and with incorporated pharmaceutically active compounds such as antibiotics [30] or immunosuppressants [31,32].

Paclitaxel (PTX) is one of the widespread antitumor agent in clinical use approved for the treatment of various solid tumors, especially ovarian, breast or lung [33]. Moreover, to its direct anticancer effect due to the inhibition of mitosis, it acts also as an antiangiogenic agent [34]. PTX, as hydrophobic drug with poor aqueous solubility, applied intravenously using a current formulation in a non-aqueous solvent (Cremophor EL) may cause precipitation in aqueous dilution, allergic reactions or other serious side effects [33]. Thus, local administration of this anticancer drug may reduce some side-effects associated with systemic administration and moreover, can bring the benefits in increasing the therapeutic dose and prolonging the presence time in the target tissue. Although the local chemotherapy is still at the research level, some loco-regional chemotherapeutic systems have been approved by health agencies in USA and/or EU; Gliadel (a copolymer of 1,3-bis(*p*-carboxyphenoxy)propane and sebacic acid with carmustine) or OncoGel (a gel of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and polyethylene glycol (PEG) with PTX) are used in clinical practice for therapy of esophageal cancer, brain tumors and other solid tumors [35,36].

Over the recent years much effort has been paid to the development of an alternative PTX delivery system with emphasis to improve water solubility together with controlled drug release [37]. Possible way to increase the release rate of hydrophobic drugs is to increase the surface area of carrier by forming micro-/nanoparticles [38–40]. Recently, also some nanofibrous carriers loaded by PTX were studied with potential usage for local chemotherapy [41–43]. Polylactide (PLA), polycaprolactone and PLGA are among the most commonly used polymers because of their biocompatibility and nontoxicity. When used as drug delivery systems, the release of the incorporated drug can be supported by increased surface area accomplished by gaseous foaming, particle leaching, or by the addition of washable polymers such as PEGs [44–46]. Amphiphilic PEGs exhibit favorable physicochemical properties and due to the low toxicity, making them suitable for living organisms, are often employed as modifying agents for the hydrophobic drugs to enhance their aqueous solubility, dissolution characteristics and consequently the release rates. Several studies deal with the use of PEG as hydrophilic block to prepare multiblock copolymers [15,22,47,48]. To our

best knowledge, PEG as a modulator of hydrophobic drug release used in the way of physical blending with other polymers through addition into electrospun polymer/drug mixture was studied rarely, especially in the case of carriers of chemotherapeutics intended for local chemotherapy. Recently, the system PLA/PEG with cisplatin for local treatment of cervical cancer was reported [49], however, the systems with another pharmaceutical agents such as antibiotics or antibacterial agent are mostly studied [50,51].

In our work we combined the micro/nanofibrous carriers with relatively high surface area with the addition of amphiphilic PEG of various molecular weights to modify the release profile of hydrophobic drug PTX. PLA micro/nanofibrous mats were prepared using needleless electrospinning technology, which allows efficient scale production for real medicinal use. The materials were comprehensively characterized by various physico-chemical methods. The effect of PEG addition on PTX release was determined by HPLC-UV and by bioassays monitoring the cytotoxic effect of PTX on the human breast cancer cell line. The biocompatibility and antiangiogenic activity was evaluated on chick chorioallantoic membrane.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PLA ($M_w = 420,000$ g/mol, polydispersity = 1.5) was purchased from Nature Works, LLC (Minnetonka, MN, USA). PEG with molecular weights (MWs) of 6 and 20 kDa were obtained from Rapp Polymere GmbH (Tuebingen, Germany) and 35 kDa from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). PTX was purchased from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Chloroform, 1,2-dichloroethane, and ethyl acetate were purchased from PENTA (Prague, Czech Republic). Acetonitrile, methanol (both of HPLC grade), phosphate buffered saline (PBS) tablets and Tween[®] 80 were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Cell culture media (DMEM) and AlamarBlue Assay (Invitrogen) were purchased from ThermoFisher Scientific (Prague, Czech Republic), 24-well plates from TPP (Trasadingen, Switzerland) and biopsy punch Stiefel from Servoprax (Wesel, Germany)

2.2. Preparation of fibrous materials

The fibers were prepared by needleless electrospinning (Nanovia Ltd., Litvinov, Czech Republic) using Nanospider[™] technology [24] (see illustrative photo on Fig. 1A). First, polymer PLA (7 wt%) was dissolved in chloroform (54 wt%) and then 1,2-dichloroethane (29 wt%) and ethyl acetate (10 wt%) were added. PEG of particular MWs was added to the solution at a concentration of 15 wt% related to PLA polymer. PTX was added and dissolved in the polymer solution in a concentration of 10 wt% related to the total polymer content. The chemical structures of the compounds used are shown in Fig. 1B. The electrospinning parameters were: distance between electrode and collector 22 cm, voltage 20-60 kV, relative humidity 25-30% and temperature 20°C.

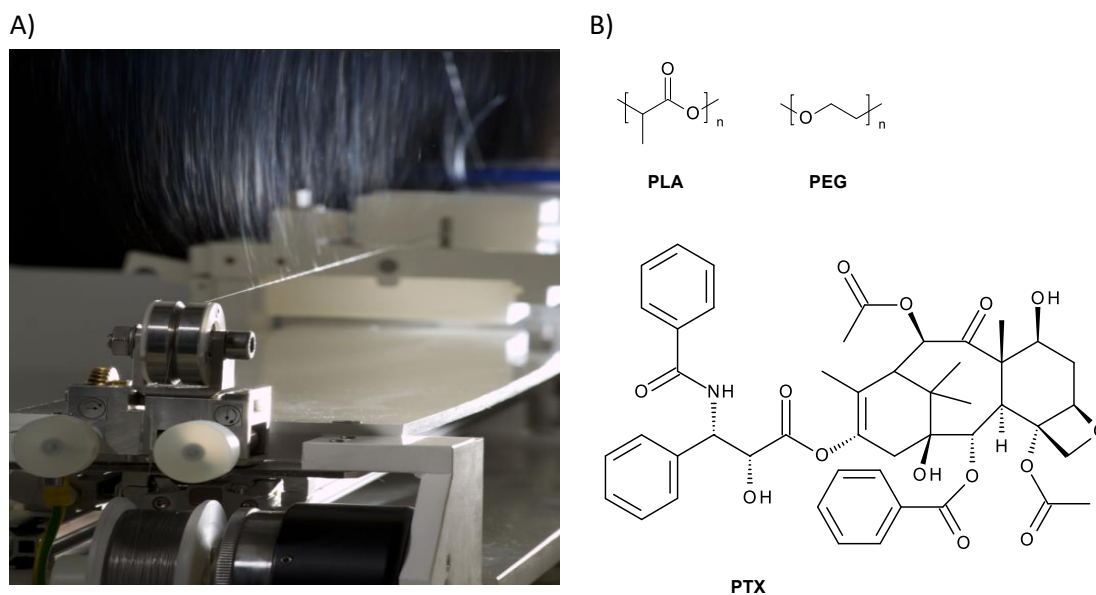


Fig. 1. A) Representative image of needleless electrospinning. Photo: Elmarco, Ltd. B) The chemical structure of compounds used for the preparation of the fibrous materials.

2.3. Characterization of fibrous materials

Scanning electron microscopy (SEM): The morphology of the electrospun fibers was examined by SEM (microscope TS 5130 VEGA3, TESCAN, Brno, Czech Republic) at an accelerating voltage 15 kV. The samples were sputter-coated with 4 nm thin platinum layer before observation. The fiber diameter distributions were determined by measuring the diameter of at least 30 fibers from each of 3 SEM micrographs at a magnification of 5000x using software ImageJ. The fiber distribution was calculated as a frequency of the fiber diameters and is expressed in percentage.

¹H NMR spectroscopy: The composition of fibrous materials (PLA/PEG ratio) was determined by ¹H NMR spectroscopy. ¹H NMR spectra were acquired using a Bruker AVANCE DPX-300 spectrometer operating at 300.1 MHz. Chemical shifts were calibrated using tetramethylsilane as an internal standard. Deuterated chloroform (CDCl₃) was used as the solvent.

BET measurements: The specific surface areas were calculated from nitrogen adsorption/desorption isotherms recorded on the apparatus ASAP 2020 (Micromeritics, USA) according to the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method. Total pore volumes of pores up to 40 nm were determined from desorption branches of isotherms by the Barret-Joyner-Halenda (BJH) method. The samples after preparation and after immersion in PBS buffer for 6 weeks (marked as fresh and washed, respectively, see Table 2) were analyzed.

Differential scanning calorimetry (DSC): The thermal properties of fibrous materials were determined by DSC using Perkin Elmer DSC 8500 (TA instruments, USA) calibrated by indium standard. The measurements were performed in heat-cool-heat mode. Samples were heated from -20 to 200°C, cooled to -20°C, and re-heated to 200°C at a rate of 10°C/min in nitrogen (flow rate 50 ml/min). The glass transition, melting and cold crystallization temperatures and respective enthalpies (T_g , T_m , T_{cc} , and ΔH_m , ΔH_{cc}) were determined from the first and second heating scans.

The degree of crystallinity (χ) was calculated by using Eq. 1

$$\chi = \frac{\Delta H_m^{\text{PLA}} - \Delta H_{cc}^{\text{PLA}}}{\Delta H_m^{\text{PLA},0} \times w^{\text{PLA}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

where ΔH_m^{PLA} is the PLA enthalpy of fusion in the fibers, $\Delta H_{cc}^{\text{PLA}}$ is the enthalpy of cold crystallization, $\Delta H_m^{\text{PLA},0}$ is the enthalpy of fusion for a 100% crystalline PLA, taken as 93 J/g [52] and w^{PLA} is the weight fraction of PLA in the fibrous material (i.e. w^{PLA} is 1, 0.85, 0.9 or 0.75 for pure PLA, PLA containing PEG, PTX-loaded PLA and PTX-loaded PLA containing PEG, respectively)

X-ray diffraction (XRD): XRD measurements were carried out using a high resolution diffractometer Explorer (GNR Analytical Instruments, Italy) equipped with one-dimensional silicon strip detector MYTHEN 1K (Dectris, Switzerland). Samples were measured in reflection mode using radiation $\text{CuK}\alpha$ (wavelength $\lambda = 0.154$ nm) monochromatized by Ni foil (β filter). The measurements were performed in the range $2\theta = 4 - 50^\circ$ with step 0.01° . Exposure time at each step was 10s. The peak positions were employed to obtain periodicities and distinguish various phases according to Bragg's law, $d = \lambda/2\sin \theta$, where λ is the X-ray wavelength and 2θ is the scattering angle.

2.4. Optimization and validation of HPLC-UV method

The HPLC-UV analyses were performed on an Agilent 1260 Infinity Series Quarternary LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) containing a quaternary pump coupled with DAD detector. For data acquisition, the workstation software Agilent 1200 Infinity Series was used. The HPLC method used an Ascentis Express C18 column (150 x 3.0 mm, particle size 5 μm) from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). The temperature of the column was kept at 35°C . The samples were maintained at 25°C . The injection volume was 5 μL . The UV detector was operated at 227 nm. The mobile phase contained a mixture of water/acetonitrile (50/50 v/v) with a flow rate of 0.5 ml/min. The optimized separation system provided acceptable retention time (4.0 min) and favorable peak shape of PTX.

The stock solution of PTX standard was prepared by dissolving 10 mg of PTX in 10 mL of methanol. Due to poor solubility of PTX in aqueous solutions and necessity to measure calibration dependence of PTX in PBS, the working solution at a concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was prepared by diluting the stock solution in the mixture with PBS containing 0.5% Tween 80.

The data obtained for the dependence of peak areas versus concentrations showed linearity ($y = 0.02x - 0.44$, $R^2 = 0.9999$) in the whole measured calibration range from 100 ng/mL to 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Relative standard deviations ($n = 5$) varied from 0.10 to 0.86%. The limits of detection and quantitation were 50 and 100 ng/mL, respectively. The accuracy, precision and repeatability were measured at three concentration levels (0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Intra-day and inter-day accuracy and precision (each, $n = 5$) determined by repeatedly assaying samples on the same day and on two consecutive days are summarized in Table 1. Selectivity of the method was conducted by comparing the chromatograms of samples obtained by extraction of pure PLA fibers (served as a blank sample) and that of PTX-loaded PLA fibers containing PEG(6). The obtained data confirmed that the developed method is selective, precise, linear, sensitive, and hence validated.

Table 1 Intra-day, inter-day accuracy and precision of HPLC-UV determination of PTX in the mixture with PBS containing 0.5% Tween ($n = 5$).

c (PTX) Theoretical [ng/mL]	Intra-day Measured [ng/mL]	Accuracy [%]	Precision [%]	Inter-day Measured [ng/mL]	Accuracy [%]	Precision [%]
100	100.34 ± 0.58	100.34	0.73	99.98 ± 0.84	99.98	0.84
1000	1001.3 ± 4.1	100.13	0.42	1001.5 ± 3.2	100.15	0.33
10000	10110 ± 12	100.75	0.12	1093 ± 29	100.93	0.29

2.5. Determination of drug loading efficiency

PTX was added to the polymer solution in a concentration of 10 wt% (relative to the total polymer content) before electrospinning. Determination of PTX loading to the fibrous materials was done by extraction experiments. Five round targets (diameter 12.5 mm) were cut from the PTX-loaded fibrous material and put in 10 mL of methanol. Extraction was conducted in a tempered shaker (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Riga, Latvia) at 25°C and 140 rpm for 24h. Extracts were diluted 50 times and measured by HPLC method (described in detail above). The experiments were performed in triplicate and calculated relative standard deviations were below 10 %.

2.6. In vitro drug release experiments

The release profiles of PTX were studied for PTX-loaded fibrous materials varying in a presence and MW of the added PEG (0 or 15 wt% of MW 6, 20, or 35 kDa). Blank PLA fibers were used as a reference. Release experiments were conducted in a tempered shaker (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Riga, Latvia) at 37°C and 140 rpm in a mode with continuous exchange of a part of the solution. Five round targets (diameter 12.5 mm) were cut from the PTX-loaded fibers and put in 5 mL of PBS. At the given time period, 1 mL of the solution was removed for the PTX analysis and 1 mL of fresh PBS was added into the extraction bottles. The aliquots were collected at 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48 and 72 h after immersion. The PTX concentration in aliquots was determined by HPLC-UV method described above. All experiments were conducted in triplicate and the standard deviation of each value is given in the form of error bars within the related figure.

2.7. In vitro cytotoxicity

PLA fibrous materials were tested on human breast cancer MDA-MB-231 cell line. Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% bovine serum (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Biosera, Nuaille, France) at 37°C. Samples were sterilized under UV light for 30 minutes, cut with biopsy punch 4 mm in diameter and added to cells in 24-well plates for 48 h. Cell viability was determined by AlamarBlue Assay and presented as a percentage of control untreated cells ($cell\ viability\ (\%) = [RFU_{treated\ cell}] / [RFU_{untreated\ control\ cell}] \times 100$, where RFU is relative fluorescence unit). Each data point was derived from the results of at least two independent experiments, each experiment was conducted in triplicate.

2.8. Chorioallantoic membrane (CAM) assay

Upon delivery, fertilized chicken eggs were cleaned with an antiseptic solution [53]. Initially, the eggs were incubated horizontally at 37°C and 70% humidity. At the fourth day of development, eggs were cleaned with 70% ethanol and a window of 3 cm in diameter was opened at a blunt side of the egg

using an eggpunch (Schuett-biotec, Göttingen, Germany). After the careful removal of the inner egg membrane, the window was closed with a small petri dish and the egg incubation continued in a static position. At the egg development day (EDD) 9, the fibrous mats (cut under the sterile conditions to 2x1 mm small pieces) were placed on the vascular CAM. Starting from the day of the sample placement, a daily evaluation of the antiangiogenic response was carried out using a stereomicroscope (Stemi 2000-C, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany) at 13 fold magnification. Pictures were taken with a digital camera (Moticam 2000; Motic China Group, Hong Kong, China) connected to the stereomicroscope. Each image was captured using Motic Image Plus 2.0 software. The observation finished at EDD 15. All experiments were performed at least five times.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one-way ANOVA/post-hoc Tukey test. A value of $p < 0.01$ was considered significant. All experiments were performed as at least two independent measurements, each in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of fibrous materials

Needleless electrospinning proved to be an effective method to produce nano-/microfibers from various natural and synthetic polymers with diameters ranging from tens of nanometers to tens of micrometers and thicknesses of the mats (expressed as area weight) ranging from 1 to 100 g per m² [28,29]. In this study, PLA fibrous materials with area weights of approximately 10 g/m² were prepared and their specification is given in Table 2.

Table 2 Overview of prepared PLA fibrous materials.

Sample Code	PEG content	PTX content	Specific surface area ^d		Total pore volume ^d	
	theoretical/ determined ^a	theoretical/ determined ^b	fresh	washed	fresh	washed
	wt%		m ² /g		mm ³ /g	
PLA	-	-	2.63 ± 0.09	3.14 ± 0.04	2.67	4.17
PLA-PEG(6)	15/14.5	-	3.24 ± 0.11	3.37 ± 0.05	3.16	4.20
PLA-PEG(20)	15/15.2	-	2.33 ± 0.05	4.05 ± 0.03	2.54	7.66
PLA-PEG(35)	15/15.1	-	2.90 ± 0.05	5.27 ± 0.07	3.61	16.53
PLA-PTX(10)	-	10/(9.96 ± 0.77)	3.13 ± 0.09	2.31 ± 0.02	4.48	2.80
PLA-PTX(10)-PEG(6)	15/ ^c	10/(10.78 ± 0.90)	1.69 ± 0.07	2.91 ± 0.01	1.43	3.92
PLA-PTX(10)-PEG(20)	15/ ^c	10/(9.20 ± 0.72)	2.01 ± 0.09	3.32 ± 0.04	1.87	4.68
PLA-PTX(10)-PEG(35)	15/ ^c	10/(9.19 ± 0.09)	1.79 ± 0.08	4.70 ± 0.04	1.62	8.56

^a from ¹H NMR spectra^b from extraction measurements determined by HPLC-UV (*n* = 3)^c not measured^d from BET measurements, pore diameter <40nm

Chemical composition

In our previous work we confirmed the effect of amphiphilic PEG on hydrophobic cyclosporine release when the PEG content was 15wt% related to the PLA polymer [32], therefore, the same PEG concentration was used in this study. The real PLA/PEG ratio in prepared fibers was determined from ¹H NMR spectra based on well-differentiated signals assigning to each polymer. For PLA, signals at 5.11-5.24 ppm and 1.56-1.58 ppm corresponding to methine and methyl protons respectively were detected. PEG is characterized by signal of methylene protons at 3.64 ppm. The PEG content in fibers was calculated from intensity ratio of signal for methine proton (PLA) and methylene protons (PEG) and the results are given in Table 2. The real content of PTX loaded to the fibers was determined by extraction experiments. Methanol was used as a suitable solvent to fully extract PTX from the fibers. The concentration of PTX in methanol solutions was determined by HPLC-UV method. The results given in Table 2 showed that fibers contained 10 ± 0.8 wt% of PTX, i.e. 92-108% of the PTX concentration in electrospun mixture. It can be stated that the chosen PLA-PTX-PEG system together with setting of electrospinning conditions enabled the preparation of fibers with a composition in agreement with the composition of the initial electrospun mixture.

Morphology

Morphology of prepared fibrous materials was examined by SEM and images are presented in Fig. 2. Relatively broad diameter distribution of PLA fibers was observed in the prepared samples with diameters ranging from approximately 200 nm to 3 μm. The most frequent fiber diameters were determined between 200 and 600 nm and other local maxima from approximately 2 to 3 μm. Assumption that this bimodal distribution was caused by two distinct polymers PLA and PEG was not confirmed, as it was observed even in the case of pure PLA fibers. The incorporation of PEG and PTX did not have such effect on the fiber morphology which could influence the PTX release. In the case

of PEG of the highest MW (35 kDa), the distribution was broader with less distinct most frequent fiber diameter. This can be attributed to the increase of viscosity of the electrospun mixture, which is an important parameter influencing the electrospinning process and consequent final properties of the fibers.

As it was reported on needle electrospinning, the fibers originating from homogeneous polymer/drug solution [54] contains homogeneously incorporated drug in the fibers. Apparently, PTX was easily dissolved in PLA/PEG electrospun mixture and, subsequently after electrospinning, no drug crystals on the fiber surface or within the fibrous structure were detected.. It can be stated that appropriate needleless electrospinning conditions were found to provide materials with reproducible fibrous structure and with homogeneously incorporated drug inside the fibers.

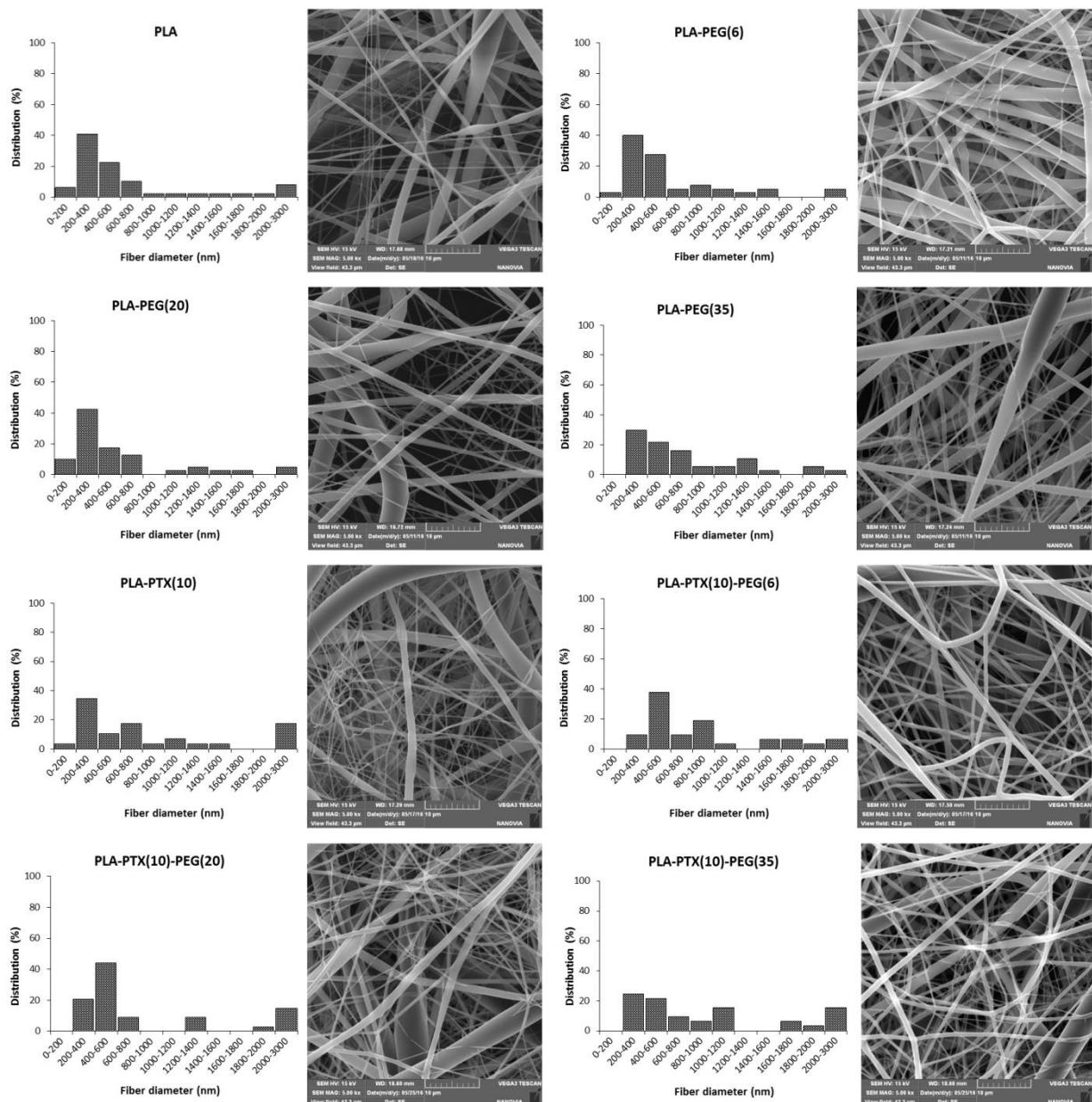


Fig. 2. SEM images and fiber diameter distributions of the prepared PLA fibrous materials. Magnification of SEM images is 5,000x.

The parameters such as specific surface areas and volumes of pores up to 40 nm were determined from the adsorption/desorption isotherm measurements. The obtained values are summarized in Table 2. The values of specific surface areas of fresh samples in the range of 1.6 to 3.2 presumed that prepared fibrous materials exhibited very low or almost imperceptible porosity inside the fibers. Addition of PEGs of various MW to PLA material did not have any definite influence on either specific surface area or porosity. On the other hand, incorporation of PTX to pure PLA caused an increase in specific surface area and porosity by 20 % and 70 %, respectively. Contrary, addition of PTX to PEG containing PLA fibers resulted in a decrease of both parameters, i.e. specific surface area decreased by 15 to 50 % and porosity by 30 to 55%. Amphiphilic character of PEGs contributed to better compatibility of all components and ensured the homogeneity of electrospun mixtures. Considering the application of drug-loaded materials in liquid media/tissue, measurements of the samples immersed in PBS buffer for 6 weeks were performed to reveal the morphology changes. Generally, comparing the data from Table 2 (column fresh vs washed) an increase in the values of observed morphological parameters was found. This was mainly caused by the washing out of PEG molecules and the changes were accentuated with increasing the MW of PEG; e.g. for samples with PEG of MW 35 kDa the surface area and porosity increased by ca 80 and 360%, respectively. For PTX-loaded PLA/PEG samples, the increase of both parameters followed similar trends. The only exception was found in the case of pure PLA samples containing PTX, where specific surface area decreased by approx. 30% and porosity almost 40%. The explanation can be in the washing out of the part of PTX, which was not homogeneously incorporated into the fibers, although SEM images did not revealed any crystals or beads in the PLA-PTX samples. These findings show homogenization effect of the electrospun mixture due to the presence of amphiphilic PEG and consequent prevailing release of PTX from inside the fibers caused by PEG washing out (results discussed below in part 3.2.).

Thermal characteristics

Thermal properties of the fibrous materials were studied by DSC. The enthalpy values were obtained from the areas under the melting and crystallization curves. The overall data are summarized in Table 2 and DSC scans of 1st and 2nd heating runs are shown in Fig. 3. For pure PLA, the T_g was observed at 59°C. It is reported, that addition of PEG has a plasticizing effect causing the decrease of T_g due to enhanced segmental mobility of PLA in the presence of PEG [50,55]. However, in our case, T_g for PEG-containing PLA samples could not be precisely detected while it lies in the range of endothermic peaks of PEG melting at around 55°C.

The endothermic peaks of PLA melting were well defined in the range 162 to 168°C for all samples regardless of PEG presence and heating run. The melting endotherm of PEG was present at around 54-57°C. Separated T_m corresponding to PLA and PEG suggested the phase separation of both polymers. It is in accordance with published data about phase separation which occurred at 10 wt% of PEG for PLA/PEG molding blends [56] or even at 5 wt% of PEG for PLA/PEG electrospun fibers [55]. Electrospinning process with rapid solvent evaporation and an electrical charge on the fiber surface lead to the higher tendency towards phase separation in this system. PEG melting peak was not visible upon re-heating indicating not sufficient crystallization rate under the experimental conditions of DSC measurements.

Compared to the commercial PLA pellets used for fiber preparation, all the fibrous samples underwent cold crystallization. During the 1st heating run; a broad exothermic peak can be found at 94°C and 74°C for pure PLA and PEG-containing PLA, respectively. The decrease in T_c with PEG addition to PLA has been previously described proving the plasticizing effect of PEG on PLA [50,55].

During the cooling, PLA crystallization occurred only for samples containing PEGs with exothermic values of 23 J/g (not shown in Table 3). During the re-heating (2nd run), the significant PLA cold crystallization peak was detected for pure PLA at 116°C, while for PEG-containing PLA almost undistinguished T_c peaks were observed at around 82°C. Consequently, crystallization enthalpy (ΔH_{cc}) value decline from 31 to ca 3.5 J/g was reflected in an increase of calculated degree of crystallinity (χ_c) from 5 to about 40% (value 5 % is similar to the semicrystalline pellets before electrospinning). Moreover, from the double melting peaks for pure PLA, it is clear that polymer chains were arranged in either two differently large crystallite types or in two crystallographic modifications over the cold crystallization process. This was not observed in presence of PEG in the samples. It can be assumed that the addition of PEG led to the enhanced chain mobility and promoted the crystallization ability of PLA.

The drug incorporated in the polymer matrix is mostly considered as a plasticizer leading to the lower T_g , T_m , and T_{cc} [50,57]. In our case, loading of PTX into PLA fibers did not obviously influence T_g or T_m of PLA. Apparent was the shift of cold crystallization to higher temperatures and decrease of melting enthalpy resulting in the lower calculated PLA degree of crystallinity (see data for 1st heating run in Table 2). Observed broadening of the melting peak of PLA can be attributed to the melting of two different types of crystals which may be due to two structures in the crystalline phase. When adding PEG to PTX-loaded PLA fibers, the cold crystallization did not occur and PLA degree of crystallinity increased significantly proving the crystallization aiding ability of PEG.

Table 3 Thermal characteristics of PLA fibrous materials.

Sample Code	T_g^{PLA}		T_m^{PLA}		T_{cc}^{PLA}		ΔH_m^{PLA}		ΔH_{cc}^{PLA}		χ_c^a		
	°C										J/g		%
Heating run	1 st	1 st	1 st	2 nd	1 st	2 nd	1 st	2 nd	1 st	2 nd	1 st	2 nd	
PLA ^b	61	171	- ^c	- ^c	40	4	- ^c	- ^c	42.7	4.6			
PLA	59	167	94	116	35	36	14	31	22.7	5.0			
PLA-PEG(6)	- ^d	167	72	81	34	35	10	4	29.9	40.5			
PLA-PEG(20)	- ^d	167	73	82	33	35	13	5	25.2	37.6			
PLA-PEG(35)	- ^d	168	75	82	33	35	12	4	26.7	40.3			
PLA-PTX(10)	61	165	106	131	29	22	19	9	12.4	14.4			
PLA-PTX(10)-PEG(6)	- ^d	162	165	87	32	36	- ^c	19	45.9	24.1			

^a calculated according to Eq. 1

^b pellets of the commercial PLA

^c not observed

^d not detected, overlaid by PEG melting

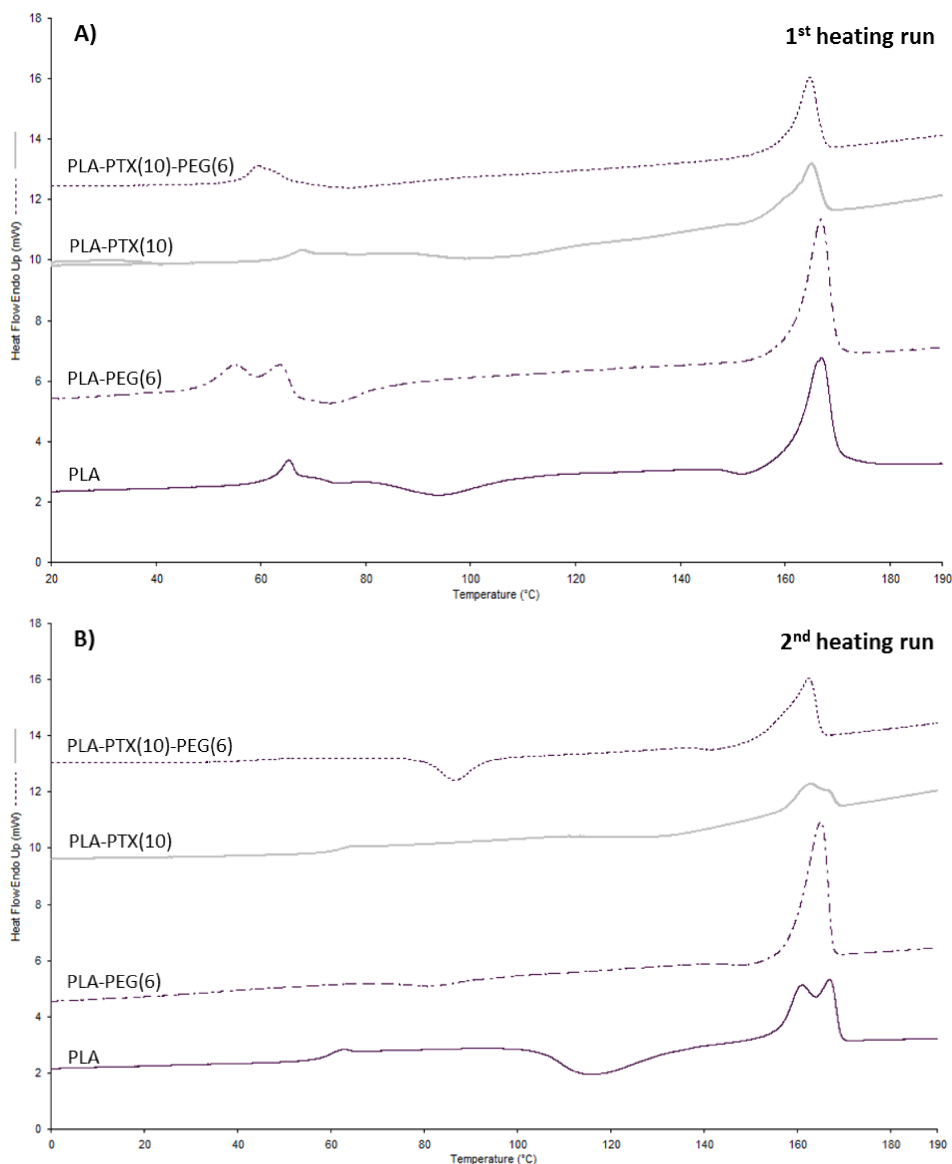


Fig. 3. DSC thermograms of PLA-PEGs fibers: (A) 1st heating run and (B) 2nd heating run.

XRD measurements

To further analyze the physical state of PLA and PEG, the fibers were characterized by XRD measurements. PLA crystals are characteristic by the main diffraction peak at around 16.5° and peaks at 19° and 23° are assigned as characteristic for PEG [58]. The diffraction patterns of pure PLA, PLA-PEG fibers and PEG(6) powder are shown in Fig. 4. It can be seen that diffraction curves of PLA-PEGs are superposition of those of pure polymers indicating the phase separation of polymer components, i.e. they do not react together chemically. The PLA peak at around 5° apparently shifts to slightly higher angle in the blends. That hints changes in the small angle region which is however out of the scope of this work. It can be concluded that XRD measurements confirmed the presence of crystalline phase of both polymers in the fibers and the results are consistent with the DSC analysis discussed above.

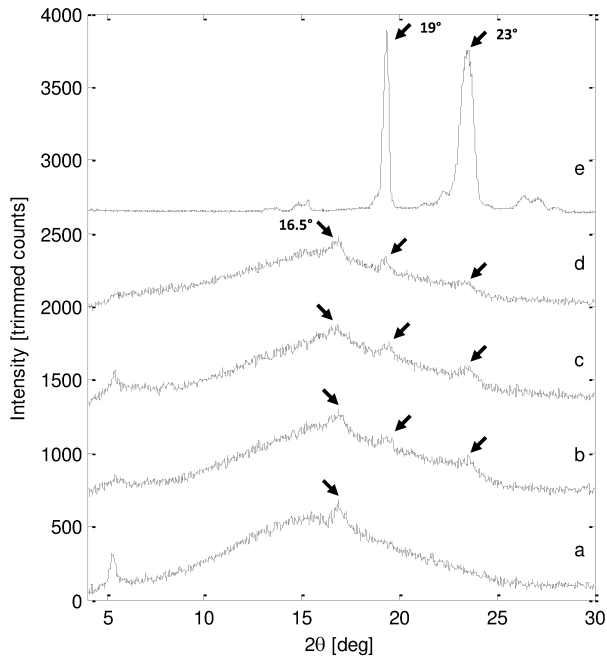


Fig. 4. XRD patterns of PLA-PEG fibers using CuK α ($\lambda=0.154$ nm) radiation. a) pure PLA, b) PLA-PEG(6), c) PLA-PEG(20), d) PLA-PEG(35), e) PEG(6) powder. For clarity data were shifted in vertical direction and powder data were down-scaled.

3.2. *In vitro* release experiments detected by HPLC-UV method

The PTX release experiments into PBS buffer (pH 7.4) were studied with four types of materials: PTX-loaded PLA and PTX-loaded PLA containing PEG of MWs 6, 20, or 35 kDa. Blank PLA fibers were used as a reference. The mode of continuous exchange of buffer was chosen to better simulate physiological conditions. The quantification of the released PTX was determined by HPLC-UV method. The release profiles of PTX are shown in Fig. 5; the total cumulative amounts of released PTX in time course are presented in Fig 5A and the amounts of released PTX corresponding to the given time period are presented in Fig. 5B. The results indicated that fibers containing PEG released significantly higher amounts of PTX and the release time was prolonged compared to the PTX-loaded fibers without PEG. Similar results were obtained in our previous work which examined the release of hydrophobic cyclosporine A from PLA/PEG fibers [59]. It is evident that the initial burst release of PTX is followed by a constant slow release. The prompt release is more pronounced for PEG containing fibers and for PEG of 6 kDa when comparing the fibers with PEG of various MWs. This can be explained by the fact that PTX release is facilitated by releasing of PEG and is the fastest in the case of PEG of the lowest MW. These higher released PTX amounts in initial stage also increased the overall PTX release profiles in the cumulative mode, although the released amounts of PTX from the fibers with PEG of higher MWs are slightly higher in the later stage of the experiment (see Fig. 5A vs B). This effect can be explained by the differences in crystallinity, phase separation of the two polymer component depending on the MW of particular PEG. The sustained release of small amounts of drug can be also attributed to the increased surface area interfacing the solid fibers and the surrounding liquid after PEG washing out, which was proved by the BET measurements (see Table 1). The release experiment also shows release of some small amount of PTX from the pure PLA sample during the first time period of the experiment caused by the dissolution of PTX

inhomogeneously incorporated in the fibers, which is in accordance with the morphology experiments, i.e. decrease of surface area and porosity after washing. The obtained release profiles can be considered as promising for designing local delivery systems; various experiments as well as medicinal practice proved that rapid delivery of high initial drug dosage can kill tumor cells and subsequent slow release can be sufficient to prevent further proliferation of the tumor cells.

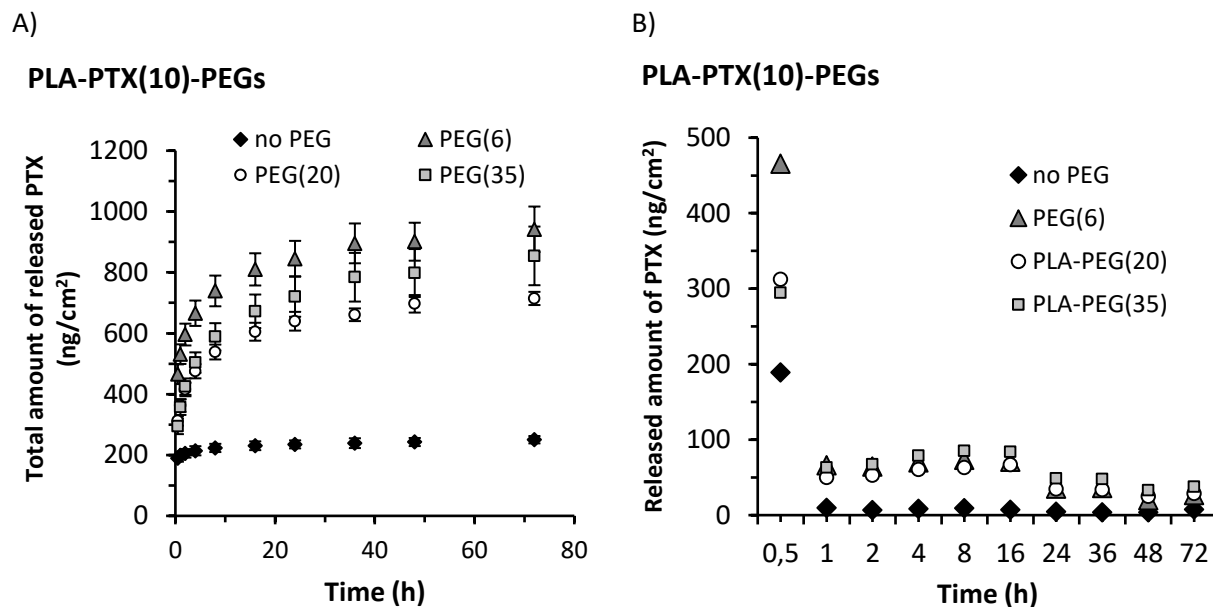


Fig. 5. The release profiles of PTX into PBS (pH 7.4) from PLA-PTX(10)-PEG(6, 20, 35) fibers. A) The total amounts of released PTX from fibers and B) the individual amounts of PTX released at particular time period from fibers. Results were determined by HPLC-UV method. Error bars were calculated using the standard deviations ($n = 3$).

3.3. *In vitro* cytotoxicity of PTX released from PLA fibrous mats

The cell viability of cell line MDA-MB-231 after the treatment with PLA, PLA-PEG(6,20,35) PLA-PTX(10) and PLA-PTX(10)-PEG(6,20,35) fibers for 48 h was determined. From Fig. 6, it is apparent that the polymer matrix PLA was not toxic for the cells. There was no observed toxicity even with the addition of PEG to the PLA matrix, fibers maintained inert to the cells. The toxicity of PTX-loaded fibers after 48h was determined, showing significant cytotoxic effect ($p < 0.01$) compared to samples without PTX. There was no significant variance in the viability of the cells by PEG addition and various MWs of PEG. Differences in drug release between PLA-PTX(10) and PLA-PTX(10)-PEGs was further studied in a long-term incubation assay which results are published elsewhere [60].

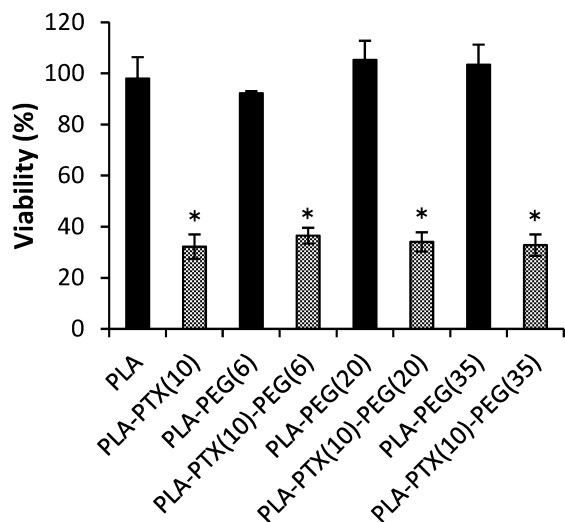


Fig. 6. Cell viability of MDA-MB-231 cell line after PLA, PLA-PEG, PTX-loaded PLA and PLA-PEG fiber treatment for 48 h. (* indicates significant difference with $p < 0.01$ between the corresponding fibers without/with PTX).

3.4. Investigation of antiangiogenic activity of PLA fibrous mats

Angiogenesis plays a crucial role in many normal physiological processes as well as in tumor neovascularization associated with the cancer progression. During the cancer development, the newly formed tumor-associated blood vessels serve first as feeding tubes for a growing tumor and next, as conduits for dissemination of the tumor cells that escaped from an established primary tumor [61]. Therefore, the control of tumor angiogenesis has become an important issue in the fight against cancer progression. In the CAM assay, the chorioallantoic membrane as a specialized and highly vascularized extraembryonic tissue of the avian embryo, can be used to study anti- or pro-angiogenesis [62]. In the chick embryo, the chorioallantois is formed between days 4 and 5 of the development, when the outer mesodermal layer of the allantois fuses with the mesodermal lining of the chorion, and a network of blood vessels is gradually formed between the two layers. The central portion of the CAM is fully developed by day 8 to 10 at which time it becomes capable of sustaining grafts [61].

Chick CAM assay was successfully used for testing of various anti- and pro-angiogenic agents [63]. The almost first published evidence about a possible antiangiogenic activity of PTX was in the report by Dordunoo at 1995 [64], where he showed that formulations based on poly(ϵ -caprolactone) microspheres containing PTX inhibited angiogenesis in the chick CAM model.

In presented study, chick CAM model was used to observe the antiangiogenic activity of PTX released from PLA fibrous mats. Moreover, as CAM assay can be considered as an *ex vivo* model the biocompatibility of the fibers prepared without drug was evaluated. Pairs of samples, without and with loaded PTX, were put together into one egg at EDD 9 as illustrated on Fig. 7 for samples PLA-PEG(20) and PLA-PTX(10)-PEG(20). Figure 8 shows the results from series PLA-PEG(20), PLA-PTX(10) and PLA-PTX(10)-PEG(20).

The PLA-PEG fibrous mats did not exhibit any toxic effect to the CAM, a normal capillary network architecture was generated upon the sample application as can be seen from Fig. 8, column A. Thus, the pure polymer matrix showed to be non-toxic which corresponds to the results obtained from cell viability tests. The CAM treated with PLA-PTX(10) fibers exhibited a slight antiangiogenesis at the first

day after the sample placement. The following day (EDD11) tiny vessels surrounding the sample appeared and formed the normal capillary network upon other days without any evidence of antiangiogenic effects (Fig. 8, column B). In the case of PLA-PTX(10)-PEG(6), also only a weak antiangiogenic effect was observed with a delay in the vascular development (data not shown). The fibers with PEG of the highest MW (PLA-PTX(10)-PEG(35)) exhibited a light inhibition of angiogenesis (the vessels became less dense) which was visible for two days after the placement on the CAM. Later, the vessels developed rapidly towards the graft (data not shown). On the other hand, the CAM treated with PLA-PTX(10)-PEG(20) elicited a massive and long-lasting antiangiogenic effect with nearly complete disappearing of vessels after five days (Fig. 8, column C).

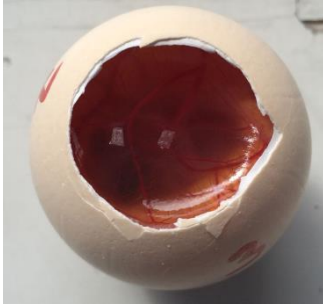


Fig. 7. A macroscopic picture of the egg with the PLA fibrous mats put on the CAM at egg development day 9. PLA-PEG(20) on the right side and PLA-PTX(10)-PEG(20) on the left side.

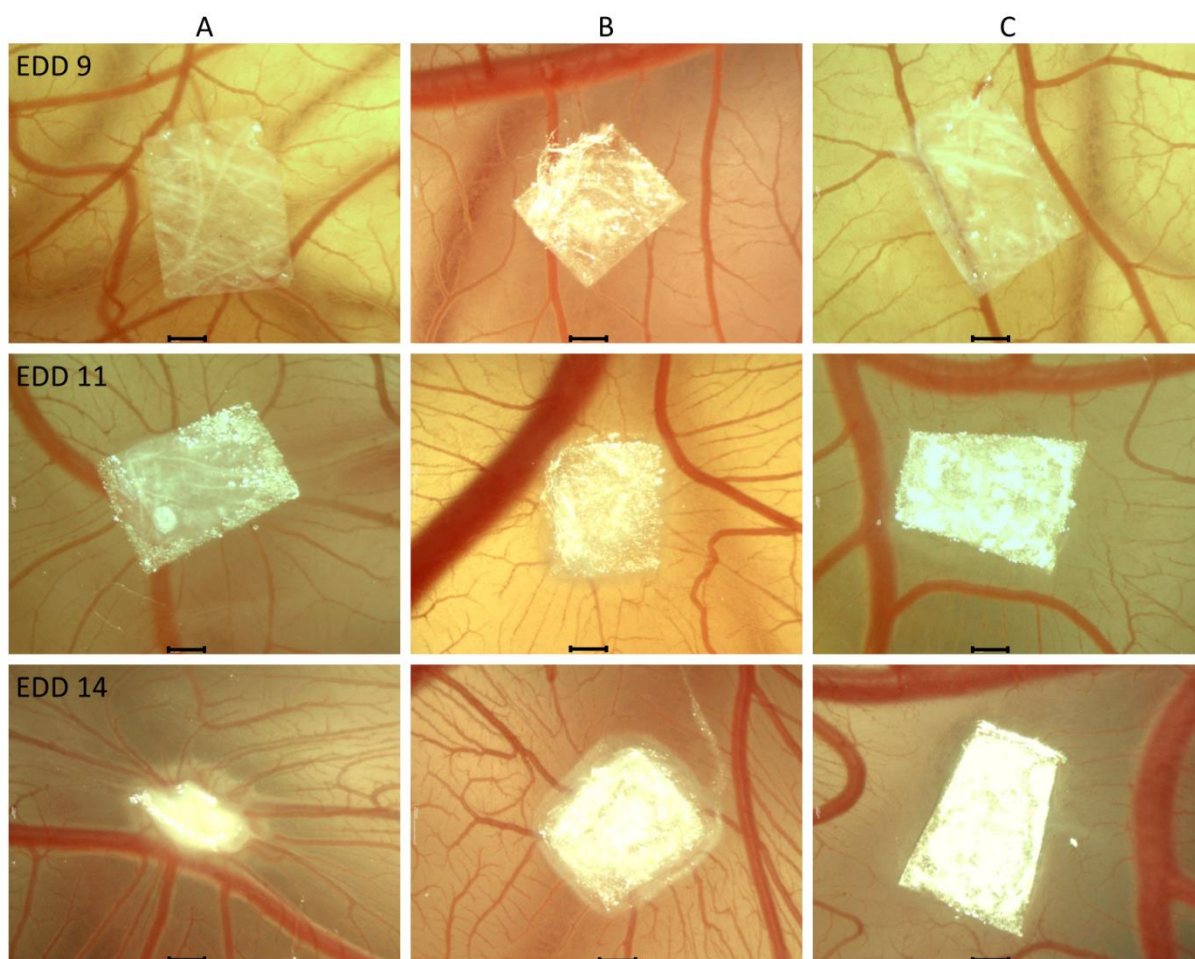


Fig. 8. The antiangiogenic activity of PLA fibrous mats on chick CAM at 13 fold magnification. Columns represent A) PLA-PEG(20), B) PLA-PTX(10) and C) PLA-PTX(10)-PEG(20) fibers. Scale bars represent 500 μm .

The results of CAM assay generally corresponded to the release profiles of PTX into PBS buffer. Small amounts of PTX released from the fibers without added PEGs were insufficient in terms of antiangiogenesis. Some delay in the vascular development after PLA-PTX(10)-PEG(6) fibers treatment corresponds to the PTX release profile from these fibers, where initial burst release was not followed by the additional release in the later stage. Contrary to the release profile of the PTX from PLA-PTX(10)-PEG(35), only a weak antiangiogenic activity exhibited these fibers in CAM assay. From the perspective of antiangiogenesis, fibrous mats with PEG of MW 20 KDa were proved to be highly effective.

4. Conclusion

In present work we describe PLA/PEG fibrous carriers of hydrophobic anticancer agent paclitaxel. The needleless electrospinning was proved to be efficient method for the micro/nanofibrous carrier preparation. SEM images showed that PTX added in 10 wt% was homogenously incorporated into the fibers. The addition of amphiphilic PEGs of various MWs did not significantly influence the morphology of fibrous materials. Morphological analysis did not reveal any changes in the specific surface areas and volumes of pores up to 40 nm in diameter in fibers with PEGs, however, when those samples were immersed into PBS buffer for 6 weeks, higher surface areas and pore volumes were revealed, which significantly increased with MW of PEG used. The DSC and XRD measurements showed that PLA and PEG did not form a new phase in the blends and they retained certain level of crystallinity in the formed fibers.

PTX release profiles determined by HPLC-UV exhibited very low amounts of PTX released from the pure PLA fibers. The addition of PEGs (15 wt%) significantly increased the released amounts of PTX and also prolonged the release time period. This effect was more pronounced with PEG of the lowest MW in the initial stage of the release experiments. On the other hand, the use of PEG of MW 20 kDa and 35 kDa ensured the release of the additional amounts of PTX in later time periods.

The biocompatibility and nontoxicity of PLA/PEG matrices was confirmed by cell viability test and also by CAM assay. *In vitro* experiments on MDA-MB-231 human breast cancer cell line conducted for 48h showed significant cytotoxic effect of PTX released from carriers, however, the influence of the PEG addition on the efficiency of released PTX was not significant for such a short experimental time period. CAM assay proved excellent bioavailability of PLA/PEG carriers. The addition of PEGs significantly improved release rates of hydrophobic PTX and enhanced antiangiogenic effect. Particularly PLA-PTX(10)-PEG(20) fibers exhibited excellent antiangiogenic properties and thus were found to be potential materials for local delivery of anticancer drugs.

Acknowledgments:

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic [grant number 16-04863S]; the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the National Sustainability Program II [project BIOCEV-FAR LQ1604, "BIOCEV" CZ.1.05/1.1.00/02.0109]; the Ministry of Health of the Czech Republic for the conceptual development of research organization, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic [grant number 00064203]; and by the Charles University [grant GA UK number 307115 and grant SVV]. Authors thank to Nanovia Ltd. (M. Munzarova) for cooperation in fibers preparation by needleless electrospinning.

References

- [1] C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1413–1433. doi:10.1016/j.addr.2007.04.022.
- [2] D. Kai, S.S. Liow, X.J. Loh, Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C* 45 (2014) 659–670. doi:10.1016/j.msec.2014.04.051.
- [3] J. Pelipenko, P. Kocbek, J. Kristl, Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration, *Int. J. Pharm.* 484 (2015) 57–74. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.02.043.
- [4] M. Zamani, M.P. Prabhakaran, S. Ramakrishna, Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 2997–3017. doi:10.2147/IJN.S43575.
- [5] R. Sharma, H. Singh, M. Joshi, A. Sharma, T. Garg, A.K. Goyal, et al., Recent advances in polymeric electrospun nanofibers for drug delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 31 (2014) 187–217. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2014008193.
- [6] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing, Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications, *J. Control. Release* 185 (2014) 12–21. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.018.
- [7] S.F. Chou, D. Carson, K.A. Woodrow, Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers, *J. Control. Release* 220 (2015) 584–591. doi:10.1016/j.jconrel.2015.09.008.
- [8] K. Ulubayram, S. Calamak, R. Shahbazi, I. Eroglu, Nanofibers based antibacterial drug design, delivery and applications, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 1930–1943.
- [9] D.W.-C. Chen, J.-Y. Liao, S.-J. Liu, E.-C. Chan, Novel biodegradable sandwich-structured nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: An in vitro and in vivo study, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 763–771. doi:10.2147/IJN.S29119.
- [10] G. Buschle-Diller, J. Cooper, Z. Xie, Y. Wu, J. Waldrup, X. Ren, Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers, *Cellulose* 14 (2007) 553–562. doi:10.1007/s10570-007-9183-3.
- [11] H. Jiang, D. Fang, B. Hsiao, B. Chu, W. Chen, Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 279–296. doi:10.1163/156856204322977184.
- [12] X. Xu, X. Chen, P. Ma, X. Wang, X. Jing, The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 165–170. doi:10.1016/j.ejpb.2008.03.010.
- [13] R. Toshkova, N. Manolova, E. Gardeva, M. Ignatova, L. Yossifova, I. Rashkov, et al., Antitumor activity of quaternized chitosan-based electrospun implants against Graffi myeloid tumor, *Int. J. Pharm.* 400 (2010) 221–233. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.08.039.
- [14] K. Qiu, C. He, W. Feng, W. Wang, X. Zhou, Z. Yin, et al., Doxorubicin-loaded electrospun poly(L-lactic acid)/mesoporous silica nanoparticles composite nanofibers for potential postsurgical cancer treatment, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 4601. doi:10.1039/c3tb20636j.
- [15] T. Lu, X. Jing, X. Song, X. Wang, Doxorubicin-loaded ultrafine PEG-PLA fiber mats against hepatocarcinoma, *J. Appl. Polym. Sci.* 123 (2012) 209–217. doi:10.1002/app.34463.
- [16] S. Li, D. Liu, Y. Zheng, Y. Yue, Y. Huang, X. Jing, Inhibitory effects of paclitaxel-loaded PLA nanofibers against mice cervical cancers, *Acta Polym. Sin.* 012 (2012) 1029–1034. doi:10.3724/SP.J.1105.2012.12066.
- [17] J. Xie, C.H. Wang, Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to

- treat C6 glioma in vitro, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1817–1826. doi:10.1007/s11095-006-9036-z.
- [18] P. Chen, Q.-S. Wu, Y.-P. Ding, Z.-I. Zhu, Preparation of cisplatin composite micro/nanofibers and antitumor activity in vitro against human tumor spc-a-1 cells, *Nano.* 06 (2011) 325–332. doi:10.1142/S1793292011002688.
- [19] Y. Ma, X. Wang, S. Zong, Z. Zhang, Z. Xie, Y. Huang, et al., Local, combination chemotherapy in prevention of cervical cancer recurrence after surgery by using nanofibers co-loaded with cisplatin and curcumin, *RSC Adv.* 5 (2015) 106325–106332. doi:10.1039/C5RA17230F.
- [20] J.A. Kaplan, R. Liu, J.D. Freedman, R. Padera, J. Schwartz, Y.L. Colson, et al., Prevention of lung cancer recurrence using cisplatin-loaded superhydrophobic nanofiber meshes., *Biomaterials.* 76 (2016) 273–281. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.060.
- [21] T. Amna, N.A.M. Barakat, M.S. Hassan, M.-S. Khil, H.Y. Kim, Camptothecin loaded poly(ϵ -caprolactone)nanofibers via one-step electrospinning and their cytotoxicity impact, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 431 (2013) 1–8. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.04.026.
- [22] X. Luo, H. Zhang, M. Chen, J. Wei, Y. Zhang, X. Li, Antimetastasis and antitumor efficacy promoted by sequential release of vascular disrupting and chemotherapeutic agents from electrospun fibers, *Int. J. Pharm.* 475 (2014) 438–449. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.09.006.
- [23] V. Jacobs, R.D. Anandjiwala, M. Maaza, The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 115 (2010) 3130–3136. doi:10.1002/app.31396.
- [24] O. Jirsák, F. Sanetrník, D. Lukáš, V. Kotek, L. Martinová, J. Chaloupek, A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method, 2006.
- [25] J.-C. Park, Electric spinning apparatus for mass-production of nano-fiber, 2008.
- [26] D. Lukas, A. Sarkar, P. Pokorny, Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach, *J. Appl. Phys.* 103 (2008) ID 084309. doi:10.1063/1.2907967.
- [27] G. Taylor, Electrically Driven Jets, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 313 (1969) 453–475. doi:10.1098/rspa.1969.0205.
- [28] M. Dubský, Š. Kubinová, J. Širc, L. Voska, R. Zajíček, A. Zajícová, et al., Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 931–941. doi:10.1007/s10856-012-4577-7.
- [29] J. Širc, R. Hobzová, N. Kostina, M. Munzarová, M. Jukličková, M. Lhotka, et al., Morphological characterization of nanofibers: Methods and application in practice, *J. Nanomater.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/327369.
- [30] J. Širc, S. Kubinová, R. Hobzová, D. Stránská, P. Kozlík, Z. Bosáková, et al., Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 5315–5325. doi:10.2147/IJN.S35781.
- [31] V. Holáň, M. Chudíčková, P. Trosan, E. Svobodová, M. Krulová, S. Kubinová, et al., Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression, *J. Control. Release.* 156 (2011) 406–412. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.022.
- [32] J. Širc, Z. Hampejšova, J. Trnovska, P. Kozlík, J. Hrib, R. Hobzova, et al., Cyclosporine A Loaded Electrospun Poly(D,L-Lactic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Nanofibers: Drug Carriers Utilizable in Local Immunosuppression, *Pharm. Res.* 34 (2017) 1391–1401. doi:10.1007/s11095-017-2155-x.
- [33] A.K. Singla, A. Garg, D. Aggarwal, Paclitaxel and its formulations, *Int. J. Pharm.* 235 (2002) 179–192. doi:10.1016/S0378-5173(01)00986-3.
- [34] G. Bocci, A. Di Paolo, R. Danesi, The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel, *Angiogenesis.* 16 (2013) 481–492. doi:10.1007/s10456-013-9334-0.

- [35] K. Krukiewicz, J.K. Zak, Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects, *Mater. Sci. Eng. C* 62 (2016) 927–942. doi:10.1016/j.msec.2016.01.063.
- [36] N.L. Elstad, K.D. Fowers, OncoGel (ReGel/paclitaxel) — Clinical applications for a novel paclitaxel delivery system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 785–794. doi:10.1016/j.addr.2009.04.010.
- [37] C. Nehate, S. Jain, A. Saneja, V. Khare, N. Alam, R. Dubey, et al., Paclitaxel formulations: Challenges and novel delivery options, *Curr Drug Deliv.* 11 (2014) 666–686. doi:10.2174/1567201811666140609154949.
- [38] S.-S. Feng, L. Mu, K. Win, G. Huang, Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 413–424. doi:10.2174/0929867043455909.
- [39] U. Westedt, M. Kalinowski, M. Wittmar, T. Merdan, F. Unger, J. Fuchs, et al., Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment, *J. Control. Release.* 119 (2007) 41–51. doi:10.1016/j.jconrel.2007.01.009.
- [40] Y. Kang, G. Yin, P. Ouyang, Z. Huang, Y. Yao, X. Liao, et al., Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS), *J. Colloid Interface Sci.* 322 (2008) 87–94. doi:10.1016/j.jcis.2008.02.031.
- [41] G. Ma, Y. Liu, C. Peng, D. Fang, B. He, J. Nie, Paclitaxel loaded electrospun porous nanofibers as mat potential application for chemotherapy against prostate cancer, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 505–512. doi:10.1016/j.carbpol.2011.04.082.
- [42] S.H. Ranganath, C.H. Wang, Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma, *Biomaterials.* 29 (2008) 2996–3003. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.002.
- [43] Q. Ding, Z. Li, Y. Yang, G. Guo, F. Luo, Z. Chen, et al., Preparation and therapeutic application of docetaxel-loaded poly(D,L-lactide) nanofibers in preventing breast cancer recurrence, *Drug Deliv.* 23 (2016) 2677–2685. doi:10.3109/10717544.2015.1048490.
- [44] J. Hrib, J. Sirc, R. Hobzova, Z. Hampejsova, Z. Bosakova, M. Munzarova, et al., Nanofibers for drug delivery - Incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure, *Beilstein J. Nanotechnol.* 6 (2015) 1939–1945. doi:10.3762/bjnano.6.198.
- [45] C.L. Huang, T.W. Steele, E. Widjaja, F.Y. Boey, S.S. Venkatraman, J.S. Loo, The influence of additives in modulating drug delivery and degradation of PLGA thin films, *NPG Asia Mater.* 5 (2013) e54. doi:10.1038/am.2013.26.
- [46] T.W.J. Steele, C.L. Huang, E. Widjaja, F.Y.C. Boey, J.S.C. Loo, S.S. Venkatraman, The effect of polyethylene glycol structure on paclitaxel drug release and mechanical properties of PLGA thin films, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1973–1983. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.002.
- [47] X. Xu, X. Chen, Z. Wang, X. Jing, Ultrafine PEG-PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro cytotoxicity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 18–25. doi:10.1016/j.ejpb.2008.10.015.
- [48] X. Xu, L. Yang, X. Xu, X. Wang, X. Chen, Q. Liang, et al., Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions, *J. Control. Release.* 108 (2005) 33–42. doi:10.1016/j.jconrel.2005.07.021.
- [49] S. Zong, X. Wang, Y. Yang, W. Wu, H. Li, Y. Ma, et al., The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93 (2015) 127–135. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.029.
- [50] A. Toncheva, R. Mincheva, M. Kancheva, N. Manolova, I. Rashkov, P. Dubois, et al.,

- Antibacterial PLA/PEG electrospun fibers: Comparative study between grafting and blending PEG, *Eur. Polym. J.* 75 (2016) 223–233. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.12.019.
- [51] E. Llorens, L.J. del Valle, R. Ferrán, A. Rodríguez-Galán, J. Puiggali, Scaffolds with tuneable hydrophilicity from electrospun microfibers of polylactide and poly(ethylene glycol) mixtures: morphology, drug release behavior, and biocompatibility, *J. Polym. Res.* 21 (2014) 360. doi:10.1007/s10965-014-0360-4.
- [52] E.W. Fischer, H.J. Sterzel, G. Wegner, Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions, *Kolloid-Zeitschrift Und Zeitschrift Für Polym.* 251 (1973) 980–990. doi:10.1007/BF01498927.
- [53] A. Özçetin, A. Aigner, U. Bakowsky, A chorioallantoic membrane model for the determination of anti-angiogenic effects of imatinib, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 711–715. doi:10.1016/j.ejpb.2013.07.010.
- [54] J. Zeng, L. Yang, Q. Liang, X. Zhang, H. Guan, X. Xu, et al., Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation, *J. Control. Release.* 105 (2005) 43–51. doi:10.1016/j.jconrel.2005.02.024.
- [55] L.M. Buttaro, E. Drufva, M.W. Frey, Phase separation to create hydrophilic yet non-water soluble PLA/PLA-b-PEG fibers via electrospinning, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014) 41030. doi:10.1002/app.41030.
- [56] K. Sungsanit, N. Kao, S.N. Bhattacharya, Properties of linear poly(lactic acid)/polyethylene glycol blends, *Polym. Eng. Sci.* 52 (2012) 108–116. doi:10.1002/pen.22052.
- [57] H. Peng, S. Zhou, T. Guo, Y. Li, X. Li, J. Wang, et al., In vitro degradation and release profiles for electrospun polymeric fibers containing paracetamol, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 66 (2008) 206–212. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.021.
- [58] S. Jiang, G. Liao, Synthesis and characterization of biocompatible poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide) and study on their electrospun scaffolds, *Polym. Plast. Technol. Eng.* 51 (2012) 1237–1244. doi:10.1080/03602559.2012.698686.
- [59] J. Širc, Z. Hampejšová, J. Trnovská, P. Kozlík, J. Hrib, R. Hobzová, et al., Cyclosporine A loaded electrospun poly(D,L-lactic acid)/poly(ethylene glycol) nanofibers: Drug carriers utilizable in local immunosuppression, *Pharm. Res.* 34 (2017) 1391–1401. doi:10.1007/s11095-017-2155-x.
- [60] J. Plch, K. Venclikova, O. Janouskova, J. Hrabeta, T. Eckschlager, K. Kopeckova, et al., Paclitaxel-Loaded Polylactide/Polyethylene Glycol Fibers with Long-Term Antitumor Activity as a Potential Drug Carrier for Local Chemotherapy, *Macromol. Biosci.* 1800011 (2018) 1–13. doi:10.1002/mabi.201800011.
- [61] E.I. Deryugina, J.P. Quigley, Chapter 2. Chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules, *Methods Enzymol.* 444 (2008) 21–41. doi:10.1016/S0076-6879(08)02802-4.
- [62] D. Ribatti, The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis, *Pharmaceuticals.* 3 (2010) 482–513. doi:10.3390/ph3030482.
- [63] P. Nowak-Sliwinska, T. Segura, M.L. Iruela-Arispe, The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering, *Angiogenesis.* 17 (2014) 779–804. doi:10.1007/s10456-014-9440-7.
- [64] S.K. Dordunoo, J.K. Jackson, L.A. Arsenault, A.M.C. Oktaba, W.L. Hunter, H.M. Burt, Taxol encapsulation in poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36 (1995) 279–282. doi:10.1007/BF00689043.

13.4 Publikace 4

Plch, J.; Venclíková, K.; Janoušková, O.; Hraběta, J.; Eckschlager, T.; Kopečková, K.; Hampejsová, Z.; Bosáková, Z.; Širc, J.; Hobzová R.: Paclitaxel-Loaded Polylactide/Polyethylene Glycol Fibers with Long-Term Antitumor Activity as a Potential Drug Carrier for Local Chemotherapy, Macromolecular Bioscience, 18, 6, (2018).



Paclitaxel-Loaded Polylactide/Polyethylene Glycol Fibers with Long-Term Antitumor Activity as a Potential Drug Carrier for Local Chemotherapy

Johana Plch, Kristyna Venclikova, Olga Janouskova, Jan Hrabeta, Tomas Eckschlager, Katerina Kopeckova, Zuzana Hampejsova, Zuzana Bosakova, Jakub Sirc, and Radka Hobzova*

Local application of anticancer agents prolongs the presence time and increases the concentration of drug in the target place and therefore may reduce serious side effects compared to drug systemic administration. The preparation of fibrous materials of polylactide (PLA) and polyethylene glycol (PEG) loaded with paclitaxel (PTX, 1 or 10 wt%) is presented. Scanning electron microscopy proves that PTX is homogeneously incorporated into the fibers. The addition of PEG of various molecular weights (6, 20, or 35 kDa) ensures the release of significantly higher amounts of hydrophobic PTX in a prolonged release time compared to the fibers containing PTX only. Present PLA-PEG fibrous carriers can serve as a drug depot for PTX since they exhibit significant toxicity for cancer cell lines in several-day experiment. They are promising for local recurrence therapy, where the initial release is efficient to kill tumor cells and continued release can prevent their subsequent proliferation.

systems for controlled local anticancer drug administration may reduce serious side-effects connected with systemic drug administration and significantly increase the therapeutic dose and prolong the presence time in the targeted area. The beneficial effect of such an approach can be seen mainly in case of soft tissue sarcomas or brain tumors. There are various methods for local administration of cytostatics, where the tumor location is the main factor influencing the preferred method. Monterrubio et al.^[1] observed in their experiments that drug released from polylactide (PLA) implants achieves high concentrations in a distance of 2 mm within the tumor bulk. Local chemotherapy could, therefore, yield promising

1. Introduction

Local recurrence of solid tumors following surgical resection and/or radiotherapy remains one of the challenges in oncology. The intensification of radiotherapy or more radical surgery is often limited by undesirable complications. New drug delivery

results as a subsequent treatment after an accurate surgery with optimal margins. Although most of the local delivery approaches are still at the research level, some of the loco-regional chemotherapeutic systems have already been approved by health agencies (FDA, EMA, etc.) indicating their safety and efficacy. Gliadel (copolymer matrix of 1,3-bis(*p*-carboxyphenoxy)propane and sebacic acid with carmustine) or OncoGel (a gel based on a copolymer of poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) and polyethylene glycol (PEG) with paclitaxel) are used in clinical practice.^[2]

Several systems can be used as reservoirs of anticancer drugs for local chemotherapy, involving nanoparticles, micelles, dendrimers, injectable hydrogels, etc.^[2] Recently, nanofibrous polymeric materials have been intensively studied as a drug delivery systems due to their unique morphological features and favorable drug loading capabilities.^[3–7] Several nanofibrous carriers loaded by anticancer drugs such as doxorubicin,^[8,9] paclitaxel,^[10–12] cisplatin,^[13–16] carmustine,^[13] and camptothecin^[17,18] were fabricated using blend, coaxial, or emulsion electrospinning. In some cases, the anticancer agents created self-assembled nanofibrous structures;^[19] however, they were usually incorporated into the nanofibers based on biocompatible polyesters such as PLA,^[15,16,20,21] polycaprolactone,^[14,18,22] PLGA^[11–13] or copolymers of PLA and PEG.^[9,17,23] The drug release is given either by its dissolution and diffusion or the fiber morphology, eventually the degradation mechanism depending on the polymer character, thereby providing carriers of various release profiles. Localized

J. Plch, Dr. J. Hrabeta, Prof. T. Eckschlager
Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Medical Faculty
Charles University and Motol University Hospital
V uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

K. Venclikova, Dr. O. Janouskova, Dr. J. Sirc, Dr. R. Hobzova
Institute of Macromolecular Chemistry
Academy of Sciences
Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic
E-mail: hobzova@imc.cas.cz

K. Kopeckova
Department of Oncology, 2nd Medical Faculty
Charles University and Motol University Hospital
V uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

Z. Hampejsova, Prof. Z. Bosakova
Department of Analytical Chemistry
Faculty of Science
Charles University
Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mabi.201800011>.

DOI: 10.1002/mabi.201800011



chemotherapy, delivered directly to the affected area, was found to be a promising approach for treating various malignancies such as glioma,^[12,24] breast,^[17,21] liver^[25] or lung cancers.^[14,26]

Paclitaxel (PTX) is a promising antitumor agent effective in the treatment of various cancers, especially ovarian and breast cancer.^[27] Moreover, its antiangiogenic activity was investigated as a possible additional mechanism contributing to antineoplastic *in vivo* activity.^[28] As a hydrophobic drug, it is poorly soluble in water. Intravenous administration of a current formulation in a nonaqueous solvent, Cremophor EL, may cause precipitation in an aqueous dilution or allergic reactions.^[27] To overcome the limitations associated with poor water solubility and to achieve prolonged drug activity, more “sophisticated” delivery systems are being developed, e.g., systems with nanoscale additives, such as mesoporous silica nanoparticles,^[29,30] carbon nanotubes,^[31] or hydroxyapatite nanoparticles^[32] incorporated into electrospun nanofibrous carriers. The release of hydrophobic drugs can also be favorably influenced by increasing the surface area of the carrier by forming a micro-/nanoparticle delivery system^[33] or by the addition of leachable polymers, such as PEGs.^[34,35] Amphiphilic PEGs, as FDA approved polymers possessing favorable physicochemical properties, are often employed as modifying agents to improve compatibility of the polymer-drug system and enhance the aqueous solubility and dissolution characteristics of hydrophobic drugs.^[24,26] The influence of addition of PEG on PTX release from PLGA thin films was studied^[36,37] confirming the possibility to control drug release by concentration and molecular weight of added PEG. It can be expected that the addition of amphiphilic PEG molecules would be beneficial even in the case of micro/nanofibrous carriers. The enhanced miscibility and compatibility of the electrospun mixture may result in homogeneous incorporation of the drug into fibrous structure. In perspectives of local cancer therapy, the use of PEG may bring these advantages: washing out of PEG molecules from drug-loaded carrier can ensure the fast release of the sufficient drug dosage to kill the residual cancer cells after tumor resection and the caused morphological changes (increased porosity and surface area of the fibrous carrier after PEG leaching) can further prolong the hydrophobic drug release in later time period and prevent cancer cell proliferation and migration.

In this work, we report the preparation of PTX-loaded PLA fibrous materials by needleless co-electrospinning of PLA/PEG mixed solution varying in molecular weights of PEG. The comprehensive characterization of the effect of PEG addition on PTX release rate, the *in vitro* activity and cell assay cytotoxicity are discussed in terms of long-term efficacy on a panel of human cancer cell lines.

2. Experimental Section

2.1. Materials

PLA ($M_w = 420\,000\text{ g mol}^{-1}$, polydispersity = 1.5) was purchased from Nature Works, LLC (Minnetonka, MN, USA). PEG with molecular weights (MWs) of 6 and 20 kDa was purchased from Rapp Polymere GmbH (Tuebingen, Germany) and 35 kDa from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). PTX was

purchased from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Chloroform, 1,2-dichloroethane, and ethyl acetate were purchased from PENTA (Prague, Czech Republic). Proteinase K obtained from *Tritirachium album* as a lyophilized powder, phosphate buffered saline (PBS) tablets, tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), sodium azide, and Tween 80 were supplied by Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Hydrochloric acid (HCl), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), and disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) of analytical grade were purchased from Lachema (Neratovice, Czech Republic). Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Cell culture media (RPMI, DMEM, and IMDM) and AlamarBlue Assay (Invitrogen) were purchased from ThermoFisher, (Prague, Czech Republic), 24-well plates from TPP (Trasadingen, Switzerland) and biopsy punch Stiefel from Servoprax (Wesel, Germany). Human plasma was kindly provided by the Military University Hospital Prague, Department of Hematology and Blood Transfusion.

2.2. Preparation and Characterization of Fibers

The PLA fibrous materials were prepared by needleless electrospinning using Nanospider technology^[38] in cooperation with Nanovia Ltd. (Litvinov, Czech Republic) (an illustrative photo of this technology is shown in Supporting Information Figure S1). The PLA (7% w/w) was dissolved in a mixture of chloroform/1,2-dichloroethane/ethyl acetate in a weight ratio of 54/29/10. PEG of particular MWs was added to the PLA solution at a concentration of 15 wt% (related to the PLA polymer). PTX was added to the polymer solution in a concentration of 1 or 10 wt% (related to the total polymer content). Both, PEG and PTX were soluble in the PLA solution and homogeneous mixtures were obtained before electrospinning. The electrospinning parameters were as follows: distance between electrode and collector 22 cm, voltage 20–60 kV, relative humidity 25–30%, and temperature 20 °C. The area weight of electrospun fibrous materials was $\approx 10\text{ g m}^{-2}$. The prepared materials were coded as follows: PLA-PTX(X)-PEG(Y), where X and Y in brackets indicate the PTX content in material and MW of PEG, respectively.

The morphology of the prepared PLA fibrous materials was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) using the microscope, TS 5130 VEGA3 (TESCAN, Brno, Czech Republic), at an accelerating voltage of 15 kV. Before observation, the samples were sputtered by 4 nm thin platinum layer.

The thermal properties of PLA fibrous materials were determined by differential scanning calorimetry (DSC) using a Perkin Elmer DSC 8500 instrument (TA instruments, USA) calibrated using an indium standard. The measurements were performed in heat-cool-heat mode. Samples were heated from -20 to 200 °C, cooled to -20 °C, and re-heated to 200 °C at a rate of 10 °C min^{-1} in nitrogen (flow rate 50 mL min^{-1}). Determination of PTX loaded to the fibrous materials was conducted by its extraction from fibers as follows: five round targets (diameter 12.5 mm) were cut from the PTX-loaded fibers, put in 10 mL of methanol and shaken in a tempered shaker (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Riga, Latvia) at 25 °C and 140 rpm for 24 h. Extracts from 10 wt% PTX-loaded

samples were diluted 50 times, whereas extracts from 1 wt% PTX-loaded samples were measured directly by the HPLC-UV method under the conditions described below. The experiments were performed in triplicate and calculated relative standard deviations were below 10%.

2.3. In Vitro Degradation Study

The degradation behavior was studied in four different buffers: Tris-HCl (0.05 M, pH 8.6), phosphate buffer (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.067 M, pH 8.6 and pH 8) and PBS (0.01 M, pH 7.4). The concentration of enzyme proteinase K in buffer was 2 μg mL⁻¹ or 0.2 mg mL⁻¹. Sodium azide was added to enzyme-containing buffers to inhibit the growth of microorganisms in a concentration of 0.2 mg mL⁻¹. PLA fibers were cut into 2 × 5 cm pieces of ≈10 mg weight. Cut samples were dried under vacuum at room temperature, weighed, placed in capped bottles containing 5 mL buffer solution, and then incubated in a rotary shaker (150 rpm) at 37 °C. Enzyme-containing buffers were renewed every 24 h to maintain the enzymatic activity. At a particular time period, three specimens were withdrawn, rinsed three times with distilled water and dried under vacuum at room temperature up to constant weight. The degradation of samples was denoted as weight loss (WL) calculated according to Equation (1)

$$WL (\%) = \frac{(w_0 - w_t)}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

where w_0 is the initial weight of the dried sample and w_t is the weight of the dried sample after a particular time of degradation. WL is expressed as average value ± standard deviation ($n = 3$).

2.4. In Vitro Drug Release Kinetics

The kinetics of the PTX release were assessed in a mode with continuous exchange of a part of the solution as follows: Five round targets (diameter 12.5 mm) were cut from the PTX-loaded fibers, put in 5 mL of PBS (pH 7.4) containing 0.5% of Tween and shaken in a tempered shaker (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Riga, Latvia) at 37 °C and 140 rpm. At the given time period, 1 mL of the solution was removed for the PTX concentration analysis and 1 mL of fresh PBS was added to the extraction bottles. The aliquots were collected at 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48 and 72 h after immersion. All release experiments were performed in triplicate. The quantification of released PTX was conducted by HPLC-UV method using an Agilent 1260 Infinity Series Quarternary LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The separation system consisted of an Ascentis Express C18 column (150 × 3.0 mm, particle size 5 μm) from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and the mobile phase water/acetonitrile (50/50 v/v) with a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The wavelength of UV detection was set at 227 nm and the injection volume was 5 μL (the details on optimization and validation of the method are presented elsewhere).^[39]

2.5. Stability/Activity of PTX

Stability of PTX in various media was studied at a concentration of 100 ng mL⁻¹ and 1 μg mL⁻¹. PTX was dissolved in PBS and PBS containing 0.1 or 0.5 wt% of Tween. Methanolic solution was used as medium inhibiting decomposition of PTX in the solution. All measurements were performed in triplicates and the relative standard deviation did not exceed 5%.

To determine the biological efficacy of PTX loaded in fibers, the long-term incubation in cell culture medium without cells for 3 and 4 weeks at 37 °C was performed. Afterward, fibers were transferred to overnight seeded cells and incubated for 72 h. Cell viability was determined by AlamarBlue Assay, according to the manufacturers' instructions. Untreated cells with AlamarBlue were used as a control sample and cultivation medium with AlamarBlue served as a blank sample. The formula for the calculation of cell viability was $cell\ viability (\%) = (RFU\ treated\ cell / RFU\ untreated\ control\ cells) \times 100$, where RFU is relative fluorescence unit.

2.6. In Vitro Cytotoxicity

PLA fibers with 1% and 10% PTX were tested on human neuroblastoma (SH-SY5Y, UKF-NB-3), human breast adenocarcinoma (MCF-7), and human prostate carcinoma (LNCaP) cell lines. Cells were cultured in adequate medium (RPMI, DMEM, and IMDM, respectively) supplemented with 10% bovine serum and 1% penicillin-streptomycin at 37 °C.

PLA-PEG samples were sterilized under UV light for 30 min, cut with a biopsy punch of 4 or 8 mm in diameter and added to the cells in 24-well plates for 72 h. Cell viability was determined by AlamarBlue Assay as described above. Each data point was derived from the results of at least two independent experiments, each experiment in triplicate.

For determination of PTX release kinetics and toxicity in vitro, cells were incubated in 24-well plates in 1 mL of media at 37 °C. In the first round, UV sterilized samples were cut with a biopsy punch of 4 mm in diameter and incubated with cells for 0.5, 2, 24, and 48 h at 37 °C. For the second round, samples were transferred to a new 24-well plate with overnight seeded cells and incubated for 72 h at 37 °C. Then, samples were transferred again and left with overnight seeded cells for another 72 h at 37 °C (third round). The scheme of the three-round incubation experiment is shown in **Figure 1**. Cell viability was determined by AlamarBlue Assay as described above. The whole procedure was repeated at least twice.

2.7. In Vitro Cytotoxicity after Incubation in Human Plasma

To determine the effect of plasma proteins on the PTX release kinetics and toxicity, samples were sterilized by UV light for 30 min and preincubated in human plasma for 0.5, 2, 24 or 48 h at 37 °C, washed in sterile PBS and transferred to MCF-7 cells on 24-well plates and left for 72 h. Cell viability was determined by the AlamarBlue Assay as mentioned above.

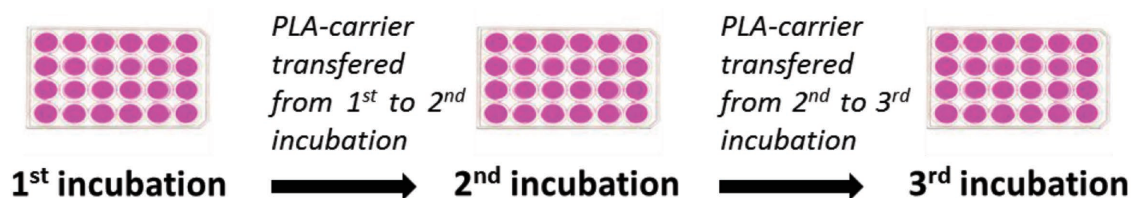


Figure 1. Scheme of the three-round incubation experiment. Incubation time in the first round with PLA carrier was 0.5, 2, 24 or 48 h and a total incubation of cells was 72 h. In the second and third rounds, the incubation time of cells with the carriers was 72 h.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in Graph Pad Prism 5 using the one or two way ANOVA test. A value of $P < 0.05$ was considered significant. All experiments were performed at least twice, each in triplicate.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Fibers

Needleless electrospinning is a versatile method for the formation of fibers from various natural and synthetic polymers with diameters ranging from tens of nanometers to tens of micrometers and thicknesses of the mats (expressed as area weight) ranging from 1 to 100 g m⁻².^[40] In this study, PLA fibers loaded by PTX and containing PEG as an additive component were prepared in area weights ≈ 10 g m⁻².

The morphology of prepared fibrous materials was examined by SEM and images are presented in **Figure 2**. Overall,

SEM images showed that suitable electrospinning conditions were found to provide materials with similar fibrous structure. PEG and PTX were well soluble in PLA solution providing a homogeneous mixture for electrospinning; thus, their addition had no distinct effect on morphological parameters such fiber diameters. Importantly, no drug crystals were detected on the fiber surface or outside the fibers, indicating that PTX was successfully incorporated into the fibers. It is in accordance with the published data that electrospinning of homogenous drug/polymer/solvent mixture results in incorporation of drug inside the fibers.^[41]

3.2. Degradation Study

In vitro degradation of pure PLA fibers was investigated in buffers of various pH and composition: Tris-HCl pH 8.6, phosphate buffer pH 8.6 and pH 8.0, and PBS pH 7.4. To observe enzymatic degradation, proteinase K was selected as an enzyme with good degradation activity to PLA. Various serine proteases, including Proteinase K and also some mammalian

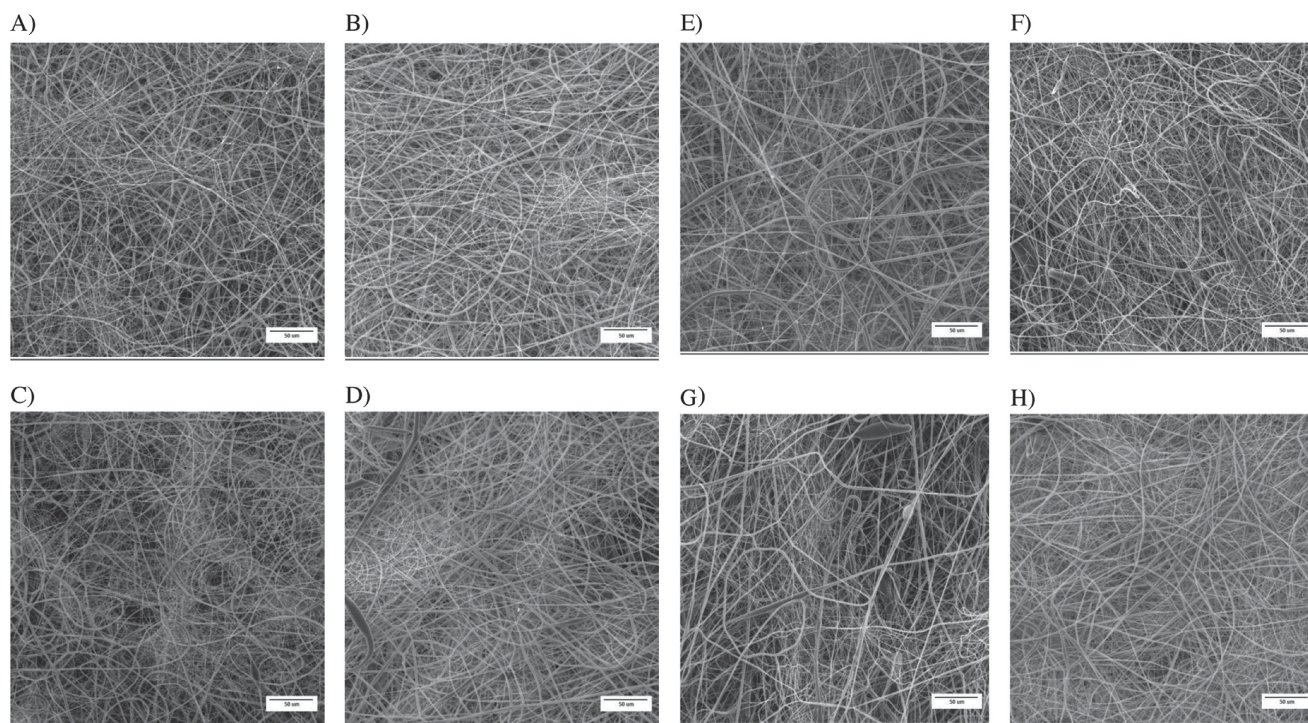


Figure 2. The SEM images of prepared PLA fibrous materials. A) Pure PLA; B) PLA-PEG(6); C) PLA-PEG(20); D) PLA-PEG(35); E) PLA-PTX(10); F) PLA-PTX(10)-PEG(6); G) PLA-PTX(10)-PEG(20); H) PLA-PTX(10)-PEG(35). Magnification of SEM images is 600 \times .

ones were tested and ability of all of them to degrade PLA was proved.^[42,43] Comparing the degradation activity of Proteinase K and enzyme lipase the studies showed that Proteinase K exhibited the stronger influence on the PLA degradation rate compared to lipase and that lipase had low effect on the degradation of L-PLA and that it is effective enzyme more for polycaprolactone than for PLA.^[44,45] Taking all this into account, we have chosen to test Proteinase K for our study. Moreover, it is preferentially used in other studies concerning the enzymatic degradation of PLA. Several papers showed that the degree of crystallinity and stereochemistry of D,L units had strong effects on the course of degradation; proteinase K selectively degrades L-lactyl units as opposed to D-lactyl and the amorphous region as opposed to crystalline.^[46–49] However, only Tris-HCl buffer of pH 8.6 was mainly used in these studies. Considering the lower pH under physiological conditions, we therefore decided to observe the influence of either pH value or composition of buffer, as well as different proteinase K concentrations. The enzyme is active in the pH range from 7.5 to 12; thus, in addition to Tris-HCl, we used phosphate buffers of pH 8.6, 8.0, and 7.4. Gravimetric evaluation of the loss as a function of degradation time is summarized in **Figure 3**. In the case of hydrolytic degradation (i.e., without the presence of enzyme, see Figure 3A) the PLA fibers were stable (with weight loss up to 3%) in PBS and in phosphate buffers of pH 8.6 over the 12 weeks. On the other hand, in Tris-HCl buffer pH 8.6 degradation up to $\approx 35\%$ over the 12 weeks was observed, indicating the considerable influence of buffer type. The results obtained from enzymatic degradation showed that PLA fibers underwent degradation in all tested buffers (see Figure 3B), where the degradation rate was influenced by pH and buffer composition. Very fast degradation occurred in the Tris-HCl buffer; complete fiber degradation was achieved by 30 h. Using phosphate buffer of the same pH, the degradation was markedly slowed down, which is consistent with the hydrolytic degradation results, suggesting that only the enzyme is involved in the degradation process. The decrease of pH of the phosphate buffer to 8.0 had no distinct effect, while the use of PBS of pH 7.4 led to further slowing degradation, which is probably related to the decrease in enzyme activity with decreased pH. However, the enzyme is active and fast degradation can be achieved when using 100 times higher enzyme concentration, as shown in Figure 3C.

The morphological changes after enzymatic degradation were monitored by SEM, proving the partial fragmentation of continuous fibers depending on the buffer, presence of enzyme and degradation time. **Figure 4A** represents the images of fibers degraded by 30% in various enzyme-containing buffers and **Figure 4B** presents images of PLA fibers after 12 h degradation reaching various weight losses in dependence on the buffer. In all images, several fiber ends can be observed compared to the images from Figure 2, showing the continuous fiber structure without any evidence of the ends. Although the gravimetric loss was 60%, it is clear from the images that the sample retained the fibrous structure, only a larger number of fibers were broken down (which can be attributed to the matrix breakdown).

It has been reported that 60% weight loss was accomplished for PLA film within 40–80 h in dependence on crystallinity degree when the concentration of the enzyme in Tris-HCl

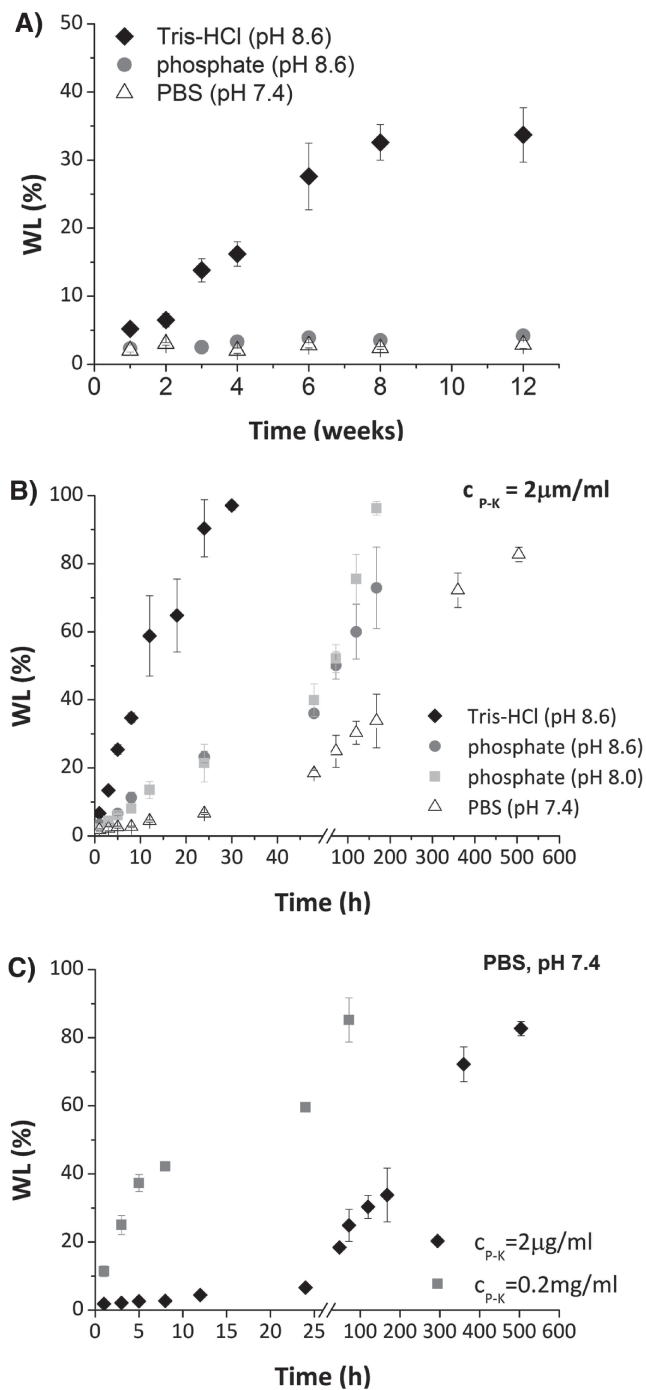


Figure 3. The weight loss (WL) of PLA fibers in various buffers as a function of degradation time: A) hydrolytic degradation in various buffers, B) enzymatic degradation in various buffers containing enzyme proteinase K (P-K), and C) enzymatic degradation in PBS (pH 7.4) of different enzyme concentrations. Weight loss was calculated according to Equation (1). Error bars were calculated using standard deviation ($n = 3$).

buffer was $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.^[46] Herein, in the case of the semi-crystalline PLA fibers, the same weight loss in Tris-HCl buffer was achieved within 12 h when the concentration of enzyme was $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Namely, the concentration of enzyme was 100 times lower and the degradation rate was 3–7 times faster

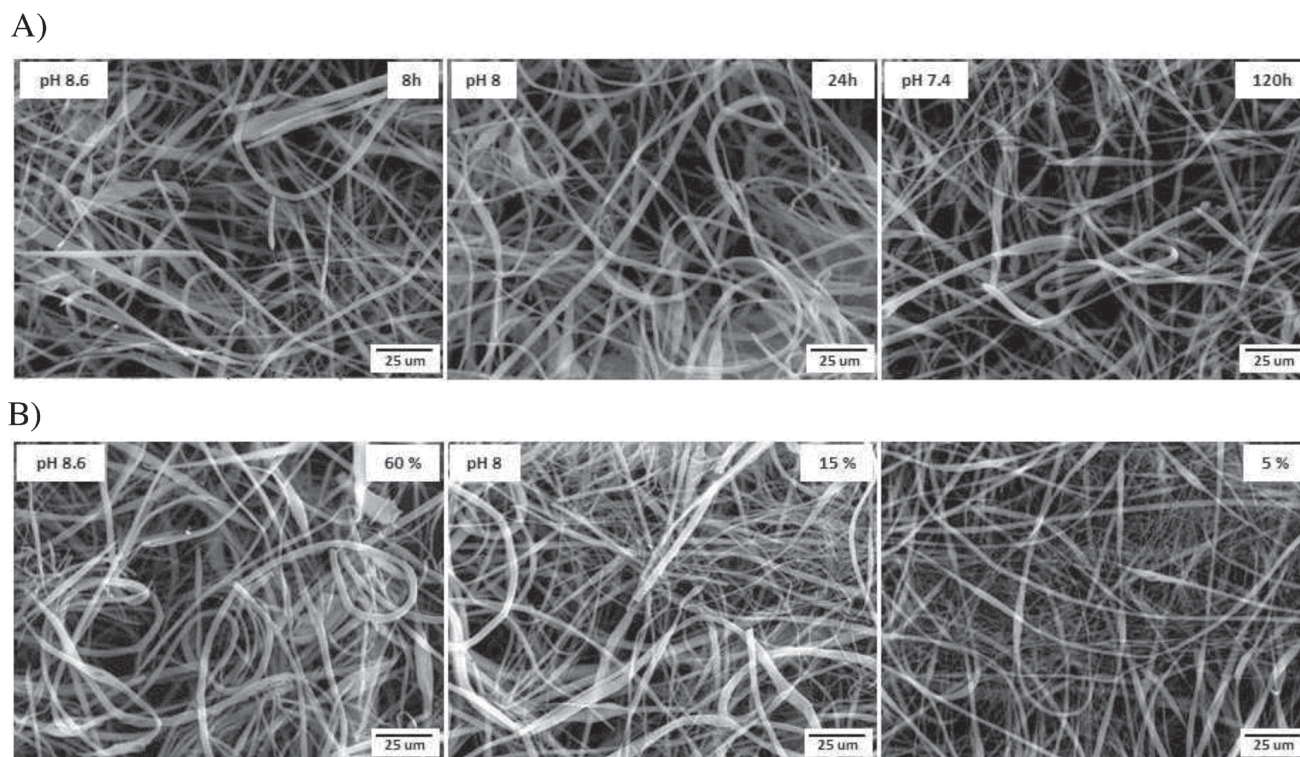


Figure 4. Morphological changes in fibrous materials during enzymatic degradation at 37 °C in various buffers (Tris-HCl, phosphate buffer of pH 8.0 and 7.4). A) Images of fibers degraded by 30%; the weight loss was reached after different time periods depending on the buffer used. B) Images of fibers after 12 h degradation; various weight loss was achieved in dependence on the buffer used.

than in the case of PLA films. This increase in the degradation rate is mainly attributed to the high surface-to-volume ratio of the PLA fibers, which increased significantly the interaction area between the fibers and enzyme. Therefore, the preparation of drug carriers in the form of fibers is one of the important methods to speed up the degradation process. The PLA fibers were tested by Zeng et al.,^[50] and the authors achieved weight loss of 60% within 5–7 h using the same buffer with an enzyme concentration of 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Their faster degradation can be caused by lower crystallinity, as proteinase K preferentially degrades the amorphous region, than the crystalline one.^[46] The PLA fibrous materials were studied by DSC measurements to examine the effect of immersion of the fibers in PBS medium and the effect of enzymatic degradation on the thermal properties and the level of crystallinity. As representatives, pure PLA, PLA fibers after immersion in PBS for 8 weeks and PLA fibers degraded by 30 wt% using PBS with Proteinase K in concentration 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ over the 5 d were measured. A summary of the thermal characteristics such as T_m , T_g , enthalpies, and crystallinity degree are shown in Supporting Information Table S1 and first heating DSC scans are shown in Supporting Information Figure S2. All samples exhibited some level of crystallinity by well-defined PLA endothermic peak at around 167 °C. It was found that 8 weeks immersion in PBS buffer had almost no effect on PLA crystallinity, while the fibers partially degraded by enzyme showed a certain decrease in the degree of crystallinity. Since the enzyme should predominantly degrade amorphous regions, more detailed studies would be

needed to explain this decrease in crystallinity which is however out of the scope of this work.

3.3. In Vitro PTX Release into PBS Analyzed by HPLC-UV Method

Pharmacokinetics of PTX shows wide variability with a terminal half-life in the range of 1.3–8.6 h.^[27] Considering the duration of release experiments into PBS over 72 h, we evaluated the stability of PTX in various aqueous media. Methanol served as a reference medium, inhibiting the decomposition of PTX. The results are shown in Figure 5. It was obvious that PTX underwent decomposition in PBS solution over time; almost 70% after 72 h. Further, we tested the PTX stability with the addition of Tween 80 to the PBS solution. Tween 80 has commonly been used to enhance PTX solubility in aqueous media; in 2% Tween 80 solution, PTX reaches the physiological concentration in serum.^[51] The results showed that the PTX stability increased with increasing amounts of Tween 80 for both tested PTX concentrations. A more pronounced effect was detected for the lower PTX concentration and 0.5% Tween solution when the PTX stability after 72 h was almost 90%. Therefore, it can be assumed that the PTX stability will be highly dependent on the environment; i.e., in vitro or in vivo conditions. Thus, the incorporation of PTX into the fibrous carriers providing a gradual PTX release to the surrounding environment can suppress its decomposition.

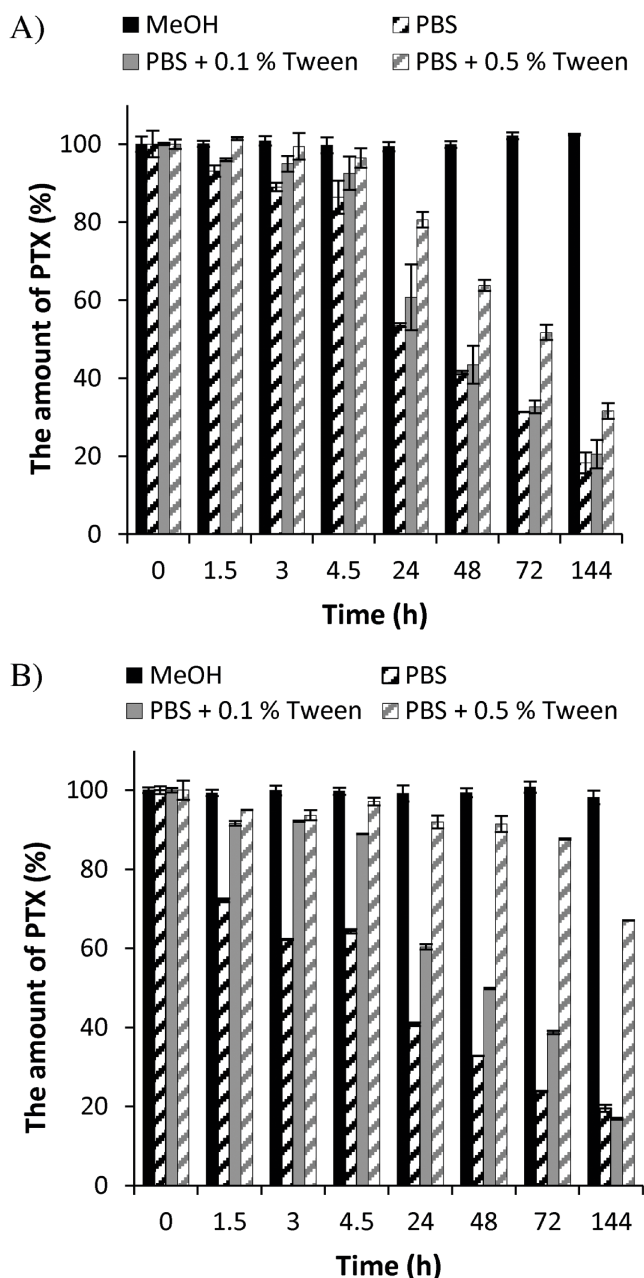


Figure 5. Stability of PTX dissolved in various media at a concentration of A) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and B) 100 ng mL^{-1} . The results are from three measurements expressed as average values. Error bars were calculated using the standard deviation ($n = 3$).

The PTX release experiments were studied with two series of fibrous materials loaded by 1 or 10 wt% of PTX. In each series, four materials were used: PTX-loaded PLA and PTX-loaded PLA containing PEG of MWs 6, 20, or 35 kDa. Blank PLA fibers were used as a reference for both series.

First, the real content of PTX loaded into the fibrous materials during the preparation was determined by quantification of PTX extracted from the fibrous samples into methanol. Methanol was used as a suitable solvent to fully extract PTX from the fibers. The results showed that

fibers contained $10 \pm 0.8 \text{ wt\%}$ or $1 \pm 0.25 \text{ wt\%}$ of PTX, i.e., 92–108% or 75–125% of the declared amount of PTX, for fibers with theoretical loaded amounts of 10 or 1 wt%, respectively. This confirmed relatively good agreement with the PTX content in the initial polymerization mixture. Higher deviations of determined amounts from the theoretical ones were found for the fibers loaded by 1 wt%, caused probably by higher deviation in measuring very low concentrated PTX solutions.

The PTX release from fibrous materials was evaluated using continuous exchange mode. The concentration of PTX in a particular time period was analyzed by the HPLC-UV method and subsequently, the release rates for each time period were calculated according to Equation (2)

$$v = \frac{m_n - m_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} \cdot \frac{1}{a} \quad (2)$$

where v is the release rate, m_n is the amount of PTX (ng) in an aliquot collected at t_n (h), m_{n-1} is the amount of PTX (ng) in an aliquot collected at t_{n-1} (h) reduced in regard to the exchanged part of the media and a is the square area of the fibrous targets (cm^2).

The calculated release rates of PTX are summarized in **Table 1**. The results indicated that fibers containing PEG released significantly higher amounts of PTX and prolonged the release time, compared to the fibers containing PTX only. This trend is in accordance with the results of our previous work, where we examined the release of cyclosporine A from PLA fibers containing PEG of various MWs.^[35]

The release kinetics could be illustrated in two stages: the initial burst release in the first several hours is followed by a constant slow release. The initial burst release can be explained by diffusion of the drug near the fiber surface and in the case of PEG-containing samples, mainly by the release of PEG molecules into an aqueous medium. Comparing the influence of MW of PEG on release kinetics, it is evident that PEG of 6 kDa MW ensured the highest burst release in the first hour while PEG of higher MWs (20 and 35 kDa) suggested a release of slightly higher amounts of PTX over a longer period of time. All these trends were more obvious in case of samples loaded by 10 wt% of PTX.

Although the release experiments were done under the conditions different from the real in vivo, obtained trends can be considered promising for designing local recurrence therapy as the prompt delivery of the sufficient initial dosage kills tumor cells and a consequent slow release can be essential to prevent further proliferation and migration.

3.4. In Vitro Cytotoxicity of Released PTX

For the last decades, considerable effort has been spent on optimization of PTX dosing in systemic administration.^[52–54] In vitro pharmacodynamic modeling was described and the obtained results successfully compared with available clinical data, in order to evaluate PTX antitumor effect in two dosing regimens: a) multiple application of maximum tolerated doses

Table 1. Comparison of the PTX release rates from PLA fibrous materials loaded by 1 or 10 wt% of PTX and containing 15 wt% PEG of various MWs.

Time period t [h]	Release rate ν [$\text{ng h}^{-1} \text{cm}^{-2}$] ^{a)}							
	PLA-PTX		PLA-PTX-PEG(6)		PLA-PTX-PEG(20)		PLA-PTX-PEG(35)	
	10% PTX	1% PTX	10% PTX	1% PTX	10% PTX	1% PTX	10% PTX	1% PTX
0–0.5	378	33	947	59	614	43	538	68
0.5–1	18	2	136	5	96	4	119	5
1–2	6	1	67	3	51	3	66	3
2–4	5	0	35	1	30	1	38	1
4–8	2	0	19	0	16	0	20	1
8–16	1	0	9	0	8	0	10	0
16–24	1	0	4	0	4	0	5	0
24–36	0	0	3	0	3	0	4	0
36–48	0	0	2	0	2	0	2	0
48–72	0	0	1	0	1	0	1	0

^{a)}Release rate calculated according to Equation (2).

and b) relatively low PTX doses applied in high frequency for longer time period. Apparently, accurate dosing of the drug in infusion can help to reach therapeutic effect, on the other hand reaching the active concentration in the target tissue is limited by the serious side effects connected with the systematic drug administration. Although the release of the active compound from the polymer carrier cannot be controlled as accurately as in the infusion, it is a great advantage that upon local administration it is possible to significantly increase drug doses in the target area and prolong its action time.

For the *in vitro* cytotoxicity experiments, four cell lines were selected according to their preliminary evaluation for PTX cytotoxicity. The sensitivity of cell lines for PTX was different and increased from MCF-7, LNCaP, SH-SY5Y to UKF-NB-3 cells. This fact enabled us to evaluate the influence of PTX-loaded PLA fibrous materials for cells from various tumor tissues, with various behaviors and different sensitivities to tested cytostatic.

First, we performed the experiments to prove the nontoxicity of the polymer matrix. The cell viability after PLA-PEG(6, 20, 35) fiber treatment for 72 h on all selected cell lines was determined. From **Figure 6**, it is apparent that PLA-PEG fibers did not show significant cytotoxicity to all tested cell lines, in comparison with the viability of the untreated cells. Only the viability of the UKF-NB-3 cell line was slightly decreased, but not significantly. This cell line is the most sensitive from all the tested lines.

In the next preliminary experiments, the cell lines were incubated with fibrous samples loaded with 1 and 10 wt% of PTX, i.e., with PLA-PTX(1) and PLA-PTX(10). For three cell lines (SH-SY5Y, MCF-7, and LNCaP) the fibers loaded by higher amounts of PTX were chosen for the further detailed toxicity studies. Lower PTX content was not able to significantly influence the viability of less sensitive cell lines (not shown), but the concentration was sufficient for the treatment of UKF-NB-3. This cell line is more sensitive and higher content of PTX caused enormous toxicity.

To determine whether PLA-PEG fibers can serve as a PTX depot, we designed a sequential cytotoxicity experiment, involving three rounds of sample incubation. In the first round,

various time of preincubation was applied to eliminate the effect of the drug burst release on final cell viability and the following rounds were performed to show the cytotoxic effect of PTX in terms of long efficacy where in each round the same samples were used and tested with fresh, untreated cells. For each cell line, four fibrous samples were studied and compared: PTX-loaded PLA and PTX-loaded PLA containing PEG of MWs 6, 20, or 35 kDa. The results obtained for SH-SY5Y and MCF-7 cells are shown in **Figure 7A,B** and for UKF-NB-3 in **Figure 8**. (Results for LNCaP are shown in Supporting Information Figure S3.)

We observed a similar trend in all tested cell lines. The PLA-PTX-PEG fibers were more cytotoxic in comparison to PLA-PTX. Toxicity decreased during the rounds of incubation for all tested cell lines except LNCaP, where this trend was less distinct. The significant differences between rounds of incubation are marked in figures by connected drawn lines. Nevertheless, even in the third round of incubation, cytotoxicity of PLA-PTX-PEG was significant, when compared with the viability of nontreated

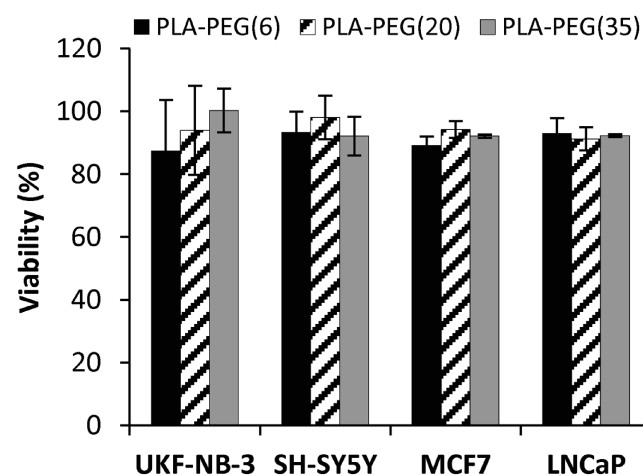


Figure 6. Cell viability of UKF-NB-3, SH-SY5Y, MCF-7, and LNCaP after PLA-PEG fiber treatment for 72 h.

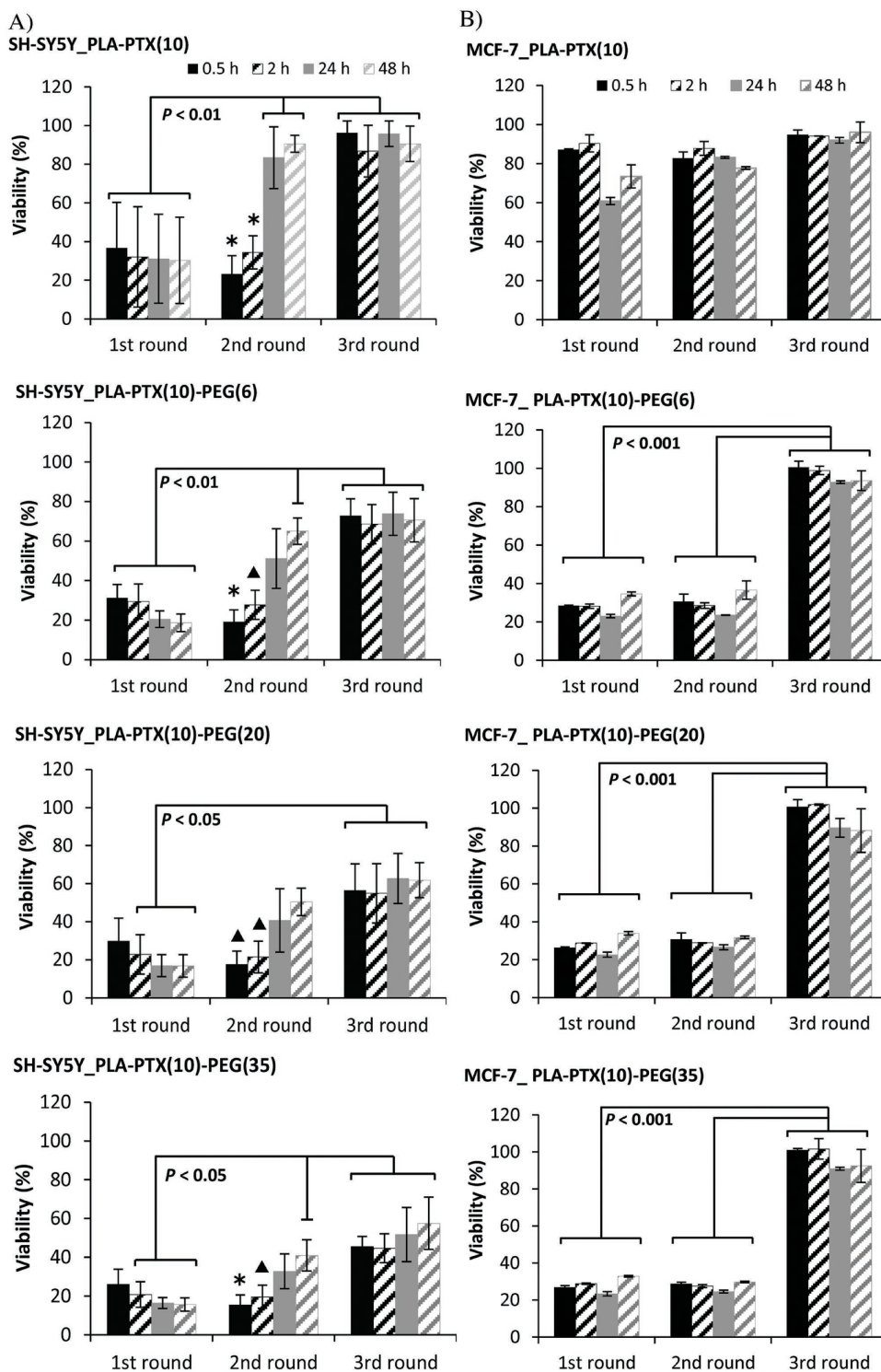


Figure 7. Cell viability of A) SH-SY5Y and B) MCF-7 after the PLA-PTX(10)-PEG fiber treatment during the three rounds of incubation. The values connected by drawn lines represent the significant difference between the incubation rounds (the given P value is shown in the graph). The values with * represent the significant difference compared to the third round of incubation and 24 and 48 h within the same incubation round and values with ▲ represent the significant difference compared to the third round of incubation and 48 h within the same incubation round ($P < 0.05$).

cells (except in the case of the most sensitive line MCF-7). For the SH-SY5Y cells, PLA-PTX(10)-PEG-35 showed the highest toxicity in all tested rounds, which was significantly higher

than PLA-PTX(10), but not significantly different from other PLA-PTX-PEGs. Interestingly, in the case of MCF-7 cells, the decrease of toxicity over the incubation rounds was not gradual;

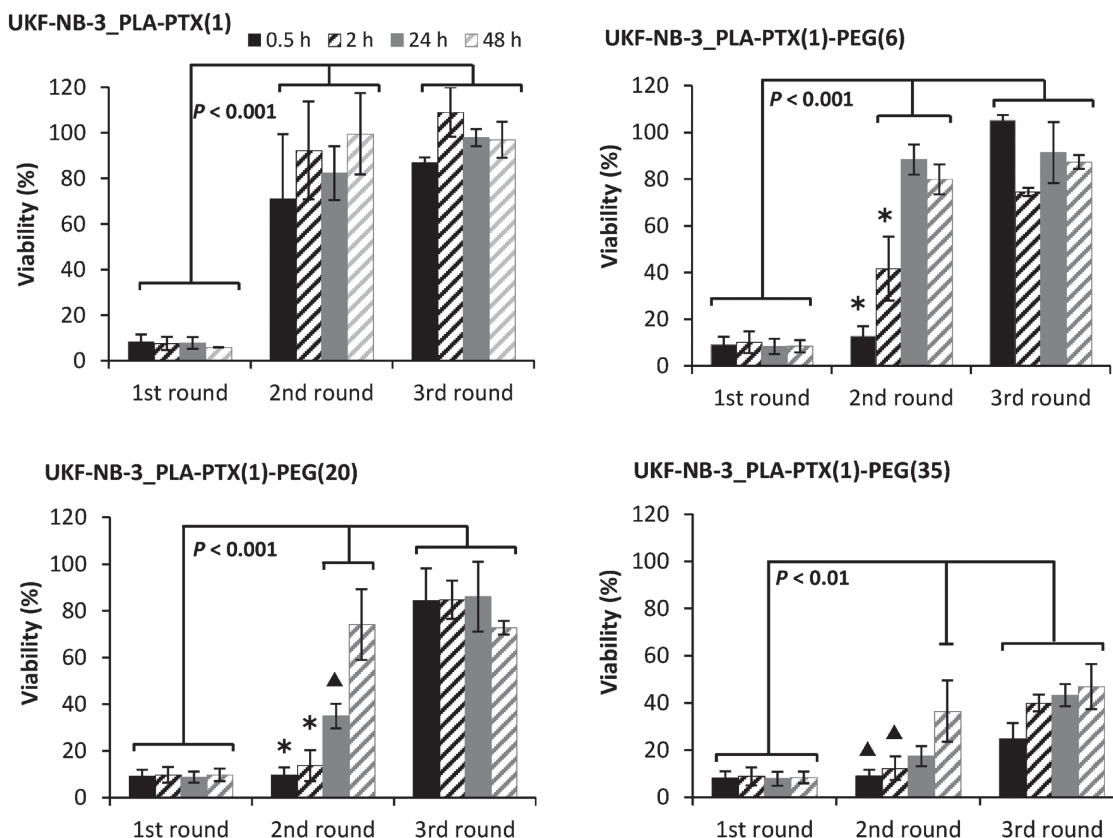


Figure 8. Cell viability of UKF-NB-3 after PLA-PTX(1)-PEG fiber treatment for three rounds of incubation. The values connected by drawn lines represent the significant difference between the incubation rounds (the given P value is inserted in the graph). The values with * represent the significant difference compared to the third round of incubation and 24 and 48 h within the same incubation round and values with ▲ represent the significant difference compared to the third round of incubation and 48 h within the same incubation round ($P < 0.05$).

the toxicity in the first and second round was not significantly different and then significantly decreased in the third round so that the samples showed almost no toxicity. Moreover, no significant difference in toxicity was observed between samples containing PEG of various MWs. Unfortunately, this result has shown that different release characteristics caused by different MWs of PEG detected by in vitro analytical analysis are not sufficient to affect the least sensitive cell line.

Overall, comparing the sample toxicity to the SH-SY5Y and MCF-7 cells (Figure 7A vs Figure 7B), in the case of SH-SY5Y did the various times of incubation a significant impact on toxicity, especially in the second round, while for MCF-7 cells this influence was not apparent. In case of SH-SY5Y cells in the second round, the samples preincubated 0.5 and 2 h showed significantly higher toxicity in comparison with samples preincubated 24 and 48 h. This significant differences are marked in figures by specific symbols (* or ▲). The third round of incubation was more efficient for SH-SY5Y than for MCF-7 cells, which can be attributed to the different sensitivity of these cells.

For LNCaP cells, the differences of sample toxicity between the PLA-PTX-PEGs used were not marked. The third round of incubation also showed significantly lower toxicity in comparison with the first and second round (see Supporting Information Figure S3).

In the case of the UKF-NB-3 cell line, all PTX-loaded fibers were highly toxic in the first round, regardless of incubation time. In the next incubation rounds, the following was observed: (i) the addition of PEG and increasing MW showed significant differences in fiber toxicity, while the highest toxicity, especially in the third round, exhibited fibers containing PEG(35) and (ii) the shorter preincubation time left the samples significantly higher toxicity in the second round in case of all fibers containing PEG and (iii) a correlation between the MW of PEG and the incubation time was observed, with increasing MW of PEG the fibers being more toxic with longer incubation times. This trend was most noticeable during the second round of incubation.

We can conclude that PLA-PTX-PEGs served as a depot for PTX, meaning that the PTX was released and retained its efficiency for several days. The addition of PEG and MW can significantly influence the activity of PTX released from fibrous carriers in a cell specific manner, whereas in the case of PEG(35), the highest amounts of PTX and the prolonged time period of PTX release was observed.

Taking into account the results from the cytotoxicity experiments discussed above, the long-term efficiency of PLA-PTX-PEG fibers was examined. Samples were incubated for 3 and 4 weeks in cell culture medium. We tested the cytotoxic effects of such preincubated samples on MCF-7 and UKF-NB-3.

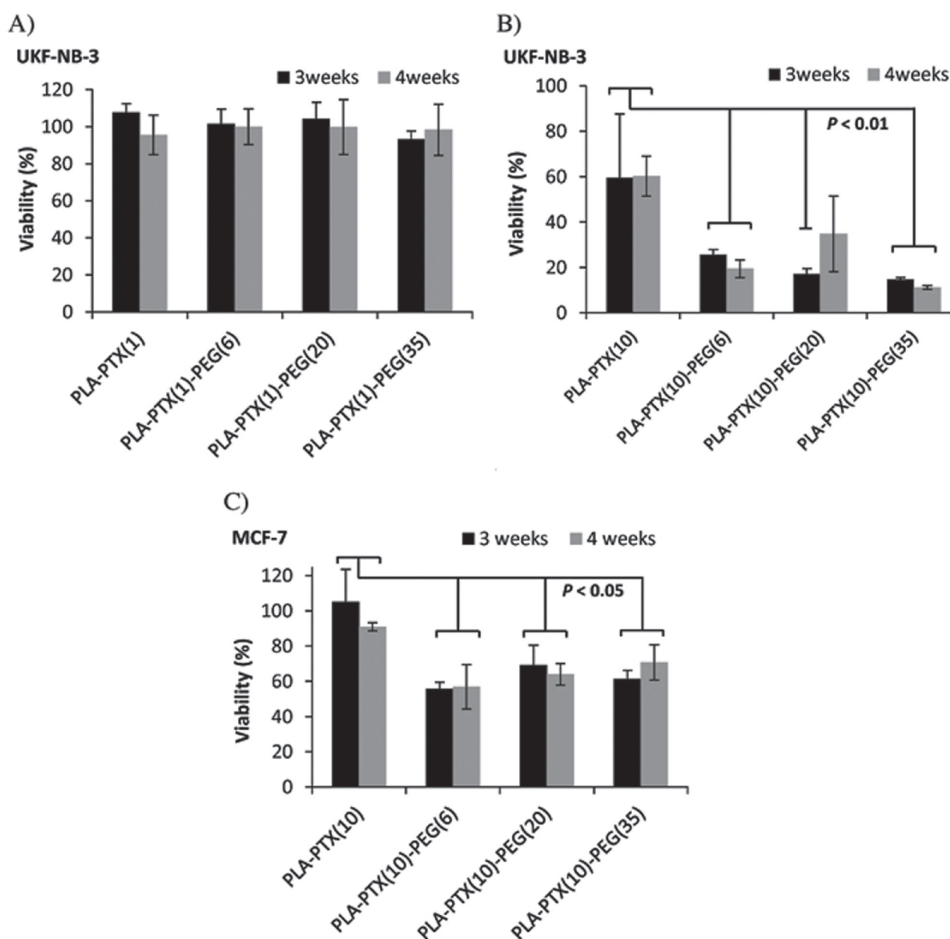


Figure 9. Cell viability of UKF-NB-3 after A) PLA-PTX(1)-PEG and B) PLA-PTX(10)-PEG (B), and of MCF-7 after C) PLA-PTX(10)-PEG fiber treatment. Samples were preincubated in cell culture medium without cells for 3 or 4 weeks. The values connected by drawn lines represent the significant difference between the PLA-PTX and PLA-PTX-PEG fibers (the given P value is inserted in the graph).

The results are shown in **Figure 9**. Tests on the most sensitive cell line, UKF-NB-3, were first performed with fibers loaded by 1 wt% of PTX, showing no significant influence on cell viability.

However, PLA-PTX(10)-PEG fibers showed toxic effects, even after several weeks of incubation were significantly higher compared to fibers without PEG (Figure 9B). Significant differences

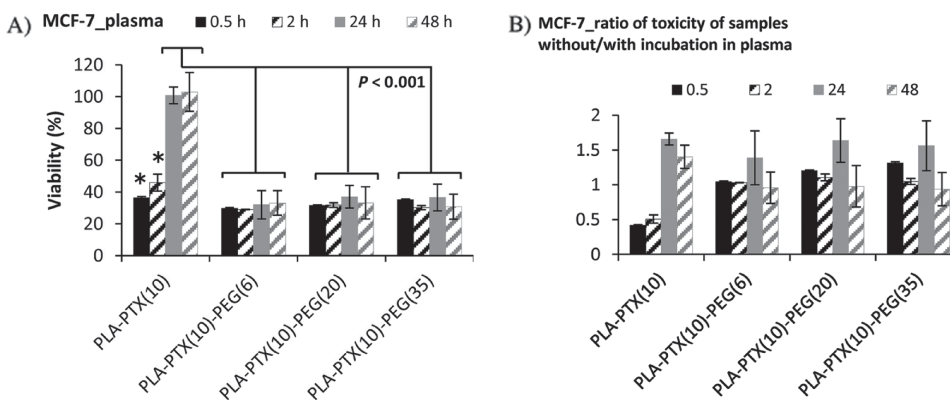


Figure 10. A) Cell viability of MCF-7 after the PLA-PTX(10)-PEGs fiber treatment; samples were preincubated for various times in human plasma, B) ratio of cell viability of MCF-7 of samples without/with incubation in human plasma. The values connected by drawn lines represent the significant difference between the PLA-PTX and PLA-PTX-PEG fibers (the given P value is inserted in the graph). The values with * represent the significant difference compared to 24 and 48 h within the same incubation round ($P < 0.05$).

between the PEG of MWs 6, 20, 35 kDa were not detected. The toxicity after several weeks of sample incubation was also monitored for MCF-7 (Figure 9C), again without apparent differences between various PEGs but with significant differences between PLA-PTX and PLA-PTX-PEGs. The drug, after long-term incubation lost part of its killing potential, as was also observed for UKF-NB-3 cells. However, fibers with added PEGs still maintained considerable toxicity, compared to fibers without PEG, especially in the case of the most sensitive tested cell line, UKF-NB-3.

PTX is known for the ability to bind to plasma proteins,^[27] which can significantly affect its stability and release concerning in vivo application of fibers as local delivery carriers. To evaluate the effect of PTX interaction with plasma proteins on the PTX release kinetics and toxicity, the fibers were first preincubated in human plasma for various times. The results of cell viability of these samples are shown in **Figure 10**. The samples preincubated in plasma showed significant toxicity to MCF-7 cells for all used PLA-PTX-PEGs (Figure 10A). In the case of PLA-PTX(10), the longer incubation in plasma (24 and 48 h) led to almost loss of toxicity of samples. To compare the influence of plasma treatment, we plotted the ratio of plasma untreated versus plasma treated values in Figure 10B. The toxicity of samples for each time without plasma preincubation was set as 1. The more efficient toxicity after plasma treatment led to a decrease of the ratio of toxicity of plasma nontreated versus plasma treated cells, while the less efficient toxicity after incubation in plasma increased this ratio.

The plasma treatment did not affect the toxicity of PLA-PTX-PEGs significantly, except for the incubation of PLA-PTX(10)-PEG(20 and 35) for 24 h, and of PLA-PTX(10)-PEG(35) for 0.5 h. Similar effects were shown in PLA-PTX(10) for 24 and 48 h incubation. An interesting increase in toxicity was observed for PLA-PTX(10) for 0.5 and 2 h of incubation, which can be documented as the auxiliary effect of plasma proteins in PTX distribution or release, but only for a limited time. This trend was not observed for PLA-PTX-PEGs, which can be described that PEG itself can play a role in the release and therapeutic efficacy of PTX.

4. Conclusions

In this work we proved the possibility to prepare PTX-loaded PLA-PEG fibrous carriers using needleless electrospinning. Analytical determination of the released drug and in vitro experiments on four various cancer cell lines confirmed that PTX remained its antitumor activity for the period of several days. Thus, the incorporation of PTX into a fibrous carrier with prolonged release can overcome the low PTX stability in the solution. The fibers with added PEG released significantly higher amounts of hydrophobic PTX in a prolonged release time compared to the fibers without PEG, even after several weeks of sample preincubation, it was possible to detect significant toxicity for particular cancer cells. Although the differences between PEG of various MWs in the long-term efficacy experiment were not statistically significant, the addition of various PEGs can considerably influence the efficacy of PTX released from the fibrous carriers in a cell-specific manner in several-day experiment. It can be concluded that

our prepared PLA-PTX-PEG fibers can serve as a depot for PTX and be considered promising for local recurrence therapy.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

J.P. and K.V. have contributed equally to this work. This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (project 16-04863S), by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the National Sustainability Program II (project BIOCEV-FAR LQ1604, "BIOCEV" CZ.1.05/1.1.00/02.0109), by the Ministry of Health of the Czech Republic for the conceptual development of research organization, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic (project 00064203), and by the Charles University, Prague, Czech Republic (projects GA UK 307115 and SVV 260440). The authors thank Nanovia Ltd. (M. Munzarova) for cooperation in fiber preparation by needleless electrospinning.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

cytotoxicity, drug release, local chemotherapy, paclitaxel, PLA/PEG fibers

Received: January 9, 2018

Revised: March 1, 2018

Published online: April 24, 2018

- [1] C. Monterrubio, G. Pascual-Pasto, F. Cano, M. Vila-Ubach, A. Manzanares, P. Schaiquevich, J. A. Tornero, A. Sosnik, J. Mora, A. M. Carcaboso, *Biomaterials* **2016**, 79, 69.
- [2] K. Krukiewicz, J. K. Zak, *Mater. Sci. Eng., C* **2016**, 62, 927.
- [3] D. Kai, S. S. Liow, X. J. Loh, *Mater. Sci. Eng., C* **2014**, 45, 659.
- [4] J. Pelipenko, P. Kocbek, J. Kristl, *Int. J. Pharm.* **2015**, 484, 57.
- [5] M. Zamani, M. P. Prabhakaran, S. Ramakrishna, *Int. J. Nanomed.* **2013**, 8, 2997.
- [6] S. F. Chou, D. Carson, K. A. Woodrow, *J. Controlled Release* **2015**, 220, 584.
- [7] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing, *J. Controlled Release* **2014**, 185, 12.
- [8] X. Xu, X. Chen, P. Ma, X. Wang, X. Jing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 70, 165.
- [9] X. Xu, L. Yang, X. Xu, X. Wang, X. Chen, Q. Liang, J. Zeng, X. Jing, *J. Controlled Release* **2005**, 108, 33.
- [10] G. Ma, Y. Liu, C. Peng, D. Fang, B. He, J. Nie, *Carbohydr. Polym.* **2011**, 86, 505.
- [11] S. H. Ranganath, C. H. Wang, *Biomaterials* **2008**, 29, 2996.
- [12] J. Xie, C. H. Wang, *Pharm. Res.* **2006**, 23, 1817.
- [13] Y.-Y. Tseng, Y.-C. Wang, C.-H. Su, T.-C. Yang, T.-M. Chang, Y.-C. Kau, S.-J. Liu, *Colloids Surf., B* **2015**, 134, 254.
- [14] J. A. Kaplan, R. Liu, J. D. Freedman, R. Padera, J. Schwartz, Y. L. Colson, M. W. Grinstaff, *Biomaterials* **2016**, 76, 273.

- [15] P. Chen, Q.-S. Wu, Y.-P. Ding, Z.-I. Zhu, *Nano* **2011**, *6*, 325.
- [16] Y. Ma, X. Wang, S. Zong, Z. Zhang, Z. Xie, Y. Huang, Y. Yue, S. Liu, X. Jing, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 106325.
- [17] X. Luo, H. Zhang, M. Chen, J. Wei, Y. Zhang, X. Li, *Int. J. Pharm.* **2014**, *475*, 438.
- [18] T. Amna, N. A. M. Barakat, M. S. Hassan, M.-S. Khil, H. Y. Kim, *Colloids Surf, A* **2013**, *431*, 1.
- [19] H. Wang, J. Wei, C. Yang, H. Zhao, D. Li, Z. Yin, Z. Yang, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5848.
- [20] J. Zhang, X. Wang, T. Liu, S. Liu, X. Jing, *Drug Delivery* **2016**, *23*, 784.
- [21] Q. Ding, Z. Li, Y. Yang, G. Guo, F. Luo, Z. Chen, Y. Yang, Z. Qian, S. Shi, *Drug Delivery* **2016**, *23*, 2677.
- [22] S. Iqbal, M. H. Rashid, A. S. Arbab, M. Khan, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2017**, *13*, 355.
- [23] T. Lu, X. Jing, X. Song, X. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *123*, 209.
- [24] X. Xu, X. Chen, Z. Wang, X. Jing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *72*, 18.
- [25] Y. Zhang, S. Liu, X. Wang, Z. Y. Zhang, X. Bin Jing, P. Zhang, Z. G. Xie, *Chin. J. Polym. Sci.* **2014**, *32*, 1111.
- [26] S. Zong, X. Wang, Y. Yang, W. Wu, H. Li, Y. Ma, W. Lin, T. Sun, Y. Huang, Z. Xie, Y. Yue, S. Liu, X. Jing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 127.
- [27] A. K. Singla, A. Garg, D. Aggarwal, *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 179.
- [28] G. Bocci, A. Di Paolo, R. Danesi, *Angiogenesis* **2013**, *16*, 481.
- [29] J. Wei, J. Hu, M. Li, Y. Chen, Y. Chen, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 28011.
- [30] K. Qiu, C. He, W. Feng, W. Wang, X. Zhou, Z. Yin, L. Chen, H. Wang, X. Mo, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4601.
- [31] Z. Zhang, S. Liu, H. Xiong, X. Jing, Z. Xie, X. Chen, Y. Huang, *Acta Biomater.* **2015**, *26*, 115.
- [32] F. Zheng, S. Wang, M. Shen, M. Zhu, X. Shi, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 933.
- [33] S.-S. Feng, L. Mu, K. Win, G. Huang, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 413.
- [34] J. Hrib, J. Širc, R. Hobzová, Z. Hampejsová, Z. Bosáková, M. Munzarová, J. Michálek, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 1939.
- [35] J. Širc, Z. Hampejsová, J. Trnovská, P. Kozlík, J. Hrib, R. Hobzová, A. Zajícová, V. Holá, Z. Bosáková, *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 1391.
- [36] T. W. J. Steele, C. L. Huang, E. Widjaja, F. Y. C. Boey, J. S. C. Loo, S. S. Venkatraman, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1973.
- [37] C. L. Huang, T. W. Steele, E. Widjaja, F. Y. Boey, S. S. Venkatraman, J. S. Loo, *NPG Asia Mater.* **2013**, *5*, e54.
- [38] O. Jirsák, F. Sanetrník, D. Lukáš, V. Kotek, L. Martinová, J. Chaloupek, *WO2005024101*, **2005**.
- [39] R. Hobzova, Z. Hampejsova, J. Plich, J. Hrabeta, K. Venclikova, J. Jedelska, U. Bakowsky, Z. Bosakova, M. Lhotka, M. Steinhart, J. Kovarova, J. Michalek, J. Sirc, **2018**.
- [40] J. Sirc, R. Hobzova, N. Kostina, J. Širc, R. Hobzová, N. Kostina, M. Munzarová, M. Juklíková, M. Lhotka, Š. Kubinová, A. Zajícová, J. Michálek, *J. Nanomater.* **2012**, *2012*.
- [41] J. Zeng, L. Yang, Q. Liang, X. Zhang, H. Guan, X. Xu, X. Chen, X. Jing, *J. Controlled Release* **2005**, *105*, 43.
- [42] Y. Tokiwa, B. P. Calabria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 244.
- [43] H.-A. Lim, T. Raku, Z. Tokiwa, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 459.
- [44] L. Liu, H. Garreau, M. Vert, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 350.
- [45] M. Stepczykńska, P. Rztlewski, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2018**, *126*, 160.
- [46] S. Li, S. McCarthy, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4454.
- [47] S. Li, M. Tenon, H. Garreau, C. Braud, M. Vert, *Polym. Degrad. Stab.* **2000**, *67*, 85.
- [48] F. Luzi, E. Fortunati, D. Puglia, R. Petrucci, J. M. Kenny, L. Torre, *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *121*, 105.
- [49] M. S. Reeve, S. P. McCarthy, M. J. Downey, R. A. Gross, *Macromolecules* **1994**, *27*, 825.
- [50] J. Zeng, X. Chen, Q. Liang, X. Xu, X. Jing, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 1118.
- [51] M. A. Lovich, C. Creel, K. Hong, C. W. Hwang, E. R. Edelman, *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1324.
- [52] T. Ohtsu, Y. Sasaki, T. Tamura, Y. Miyata, H. Nakanomyo, Y. Nishiwaki, N. Saijo, *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 599.
- [53] S. Mielke, A. Sparreboom, D. Behringer, K. Mross, *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 4423.
- [54] H. He, Y. Cao, J. Pharmacokinet. *Pharmacodyn.* **2017**, *44*, 491.