

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jan Batěk

STUDIUM KINETIKY UVOLŇOVÁNÍ HYDROFOBNIHO
LÉČIVA PAKLITAXELU DO HYDROGELŮ

Study of release kinetics of hydrophobic drug paclitaxel into
hydrogels

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Konzultant: RNDr. Jakub Širc, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. srpna 2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za cenné rady a trpělivost při vedení a zpracování mé diplomové práce a za všechny rady, které mi poskytla v rámci mého studia. Rovněž bych chtěl poděkovat svému konzultantovi RNDr. Jakobovi Šircovi, Ph.D. a Ing. Radce Hobzové Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR za jejich nezanedbatelnou pomoc při plnění této diplomové práce.

Nakonec bych chtěl poděkovat svým rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole.

Klíčová slova

Paklitaxel

Hydrogely

Polyethylenglykol

Cyklodextrin

Polylaktid

Nanovlákná

HPLC-UV

HEMA

Doprava léčiv

Key words

Paclitaxel

Hydrogels

Polyethylene glycol

Cyclodextrin

Poly(L-lactic acid)

Nanofibers

HPLC-UV

HEMA

Drug delievery

Abstrakt

V této diplomové práci byly studovány hydrogely na bázi 2-hydroxymethakrylátu (HEMA). Bylo sledováno jejich možné využití pro studium kinetiky uvolňování hydrofobního protinádorového léčiva paklitaxelu (PTX), s cílem přiblížit se podmínkám simulujících *in vivo* prostředí. Paklitaxel je léčivo se silnými vedlejšími účinky, kterým lze částečně zamezit vhodnou lokální aplikací, proto v této práci byla studována polylatidová (PLA) nanovlákna s inkorporovaným léčivem. Dále byl sledován vliv přídavku polyethylenglykolu (PEG) o molekulové hmotnosti 20 kDa a CD do struktury PLA nanovláken na profily uvolňování PTX do různých prostředí simulující *in vivo* prostředí. Pro sledování kinetiky uvolňování PTX byla použita analytická HPLC metoda s UV detekcí. Přídavkem PEG do PLA nanovláken bylo docíleno výrazně vyššího množství uvolněného hydrofobního léčiva, které se zároveň uvolňovalo delší dobu, ve srovnání s vlákny obsahující pouze PTX. Tento trend byl zřejmý jak u experimentů sledující uvolňování PTX do PBS, tak i do hydrogelových matic. Vliv přídavku CD na uvolňování PTX byl zřejmý pouze u sledování kinetiky uvolňování PTX do hydrogelových matic, kde došlo k většímu uvolnění PTX z těchto vláken. Při uvolňování léčiva do hydrogelů v porovnání s uvolňováním do PBS byl pozorován nárůst celkového uvolněného množství PTX. Dále bylo studováno použití hydrogelu jako nosiče léčiv pro případné lokální aplikace. Byla sledována sorpce PTX z roztoku PBS s 0,5% přídavkem detergentu Tween 80 do čtyř druhů hydrogelů.

Abstract

In this diploma thesis, hydrogels based on 2-hydroxymethacrylate (HEMA) were studied. Their possible use to study the release kinetics of the hydrophobic anticancer drug paclitaxel (PTX) was investigated in order to approach the conditions simulating *in vivo* environments. Paclitaxel is a drug with strong side effects, which can be partially prevented by appropriate local application. In this work, polylatide (PLA) nanofibers with incorporated drug was studied. Furthermore, the effect of the addition of polyethylene glycol (PEG) with a molecular weight of 20 kDa and CD to the structure of PLA nanofibers on the profiles of PTX release into various environments simulating *in vivo* environments was studied. An analytical HPLC method with UV detection was used to monitor the release kinetics of PTX. The addition of PEG to PLA nanofibers resulted in a significantly higher amount of hydrophobic drug released, which was also released over a longer period of time, compared to fibers containing only PTX. This trend was evident in both experiments monitoring the release of PTX into PBS and into hydrogel matrices. The effect of CD addition on PTX release was evident only in monitoring the kinetics of PTX release into hydrogel matrices, where there was a greater release of PTX from these fibers. An increase in the total amount of PTX released was observed when the drug was released into the hydrogels compared to the release into PBS. Furthermore, the use of hydrogel as a drug carrier for possible topical applications was studied. The sorption of PTX from a PBS solution with 0.5% addition of Tween 80 detergent to four types of hydrogels was monitored.

Obsah

Abstrakt	- 5 -
Abstract.....	- 6 -
Obsah.....	- 7 -
Seznam zkratek a symbolů	- 9 -
1 Cíl práce.....	- 10 -
2 Teoretická část	- 11 -
2.1 Hydrogely.....	- 11 -
2.1.1 Struktura hydrogelů	- 11 -
2.1.2 Klasifikace hydrogelů.....	- 13 -
2.1.3 Použití hydrogelů.....	- 14 -
2.1.3.1 Kryty ran	- 14 -
2.1.3.2 Kosmetika.....	- 15 -
2.1.3.3 Kontaktní čočky	- 16 -
2.1.3.4 Hydrogely pro dopravu léčiv	- 16 -
2.1.3.5 Tkáňové inženýrství	- 17 -
2.2 Využití hydrogelu pro simulaci tuhých nádorů.....	- 18 -
2.3 Lokální aplikace léčiv pomocí PLA nanovláken	- 20 -
2.4 Paklitaxel.....	- 27 -
2.4.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti paklitaxelu.....	- 27 -
2.4.2 Terapeutické využití paklitaxelu	- 28 -
2.4.3 Metody stanovení paklitaxelu.....	- 28 -
2.5 Elektrospinning	- 29 -
2.5.1 Nanospider TM	- 30 -
3 Experimentální část.....	- 31 -

3.1	Materiály	- 31 -
3.1.1	Chemikálie.....	- 31 -
3.1.2	PLA nanovlákná	- 31 -
3.2	HPLC metoda pro stanovení PTX.....	- 32 -
3.3	Stanovení celkového množství PTX v PLA vláknech	- 33 -
3.4	Extrakce PTX z nanovláken do PBS v režimu postupné výměny pufru.....	- 34 -
3.5	Příprava a stanovení stupně zbobtnání hydrogelů v rovnovážném stavu.....	- 35 -
3.5.1	Příprava HEMA hydrogelů.....	- 35 -
3.5.2	Příprava HEMA-MA kopolymerního hydrogelu	- 36 -
3.5.3	Stanovení stupně zbobtnání hydrogelů.....	- 37 -
3.6	Měření uvolňování PTX do hydrogelů	- 37 -
3.7	Sorpce PTX do hydrogelů	- 39 -
4	Výsledky	- 40 -
4.1	Kvantitativní hodnocení HPLC-UV analýz PTX.....	- 40 -
4.1.1	Kalibrační křivka v methanolu	- 40 -
4.1.2	Kalibrační křivka ve fosfátovém pufru.....	- 41 -
4.2	Stanovení celkového množství PTX v PLA vláknech	- 43 -
4.3	Extrakce PTX z nanovláken do PBS v režimu postupné výměny pufru.....	- 44 -
4.4	Měření uvolňování PTX do hydrogelů	- 47 -
4.4.1	HEMA	- 48 -
4.4.2	HEMA-MA.....	- 49 -
4.5	Sorpce PTX do hydrogelů.....	- 51 -
5	Závěr	- 56 -
6	Literatura.....	- 57 -

Seznam zkratek a symbolů

\tilde{A}	Medián plochy píku
API	Aktivní farmaceutická substance (z angl. Active Pharmaceutical Ingredient)
c	Hmotnostní koncentrace
CD	β -Cyklodextrin
DOX	Doxorubicin
EDMA	Ethylenglykoldimethakrylát
HEMA	2-hydroxyethylmethakrylát
hmot. %	Hmotnostní procento
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IPN	Interpenetrované polymerní síť
$L_{1,2}$	Interval spolehlivosti
MA	Kyselina metakrylová
PBS	Fosfátový pufr
PDLLA	Poly (DL-laktid)
PEI	Polyethylenimin
PGA	Kyselina polyglutamová
PHEMA	Poly(2-hydroxyethylmethakrylát)
PLA	Polylaktid
PLGA	Poly(laktid-co-glykolid)
PLLA	Poly-L-laktid
PMMA	Polymethylmethakrylát
PTX	Paklitaxel
RES	Retikuloendoteliální systémem
RSD	Relativní směrodatná odchylka
s_r	Směrodatná odchylka

1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo studium použití hydrogelů na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) pro sledování uvolňování hydrofobního léčiva paklitaxelu (PTX), který byl inkorporován v nanovlákněném materiálu založeném na polylaktidu (PLA).

Hlavní cíle diplomové práce jsou:

1. Studium kinetiky uvolňování PTX do hydrogelů simulujících reálnou tkáň a sledování vlivu přídavku polyethylenglykolu (PEG) a β -cyklodextrinu (CD) do PLA vláken na profil uvolňování léčiva.
2. Sledování sorpce PTX z roztoku do hydrogelů, pro případné použití hydrogelů jako nosiče léčiv pro lokální aplikace, a následné sledování zpětného uvolňování PTX do methanolu.
3. Studium vlivu přídavku CD a PEG v nanovlákněném materiálu na profil uvolňování PTX do fosfátového pufru (PBS)

2 Teoretická část

2.1 Hydrogely

Hydrogely jsou polymerní materiály. Typická pro tyto materiály je schopnost vysoké absorpce tekutin, při které ovšem nedochází k narušení prostorové struktury polymeru. V úvodu je potřeba zmínit, že hydrogely mohou být jak přírodního, tak syntetického původu.

Habib et al. (2015) uvádějí, že hydrogely jsou hydrofilní polymery s trojrozměrnou strukturou sítě s vysokým obsahem hydrofilních skupin. Právě tyto skupiny jsou odpovědné za schopnost hydrogelu přijímat značné množství vody. Právě tato vlastnost předurčila hydrogel k širokému lékařskému uplatnění. [1]

Termín hydrogel byl poprvé použit Van Bemmelenem v roce 1884 [2]. K prvnímu většímu využití, respektive ke slibnému využití, došlo až v roce 1960, kdy Oto Wichterle a Drahoslav Lín začaly zkoumat využití hydrogelů v lékařství, zejména v očním lékařství [2] a jejich pokusy byly úspěšné. Od té doby se hydrogely rozšířily do téměř všech lidských činností. V samotném lékařství jejich využití roste každým rokem. Stručný přehled používání hydrogelů v medicíně je uveden níže spolu s přehledem základních vlastností hydrogelů.

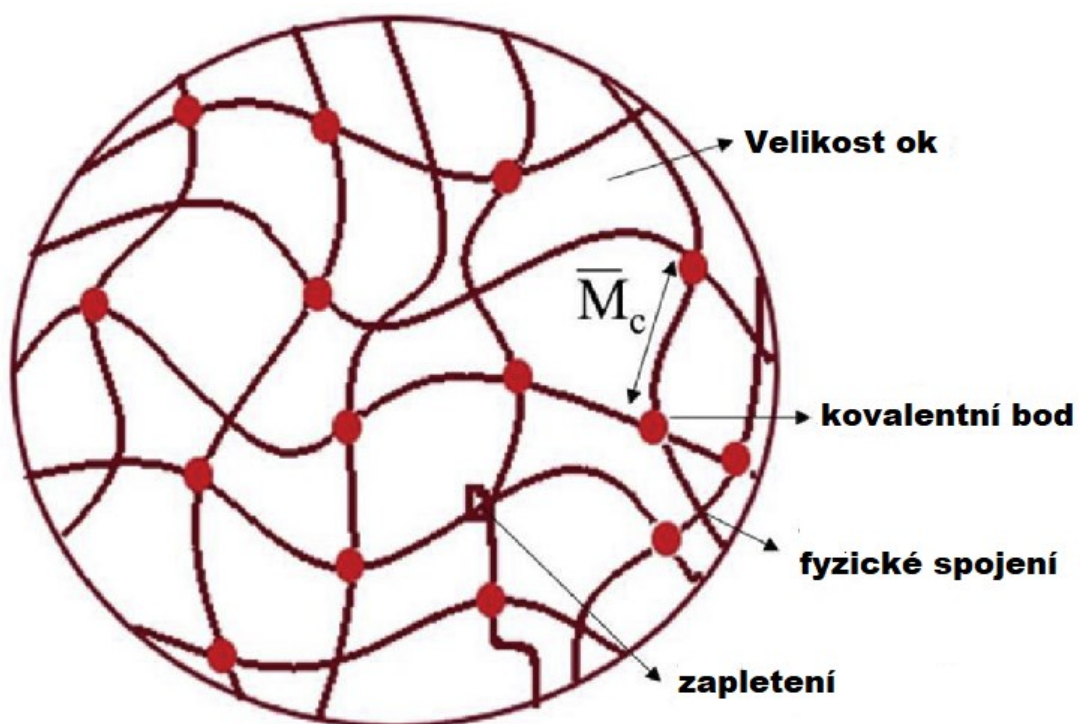
2.1.1 Struktura hydrogelů

Hydrogely v pevné formě mají síťovou strukturu z polymerních řetězců [3]. S výše uvedeným souvisí i molekulová váha hydrogelů, která je velmi vysoká a může se blížit nekonečnu [4]. Další důležitou vlastností, která ovlivňuje strukturu hydrogelu, či spíše definuje strukturu hydrogelu, je stupeň síťování, resp. délka jednotlivých polymerních řetězců mezi uzlovými body. Síťování může být docíleno pomocí chemických (kovalentních) a fyzikálních (vodíkové vazby) faktorů [5]. Skutečnost, že hydrogel je schopný pojmout velké množství vody, je spojena s difuzí vody do hydrogelu a vázání této vody na hydrofilní skupiny [5].

Gibas a Janik (2010) uvádějí, že toto botnění hydrogelu probíhá ve třech fázích [6]:

1. primární vázaná voda – molekuly vody jsou vázány na hydrofilní skupiny,
2. sekundární vázaná voda – dochází k interakci molekul vody se stávajícími hydrofobními skupinami,
3. volná voda – vytvořena rovnováha, voda vyplní veškerá možná místa.

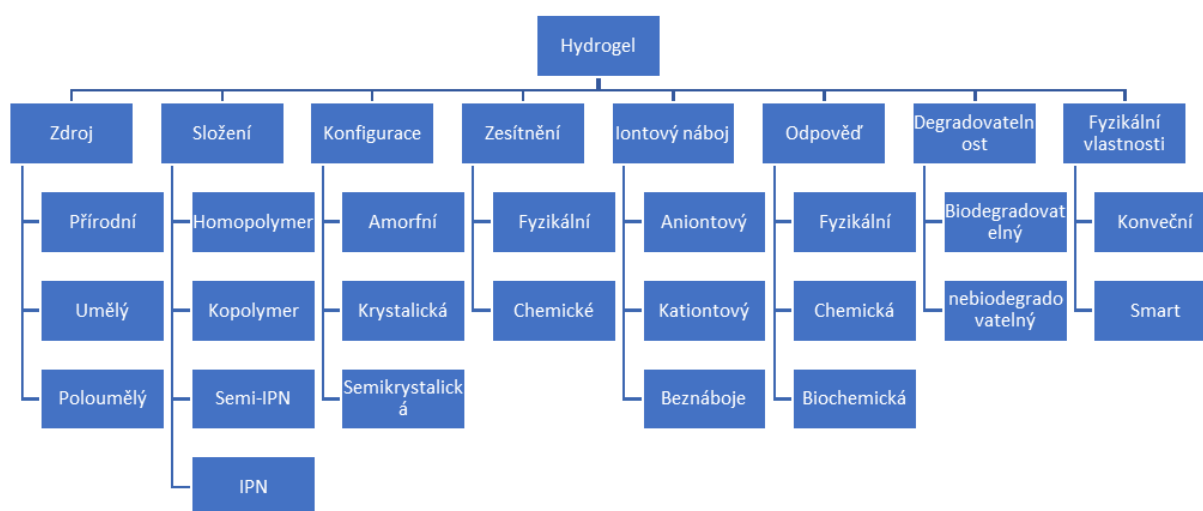
Okay (2010) uvádí, že rychlost botnění hydrogelu je přímo úměrná koncentraci polymerů v hydrogelu, a tedy hustotě zesítění. Ovšem autor zároveň dodává, že jestliže je hustota uzlových bodů příliš vysoká, snižuje se rychlost botnění hydrogelu a zvyšuje se jeho křehkost [7].



Obrázek 1.1: Struktura hydrogelu na molekulární úrovni. [2]

2.1.2 Klasifikace hydrogelů

Od prvního praktického využití hydrogelů dnes existuje velké množství druhů tohoto materiálu, který je často využíván v medicíně. Základní klasifikace hydrogelů je prováděna na základě [3]: zdroje, ze kterého je hydrogel připraven, způsobu přípravy, iontového náboje, odezvy, síťování a fyzikálních vlastností. Přehled klasifikace hydrogelu je zobrazen na obrázku 1.2.



Obrázek 1.2: Klasifikace hydrogelu. [2]

Jak ukazuje obrázek 1.2, hydrogel může mít původ přírodní, syntetický či poloumělý [8]. Hydrogely, které jsou vyrobené z přírodních zdrojů, jsou biologickém využití upřednostňovány, protože jsou vysoce biokompatibilní. Nicméně, na druhou stranu jsou tyto materiály zpravidla charakteristické horšími mechanickými vlastnostmi, nižší stabilitou a horší reprodukovatelností při jejich výrobě [9]. Příkladem přírodních polymerů využívaných pro tvorbu hydrogelů jsou kolagen, želatina, alginát a chitosan [10]. Příkladem umělých polymerů jsou poly(etylenglykol), poly(akrylová kyselina), poly(metakrylová kyselina) a poly(vinylalkohol) [11].

Na základě složení polymeru (obrázek 1.2) lze hydrogel rozdělit na homopolymery, kopolymery, semi-interpenetrovanou polymerní a interpenetrovanou polymerní síť

(IPN). Homopolymerní hydrogely jsou složeny ze stejných monomerních jednotek, kde mohou mít zesíťovanou nebo nezesíťovanou síťovou strukturu založenou na povaze monomerů a polymerační technice. Kopolymerní hydrogel je složený ze dvou nebo více různých monomerních jednotek s minimálně jedné hydrofilní složce. Semi-IPN hydrogely jsou vytvářeny průnikem jednoho lineárního polymerního řetězce do jiné síťované polymerní sítě, a to bez vzájemných chemických vazeb [12].

2.1.3 Použití hydrogelů

Jak již bylo uvedeno výše, první praktické využití hydrogelů byly měkké kontaktní čočky a bylo jasné, že tento materiál najde v medicíně velmi široké uplatnění, jak ilustrují některé příklady medicínského využití hydrogelů.

2.1.3.1 Kryty ran

Kryty ran mohou být polymery ve formě gáz, gelů, hydrogelů, hydrokoloidů atd. Mezi nimi jsou hydrogely nejslibnějším materiálem, který napomáhá při hojení ran. Hydrogely fungují jako ideální kryty na rány, protože mohou poskytovat vlhké prostředí v místě poranění, pomáhají při odstraňování exsudátů z rány, zabraňují infekci a poskytují vhodné prostředí pro regeneraci tkání.

Rána je zranění, ke kterému dochází v tělních tkáních uvnitř nebo vně, hlavně na kůži v důsledku traumatu, poranění nebo jiného poškození [13]. Rána může způsobit narušení struktury a funkce normální tkáně. Existují dva typy ran – akutní a chronické rány. Akutní rána se hojí úplně za kratší dobu, zatímco chronická rána se hojí déle. Proces hojení ran zahrnuje hemostázu, zánět, proliferaci a remodelaci [14]. Proces hojení ran je ovlivněn různými faktory, jako je infekce rány, hloubka rány, interakce cizího těla, stres, tlak, věk, nemoci atd. [15]. Zjizvení nastává během normálního hojení v důsledku ukládání kolagenových vláken a může přetrvávat velmi dlouho. Catanzano et al., (2015) vyvinul složený hydrogel obsahující alginát a hyaluronan pro usnadnění procesu hojení ran. Alginát je polysacharid s vysokou absorpční schopností, který pomáhá minimalizovat sekreci ran a podporuje hojení ran udržováním vlhkého prostředí. Pomocí kyseliny hyaluronové, která pomáhá při migraci a proliferaci keratinocytů, úspěšně připravili hydrogel alginát-hyaluronan iontovým zasíťováním

[16]. Hydrogel na bázi polysacharidů má větší potenciál při aplikaci pro hojení ran, protože má vysokou absorpční schopnost vody. Hydrogely hemicelulózy, začleněné do nanocelulózy, byly připraveny Liu et al (2018). Tento hydrogel pomáhá při adhezi a proliferaci fibroblastových buněk a může být vhodným hydrogelním materiálem pro hojení ran [15].

2.1.3.2 Kosmetika

Hlavní funkcí pokožky je ochrana těla před faktory prostředí, jako jsou mikroorganismy a UV záření. Kromě toho také pomáhá při udržování tělesné teploty a tělesné tekutiny [17]. Hydratace pokožky je důležitá pro udržení jejího vzhledu a struktury [18]. Genetické faktory, sluneční záření a znečištěné životní prostředí, jsou nejvýznamnější faktory, které se podílejí na přirozeném stárnutí a poškozování pokožky [19]. Právě v regeneraci pokožky má hydrogel velký potenciál.

Hydrogel lze použít pro léčbu kožních problémů, jako je akné, celulitida, vrásky, pigmentace, hydratace kůže a stárnutí. Například se používá bioadhezivní hydrogel. Právě bioadhezivní vlastnost hydrogelu pomáhá při postupném uvolňování kofeinu do pokožky, čímž se zlepšuje vzhled a strukturu kůže [20]. Na trhu jsou k léčbě problémů souvisejících s pokožkou dostupné hydrogelové produkty, jako je obličejová maska, maska na rty, oční polštářky atd. Dalším příkladem může být kolagenový hydrogel, který pomáhá regenerovat a obnovit měkkost, pružnost a hydrataci pokožky. Tento hydrogel je tvořen kyselinou hyaluronovou a kolagenem. Kyselina hyaluronová hraje důležitou roli ve vlhkosti kůže tím, že pokožce dodává hydrataci a hydrogel tuto látku dokáže zadržet a postupně uvolňovat [17].

2.1.3.3 Kontaktní čočky

Kontaktní čočky jsou v přímém kontaktu s očima, jejich funkcí je korekce zraku, případně aplikace léčiva pro léčbu očních nemocí [21]. Existují dva hlavní typy kontaktních čoček, tuhé a měkké kontaktní čočky. Tuhé kontaktní čočky jsou vyráběny z polymerního polymethylmethakrylátu (PMMA). Tento materiál disponuje vlastnostmi jako je smáčivost povrchu, vysoký modul pružnosti a vynikající trvanlivost. Nemá však propustnost pro kyslík [22]. V roce 1960 Wichterle a Lim poprvé popsali hydrogel pro použití při přípravě kontaktních čoček a pro další aplikace [23]. Hydrogelový systém na bázi poly(2-hydroxyethylmethakrylátu) (PHEMA) byl prvním hydrogelovým materiálem použitým k vytvoření kontaktní čočky. Poly(vinylalkohol), polyakrylonitril aj. jsou další hydrofilní polymery, které byly také zkoumány pro výrobu hydrogelových kontaktních čoček [24]. Kromě toho jsou také zkoumány kontaktní čočky na bázi silikonu a fluoru. Hydrogelové kontaktní čočky na bázi silikonu jsou však dnes jedním z nejvýznamnějších materiálů [25]. Hydrogelové kontaktní čočky mají vysoký obsah vody a jsou propustné pro vodu i kyslík [26]. Kyslíková propustnost je velmi důležitá vlastnost pro správnou funkci rohovky. Protože rohovka používá kyslík ze vzduchu k udržení své struktury, funkce a optických vlastností [27]. Propustnost kyslíku v hydrogelových kontaktních čočkách souvisí s obsahem vody a samozřejmě tloušťkou kontaktní čočky [28]. Tyto materiály musí být biokompatibilní, umožňovat pohodlné nošení a nepřetržitou tvorbu slzného filmu pro jasné vidění, dále musí být propustné pro ionty a nedráždivé a odolné vůči akumulaci slzného filmu [29].

2.1.3.4 Hydrogely pro dopravu léčiv

Proces podávání léčiva do těla člověka nebo zvířete k dosažení požadovaného terapeutického účinku je známý jako dodávání léčiva [30]. Systém dodávání léčiva by měl umožnit aplikovat léčivo kontrolovaným způsobem a měl by uvolňovat léčivo účinnou rychlostí na cílové místo [31]. V poslední době roste zájem o použití hydrogelu jako systému pro dodávání léčiv díky jeho trojrozměrné strukturální síti s vysokým obsahem vody. Tato vlastnost hydrogelu v řadě případů umožňuje sorpci hydrofilních účinných látek a následně jejich uvolnění kontrolovaným způsobem [15]. Trvalého uvolňování léčiva je dosaženo fyzikálními vlastnostmi hydrogelu, zejména jeho

porozitou [32]. Lék může být do hydrogelové matrice inkorporován principiálně dvěma způsoby. V první metodě je polymer smíchán s léčivem, následuje polymerace spolu se zesíťovacím činidlem. Druhá metoda spočívá v tom, že je vytvořený hydrogel ponořený do roztoku léčiva [33]. Hlavní nevýhody systému pro dodávání hydrogelových léčiv jsou jejich nízká pevnost v tahu a obtížnost při plnění hydrofobních léků [34]. Ke zvýšení účinnosti zavádění hydrofobních léčiv do hydrogelové matrice je prováděna inkorporace molekul, které mají schopnost tvořit inkluzní komplexy a inkorporace hydrofobních skupin [35].

2.1.3.5 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který kombinuje různé oblasti, jako je věda o materiálu, buněčná biologie a inženýrství, a jehož cílem je oprava či náhrada poškozených tkání [36]. Cílem tkáňového inženýrství je vytvořit podpůrný systém (kostru), který může napodobovat extracelulární matrici pro regeneraci tkáně. Materiál kostry by měl mít propojenou porézní strukturu pro růst buněk, transport živin, odstraňování metabolitů a měl by mít mechanickou sílu napodobující nativní tkáň. Kromě toho by kostra měla být biokompatibilní, měla by být biologicky rozložitelná, být sterilní a poskytovat strukturální podporu pro buněčné připojení, proliferaci a diferenciaci [37]. Samozřejmě při použití musí být sterilní. Existují různé přístupy k její konstrukci, které zahrnují předběžný porézní systém, decellularizovanou extracelulární matrici, buněčné listy se sekretovanou extracelulární matricí a buňky zapouzdřené v samostatně sestaveném hydrogelu [38]. Hydrogely získaly velký význam pro tkáňové inženýrství díky své podobnosti s přirozenou extracelulární matricí. Pro výrobu hydrogelového podpůrného systému existuje několik přístupů, včetně lyofilizace, emulgace, lití rozpouštědel, vyluhování, plynového napěňování, mikromletí a 3D tisku [8].

Hydrogelové systémy se používají k regeneraci srdečních tkání, chrupavek a kostí. Hydrogel na bázi nanocelulózy a alginátu sodného zesíťovaného chloridem vápenatým může být použit pro tkáňové inženýrství chrupavky [39]. Injekční hydrogely jsou výhodnější než normální hydrogelová lešení, protože snadněji vyplňují nepravidelné defekty a jejich aplikace nevyžaduje složité chirurgické zákroky [40].

2.2 Využití hydrogelu pro simulaci tuhých nádorů

Hydrogely lze s výhodou využít při studiu a vývoji léčebných metod pevných nádorů. Umělé extracelulární matrice na bázi hydrogelů jsou pro tyto účely vhodné, protože nabízejí spektrum biofyzikálních vlastností vhodných k tomuto účelu. Výhodná je rovněž schopnost jejich chemické modifikace, možná důsledná kontrola struktury a morfologie hydrogelu a schopnost navrhnout tvar a topografii hydrogelu. Proto se hydrogely objevily jako 3D biomimetická lešení pro růst rakovinných útvarů a jsou využívány v základním výzkumu rakoviny a pro studium odpovědi rakovinných útvarů na různé typy terapií.

Hydrogely na bázi bílkovin, jako je kolagen [41], matrigel [42] nebo fibrin [43], se běžně používají pro 3D rakovinnou buněčnou kulturu díky svým specifickým biofyzikálním a buněčným adhezivním vlastnostem. Matrigel je považován za „zlatý standardní“ materiál pro růst rakovinných útvarů *in vitro*. Extrahuje se z tumorů sarkomu myši a je složen především z lamininu, kolagenu typu IV a entaktinu, jakož i dalších složek, jako jsou proteoglykany [42]. Při polymeraci vytváří hustý gel s relativně malými póry [44]. V důsledku přítomnosti více růstových faktorů, matrigel podporuje *in vitro* růst rakovinných útvarů z buněčných linií a primárních buněk [44]. Matrigel byl použit například pro kultivaci rakovinných buněk z rakoviny prsu, kolorektálního karcinomu a buněčných linií rakoviny prostaty [45]. O rakovinných buňkách pěstovaných v matrigelu bylo učiněno mnoho důležitých zjištění. Například bylo zjištěno, že maligní buňky rakoviny prsu mohou být přeměněny na normální fenotyp prsních epitelálních buněk inhibicí p1 integrinového receptoru nebo down-regulací receptoru epidermálního růstového faktoru.

Studie rakovinných buněk vytvořených v biomimetických hydrogelech urychlují základní výzkum rakoviny a poskytují hlubší vhled do terapeutické léčby nádorů. Umělé hydrogely se širokým spektrem vlastností se neustále vyvíjejí ve snaze vyrovnat se složitosti nativních tkání a již bylo vyvinuto velké množství biologických, syntetických a hybridních hydrogelů pro růst rakovinných buněk [46]. Další práce by se měla zaměřit na přesnější napodobování prostředí *in vivo* pro růst nádorů, lepší pochopení úlohy prostředí na osud rakovinných buněk a ověření výsledků získaných pomocí modelů *in vitro*. Mezi základní otázky, které je třeba řešit, pak patří účinek

vlastností hydrogelu v počáteční fázi rakoviny, invazi rakoviny, metastáz a dále také odpověď na terapii. Například je třeba oddělit účinky biofyzikálních vlastností hydrogelu (například tuhost a propustnost) a složení a vlivu těchto faktorů na rakovinu. Role morfologie hydrogelu, tj. jeho porézní vnitřní struktura, anizotropie a hierarchická architektura, je nedostatečně zkoumána a je žádoucí ji prozkoumat s ohledem na každý konkrétní typ rakoviných buněk. Chemická funkcionalizace umělých hydrogelů pro růst rakovinných buněk může lépe replikovat biochemické prostředí pro růst nádoru. Tento přístup byl použit při navázání signalizačních faktorů buněčných buněk a složek specifických pro pankreatickou tkáň na hydrogelové kuličky obklopující pankreatické buňky [47] a lze jej použít při výzkumu rakoviny. Mezi další faktory, které by se měly vzít v úvahu při zlepšování vlastností hydrogelu, patří snadnost a náklady na jeho přípravu, jemné doladění doby gelace a stabilita hydrogelu. Je prokázáno, že degradace a remodelace těchto materiálů rakovinnými buňkami může vést k heterogenitě hydrogelu, což může vést k prostorovým změnám v hustotě a organizaci sítě [48]. Při dalším výzkumu by mělo být úsilí zaměřeno na použití hydrogelů se strukturami charakteristickými pro specifické typy rakoviny, například hydrogelů s fibrilárními strukturami a dobře definovaného uspořádání prostorových nanovláken [48].

Screening léků na buněčných strukturách rostoucích na těchto hydrogelových lešeních může poskytnout užitečné informace, které by klinickým lékařům umožnily lépe se rozhodovat o neúčinnější strategii léčení konkrétního pacienta. Kromě toho může tato metoda poskytnout příležitosti pro aplikaci nových léčebných metod pro pacienty, kteří nemohou být léčeni standardními chemoterapeutiky [49]. Hydrogely, které podporují růst rakovinných buněk, které jsou izolovány z nádorových tkání pacienta, jsou velmi slibné, zejména pokud jsou tyto hydrogely navrženy pro studie specifického typu rakoviny. Zatím však potenciál této metody ještě není zcela využit [50].

Další možné využití hydrogelů pro studium tuhých nádorů je jejich užití jako trojrozměrného testovacího média pro studium lokální aplikace léčiv pomocí nanovlákných nosičů léčiv [51-53]. Hydrogely mohou vykazovat podobné mechanické vlastnosti a mohou mít podobný obsah vody jako biologické měkké tkáně. Naprostá většina *in vitro* experimentu studujících uvolňování léčiv probíhá ve vodných

roztocích, což, zejména pro hydrofobní léčiva, nesimuluje *in vivo* prostředí úspěšně [54, 55].

2.3 Lokální aplikace léčiv pomocí PLA nanovláken

PLA je hydrofobní alifatický polyester, který se využívá v celé řadě lidských činnostech, biomedicínské činnosti nevyjímaje. Existují dvě formy PLA [56]: D-laktid a L-laktid. Případě jejich racemická směs.

Fyzikální vlastnosti a biologickou rozložitelnost PLA lze do určité míry regulovat použitím složky komonomeru hydroxylové kyseliny nebo racemizací D- a L-isomerů [57]. Získá se tak semikrystalický polymer poly-L-laktidu (PLLA) z L-laktidu. Jedná se o tvrdý transparentní polymer se silou v tahu 45–70 MPa, nebo poly (DL-laktid) (PDLLA), který je amorfním polymerem bez bodu tání a s mnohem nižší pevností v tahu [57].

Rychlost degradace PLA pak závisí na stupni krystalinity. Biologická rozložitelnost PLA může být modulována přimícháváním jiných látek, například polyethylenglykolu (PEG). Jedná se o často používaný hydrofilní monomer k modifikaci hydrofobního PLA, při jeho použití vzniká amfifilní kopolymer PLA-PEG [58]. Další užitečnou vlastností PLA je to, že je snadno formovatelný a umožňuje tak vytváření různých tvarů, stejně jako stavbu lešení, materiálů využívaných při šití, micel a mikro- a nanočástic schopných nést účinné léčivé látky [58].

Velmi krátce poté, co byly látky jako PLA, PGA a PLGA objeveny, byly použity v medicíně. Jedním ze způsobů užití byla i léčiva s lokálním a řízeným dodáváním účinné látky [59]. Dnes se tyto polymery, které jsou biokompatibilní, biologicky rozložitelné a netoxické, využívají pro celou řadu biomedicínských účelů.

Látky, jako PLA a PLGA, jsou při aplikaci léčiva široce používány, protože jsou biologicky rozložitelné a mají příznivé mechanické vlastnosti, které mohou být libovolně nastavovány [60]. Mohou být navrženy a syntetizovány s různými molekulovými hmotnostmi a poměry L:D formy pro jednotlivé aplikace s vysokou reprodukovatelností za nízkou cenu. Tyto výhody umožňují připravovat např. mikročástice a nanočástice pomocí PLA a PLGA. Tyto materiály byly použity k výrobě

různých způsobů podávání léků s nízkou molekulovou hmotností, jakož i peptidů a proteinových látek [61]. Většina těchto látek s nanočásticemi na bázi PLA a PLGA byla zaměřena na dodávání léčiva do cílových nádorů [62].

Jednou z výhod použití PLA polymerních matic pro výrobu mikro- a nanočástic je flexibilita, fyzikální vlastnosti, jako je velikost a tvar, a chemické vlastnosti, které lze snadno upravit, aby byly získány žádoucí farmakokinetické a biologicky rozložitelné vlastnosti. Částice obvykle mají tvar koule, kapsle nebo kostky, případně mohou být i jiných tvarů [61]. Účinná látka je v nich obvykle rozptýlena homogenně v celé polymerní matici [59].

Mikročástice a nanočástice na bázi PLA mohou být užitečné při dodávání léčiv a pro další biomedicínské aplikace, ale existují také různá omezení – viz tabulka 1.1.

Tabulka 1.1: Přehled výhod a nevýhod PLA mikro- a nanočástic. [60]

	Výhody	Omezení
Mikročástice	Aplikace injekcí Intramuskulární injekce Kontrolované uvolnění Reprodukovatelnost	Vedlejší toxické účinky při vysoké počáteční dávce Možné prasknutí => plýtvání drahými léky
Nanočástice	Přímá aplikace injekcí do krve Lepší odpověď	Nepřímý odběr retikuloendoteliálním systémem (RES)

Nanočástice jsou internalizovány v buňkách částečně prostřednictvím tekuté fáze pinocytózy a také prostřednictvím endocytózy zprostředkované klathrinem [60]. Mikročástice a nanočástice mohou účinně začlenit léčivo do své struktury [63]. Mikročástice a nanočástice s velkými poměry povrchu k objemu poskytují větší počet reakčních míst než částice makrovelikosti s menšími povrchovými plochami [64]. Objemové a povrchové vlastnosti lze snadno upravit. Metody hromadné modifikace zahrnují míchání s různými polymery, plastifikaci, kopolymeraci a zesílení. Povrchové způsoby modifikace zahrnují povrchové potahování, zachycení a využití plazmy. Doplňkové biomateriály, jako jsou poly(ethylenglykol), polysacharidy a proteiny byly

použity pro potahování mikro- a nanočástic PLA [59]. Všechny modifikace jsou navrženy tak, aby se dosáhlo vysoké účinnosti zapouzdření léku a plnění a správné řízené rychlosti uvolňování léčiva.

Pro přípravu látek na bázi PLA existuje několik technik užitečných pro mikro- i nanočástice [65]. Techniky jsou rozděleny do čtyř kategorií. Kategorie 1 jsou tradiční metody založené na jednoduché emulzi, dvojité emulzi, případně více emulzích. Kategorie 2 jsou metody založené na srážení, expanzi superkritické tekutiny do rozpouštědla, vysolení a dialýze. Kategorie 3 jsou metody přímého komponování, jako je technika tavení, sušení, rozprašování. Kategorie 4 zahrnuje nové přístupy včetně mikrofluidní techniky a techniky založené na využívání šablony/formy. Další kritéria závisí na způsobu zapouzdření léku. Lék je buď uložen uvnitř tobolky, nebo dispergován v polymerních maticích [66].

Zvláště účinné jsou mikročástice a nanočástice PLA pro orální podávání, které mají sloužit k aplikaci ve vodném prostředí málo rozpustných léčiv. Předpokládá se, že nanočástice jsou absorbovány z gastrointestinálního traktu. V případě málo rozpustných léčiv se vyrábějí vhodné lékové formy velmi obtížně. [67]. Nicméně pokud jsou tyto špatně rozpustné léky ve formě nanočástic na PLA, pak se jejich rozpustnost výrazně zvyšuje a mnohem snadněji se dostávají na místo potřeby. Tato skutečnost je dána tím, že střeva absorbují pouze částice určité velikosti, a to do 100 nm [68].

Mikročástice a nanočástice PLA lze využít například pro systémovou aplikaci kinázy 1 (SIPLK1), která v případě nanočástic na PLA výrazně potlačuje růst nádorů u myši, konkrétně buněčné linie MDA-MA-435 [69]. Dále je rovněž možné je využít i pro genovou terapii v léčbě onemocnění srdce, jak bylo potvrzeno na *in vivo* experimentech [70].

PLA bylo využito například i v případě siRNA, která byla součástí systému PEG-PLA. Tyto nanočástice úspěšně vstupovaly do buněk, což ve svém důsledku vedlo k výraznému zmenšení léčeného tumoru [70]. Ukazuje se tak, že látky v systému PLA jsou velmi vhodné k léčbě různých onkologických onemocnění.

Systém nanočástic PLA obsahující polyethylenimin (PEI), který byl součástí povrchu těchto nanočástic, je často využíván pro genovou terapii. Systémy

PEG-PLA-PEI jsou často využívány pro cílené aplikace DNA vektorů a doxorubicin (DOX). Tyto nanonosiče totiž mají tu výhodu, že nejsou znečištěné oxazoliny, jsou biologicky stabilní a pro DOX zajišťují hydrofobicitu [70].

Současné dodání jak DNA a DOX do buněčné linie melanomu kůže B16F10, vedlo v případě myši k výraznému snížení velikosti nádoru a životaschopnosti rakovinových buněk [70]. V nedávné době systémy dvojitého nebo vícečetného podávání ukázaly velký potenciál v oblasti podávání léků s využitím pro rakovinu a genovou terapii

Protože při léčbě nádorových onemocnění v oblasti mozku má většina protirakovinových léků špatnou permeabilitu kvůli hematoencefalické bariéře, bylo nutné rozvíjet implantovatelné protinádorové přípravky s biologicky rozložitelnými polymery, které poskytují výhody trvalého uvolňování těchto terapeutických léčiv. Biodegradovatelný, biokompatibilní polymer, [bis(*p*-karboxyfenoxi)]propan a kyselina sebaková v poměru 20:80 při využití PLA uvolňuje protinádorové léčivo – karmustin [1,3bis(2-chlorethyl)-1-nitrosomočovina nebo BCNU]. Vědecké studie prokázaly bezpečnost těchto biokompatibilních implantátů a vysokou účinnost v mozku hlodavců a primátů [71].

Nanočástice PLA byly použity k dopravě temozolomidu do hlodavčích gliomových buněk *in vitro*. Výsledek tohoto pokusu ukázal, že protinádorová účinnost temozolomidu je větší, pokud je využito PLA nanočástic [72].

Jiná studie zkoumala vliv nanočástice BIND-014. Jedná se o hydrofóbní PLA nanočástice, které obsahují docataxel a hydrofilní PEG látky. Tyto částice pak byly používány k cílené akumulaci léčiva (docataxelu) v nádoru prostaty. Studie potvrdila, že docetaxel se dostával rychleji do krevního oběhu, došlo k většímu potlačení růstu nádoru a nedocházelo k akumulaci nežádoucích látek v játrech, oproti situaci, kdy byl podáván docataxel samostatně [73].

Klinická studie ve fázi I zkoumala dva dávkovací režimy nanočástice BIND-014 u pacientů s pokročilými nádory. BIND-014 byl dobře tolerován a vykazoval farmakokinetický profil s lineární dávkou pomocí prodloužené perzistence cirkulujících nanočástic s docetaxelem [74].

Další lék využívaný při léčbě rakoviny, který byl podroben výzkumu v souvislosti

s použitím nanočástic PLA byl tamoxifen. Jedná se o modulátor estrogenového receptoru, který sice má velmi dobrou orální dostupnost, ale v této formě vykazuje dlouhodobou toxicitu. Byly proto hledány způsoby, jak zachovat, či ještě zvýšit jeho dostupnost a účinnost, ale přitom snížit toxicitu. K tomuto účelu byly opět vybrány polymerní nanočástice, které obsahovaly tamoxifen. Použití těchto nanočástic bylo stejně efektivní, jako použití léku samotného, navíc částice PLA s obsahem tamoxifenu vykazovaly nižší hepatotoxicitu a nefrotoxicitu u pacientek s rakovinou prsu [74].

Nanočástice PLA se však jeví nadějně i při léčbě leukémie. K nanočásticím PLA byla přidána BS-RNase (Bovine seminal ribonuclease) a *in vivo* byly prokázány aspermatogenní a antiembryonální účinky této metody [75].

Jako účinné bylo prokázáno spojení nanovláken s tetraheptylamoniem a částicemi Fe304. Tato směs vykazovala velmi dobré výsledky při pokusech na leukemické buněčné linii K562. Přesněji, došlo ke snadnější interakci protinádorové sloučeniny a lepší absorpci léčiva [76].

Podobně nanokompozity vyrobené z PLA nanovláken a Au nanočástic obohacených daunorubicinem usnadnily absorpci tohoto léku do leukemických buněk rezistentních na léčivo [76].

Yadav et al. (2011) prováděli experimenty s částicemi PLGA, které byly obohaceny o PEG a cytarabin k léčbě leukémie. Charakteristické pro cytarabin je to, že se velmi špatně vstřebává z gastrointestinálního traktu a má velmi krátkou dobu, po kterou je schopný účinkovat. V praxi je tak nutné tento lék aplikovat intravenózně, a to v několika dávkách. To však vede k řadě nežádoucích projevů, jako nekróza zdravých buněk. Autoři proto cytarabin aplikovali na PLGA částice a použili na leukemické buňky L1210 u myši. Výsledek ukázal, že oproti kontrolní skupině, která spočívala pouze v podávání samotného léku cytarabinu došlo v případě podávání cytarabinu pomocí PLGA k lepšímu účinku a menším vedlejším účinkům [77].

Zvláště zajímavé je použití nanočástic pro metastatickou rakovinu díky jejich možné široké alokaci na různé tkáně a možnosti systémového dodání. Tyto substance nanočástic totiž mohou být schopny cíleného navádění na více nádorových míst současně. Tím se nabízí jejich využití právě při léčbě rakoviny, která již metastázovala.

Podle provedených studií navíc při použití této metody dochází ke zmírnění negativních dopadů léčby na pacienta a ke zvýšení účinnosti léčby [78]. Není přitom nutno dodávat, že v případě rakoviny ve formě metastáz je často šance na vyléčení již velmi nízká a metody léčení jsou často pro pacienta velmi náročné. [78]. Nicméně využití nanočástic PLA je mnohem šetrnější, právě proto, že odpadají vedlejší účinky, nejsou toxické, či je jejich toxicita výrazně snížena.

Další možnou aplikací PLA v případě boje s rakovinou je využití micel. Micely jsou koloidní částice v rozmezí velikostí 5 – 100 nm. Polymerní micely jsou blokové kopolymery s hydrofobními a hydrofilními jednotkami, které mají jedinečnou generovanou strukturu. Pro tuto aplikaci se využívají např. PEG-b-PLA micely, u nichž byla již prokázána vysoká efektivita a účinnost při podávání protirakovinných léků [79].

V případě léků proti rakovině byla zkoušena například látka Genexol-PM, která se skládá z 20 - 50 nm micely, která je vytvořena z polyethylenglykolu a polylaktidenkapsulujícího paklitaxelu. Studie prokázala, že takto podaná léčivá látka má slibné účinky v případě karcinomu prsu oproti běžně prováděné léčbě [80].

Aplikace pomocí micel rovněž umožňuje podávat několik léků zároveň. Jak potvrdila studie provedená [81] při podávání paklitaxelu, tanespimycin (17-AAG) a rapamycin (RAP) pomocí micely PEG-b-PLA. Léky spolu nijak nereagovaly a jejich podávání nemělo negativní dopady. Tato trojkombinace léků byla užita při léčbě rakoviny prsu. Při současném podání těchto léků se také neobjevovaly negativní dopady na pacienta, tak jak tomu bylo v případě samotného podávání každého z výše uvedených léčiv. To bylo pravděpodobně způsobeno mnohem přesnějším dávkováním a zacílením léčiv [81].

PLA systémy však najdou své využití nejen v případě rakoviny, ale i dalších nemocí. Například se jako velmi účinné a slibné jeví vakcíny založené na užití nano- či mikročástic [82]. V současné době jsou hledány vakcíny proti AIDS, antraxu, SRAS, MERS a mnoha dalším. V případě všech výše uvedených nemocí, ale i řadě dalších, mohou přitom nano a mikročástice na vhodných nosičích představovat velmi slibné metody, které zvýší účinnost vakcinace, či vakcinaci vůbec umožní [82]. Mnoho výzkumných týmů po celém světě se tak snaží vyvinout vakcíny založené na mikro- a nanočásticích s užitím PLA materiálů [82].

Studie prokázala, že T-buňky aktivované prostřednictvím antigenů, které byly součástí mikročástic PLA, zvýšily svoji činnost 100 až 1000krát oproti reakci na podání samotných antigenů [82].

Konkrétně pak ve studii, která se zabývá HIV, bylo zjištěno, že HIV Gag antigen (p24), který byl součástí nanočástic s PLA a buněk odvozených z monocytů (MDDCs) z HIV 1 zvýšil růst CD8+ T-buněk ve srovnání se stimulací samotným antigenem p24 [83].

V současné době se stále více dbá na to, aby pacient při léčení vážných onemocnění byl v co nejméně stresován a aby mu aplikace léčiv způsobovala co nejméně potíží, bolesti a omezení. Vše výše uvedené splňují nanočástice a aplikace léčiv transdermálně. I zde najdou využití PLA nanočástice.

Transdermální podávání léků bylo vyvinuto jako alternativa k pilulkám a injekcím a spočívá v pomalém transportu dané léčivé látky do těla přes kůži [84]. Výhodou je, že je pro aplikaci léku k dispozici velká plocha pokožky, snadná dostupnost daného místa a zejména to, že dermální podávání léčiva může být potenciálně bez bolesti. To jsou jasné faktory hovořící pro transdermální aplikaci léčiv [85].

Transdermálně je léčivo nejčastěji aplikováno prostřednictvím náplastí, které jsou často vyrobeny z polymeru, obsahují léčivo a adhezivní vrstvu a zajišťují stabilní řízené dodávání léčiva [84]. Vzhledem k bariérovým vlastnostem pokožky a jejích vrstev dochází k transportu pouze malých lipofilních molekul rozpustných v oleji. Což zatím omezuje možná podávaná léčiva touto formou na malý okruh látek [85].

Dnes je pro tyto účely vyvinuta celá řada přípravků, léčivých náplastí, které jsou tvořeny mikro jehlami s účinnou látkou, které bezbolestně propíchnou kůži a postupně danou účinnou látku aplikují [86].

Tyto mikro jehly jsou nejčastěji vyráběné z materiálu PLA, PGA a PLGA, právě kvůli jejich biokompatibilitě, vysoké efektivitě a mechanické pevnosti. Právě mechanické vlastnosti a schopnosti transportovat danou léčivou sloučeninu jsou velmi důležité a stále se zdokonalují [86].

Prostup přes kůži pak probíhá na základě molekulární difúze. Úspěšnost celého procesu, tedy cesty léčivé látky až do svého místa určení tak závisí právě na nastavení

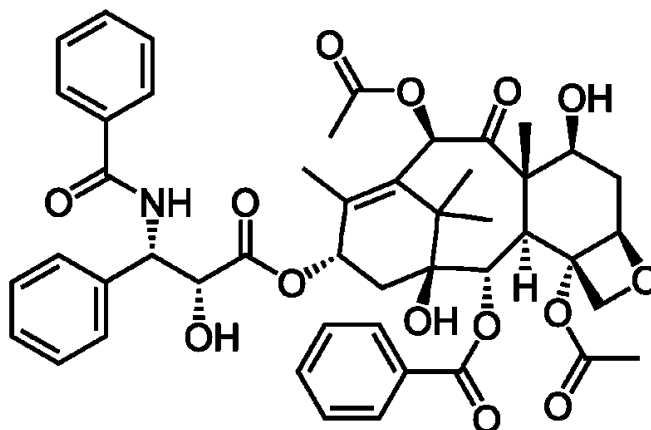
pole mikro jehel, na typu a druhu materiálu, ze kterého jsou tyto jehly vyrobené a také na samotné léčivé látce a jejích vlastnostech [66]. Tento způsob aplikace léčivé látky byl zkoušen i v případě genové terapie a imunizace. Například autoři Chen et al. (2013) použili tuto metodu pro imunizaci krys pomocí ovalbuminu. U ošetřených krys se objevila specifická odpověď organismu, která vydržela po dobu 6 týdnů oproti tomu, kdy byla tato látka podána samostatně [87].

2.4 Paklitaxel

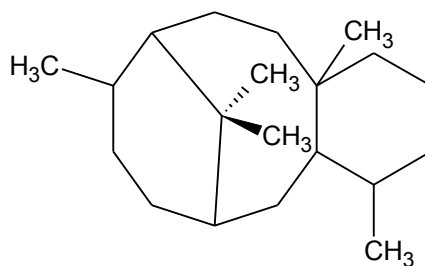
Na konci padesátých let zahájil americký Národní onkologický ústav program pro zkoumání extraktů z více než 12 000 rostlin pro jejich protinádorovou aktivitu. [88,89] Začátkem šedesátých let byl zkoumán extrakt z kůry tisu západoamerického, *Taxus brevifolia*, kdy se v preklinických studiích zjistilo, že má cytotoxickou aktivitu. Paklitaxal byl izolován v čisté formě v roce 1969, avšak kvůli jeho malému množství a složitosti molekuly byla jeho struktura popsána až v roce 1971 [90].

2.4.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti paklitaxelu

Paklitaxel, jehož struktura je znázorněna na obrázku 1.3, je diterpenoid, který ve své molekule obsahuje strukturu taxanu (obrázek 1.4). Jedná se tedy o pseudoalkaloid. Bylo prokázáno, že pro protinádorovou aktivitu je nutné, aby byla přítomná celá molekula taxanu. Produkty vzniklé nízkoteplotním štěpením, ester a tetraol paklitaxelu, jsou v podstatě neaktivní [91].



Obrázek 1.3: Struktura paklitaxelu



Obrázek 1.4: Struktura taxanového jádra

Paklitaxel je hydrofobní látka, která je obecně špatně rozpustná ve vodném prostředí. Navíc paklitaxel nemůže za fyziologických podmínek ionizovat, tudíž manipulací pH nelze ovlivnit jeho rozpustnost. [89] Pro laboratorní studie se jako medium pro uvolňování paklitaxalu používá fosfátový pufr (PBS, pH = 7,4). Dále byla zkoumána jeho stabilita v různých typech rozpouštědel a bylo zjištěno, že v nepolárních a polárních organických rozpouštědlech je PTX stabilní, ale ve vodném prostředí dochází k jeho degradaci hydrolýzou jeho esterových skupin a dochází k epimerizaci jeho chirálního centra. [92]. Na jeho stabilitu ve vodných rozpouštědlech má kladný vliv přidavek PEG, ethanolu, methanolu či detergentu Tween 80. [93]

2.4.2 Terapeutické využití paklitaxelu

Paklitaxel je jeden z neúčinnějších léků používaných v chemoterapii rakoviny prsu, dále se hojně využívá k léčbě rakoviny vaječníků a plic. Jeho cytostatická aktivita je způsobena tím, že podporuje stabilitu mikrotubulů, složených z dimeru tubulinu, a zabraňuje jejich depolymeraci. Stabilita vede k narušení normální reorganizace sítě mikrotubulů, která je životně důležitá pro dělení buněk [94]. U léčby tuhých nádorů se dále využívá jeho antiangiogenního účinku, kdy potlačí růst krevního řečiště [95].

2.4.3 Metody stanovení paklitaxelu

Nejběžněji se paklitaxel stanovuje prostřednictvím HPLC s hmotnostní nebo UV detekcí. Nejčastěji se používají kolony s oktadecylovou [96-99] nebo s oktylovou stacionární fází [100]. Jako mobilní fáze se při použití UV detekce nejběžněji používá směs acetonitril/voda v různých poměrech [96, 99, 100], nebo acetonitril/acetátový pufr

[101]. Pro hmotnostní detekci se jako mobilní fáze běžně používá směs acetonitril/mravenčí kyselina [102], anebo směs methanol/ mravenčí kyselina [103]. Při stanoveních PTX pomocí UV detekce se nejčastěji měří absorbance při vlnové délce 227 nm [97-99, 101], vlnová délka 230 nm byla použita pro sledování PTX ve vzorcích krevní plasmy [100]. Pro sledování kinetiky uvolňování paklitaxalu z nanovláken byla zvolena vlnová délka 270 nm [24].

2.5 Elektrospinning

Elektrospinning je technika pro přípravu nanovláken, která využívá elektrostatických sil k vytváření vláken malých průměrů z polymerního roztoku. Menší průměr vláken umožňuje konstruování nanovláken s větší měrnou povrchovou plochou, díky které jsou účinnějšími nosiči aktivních složek, neboť je jejich povrch snáze dostupný [104].

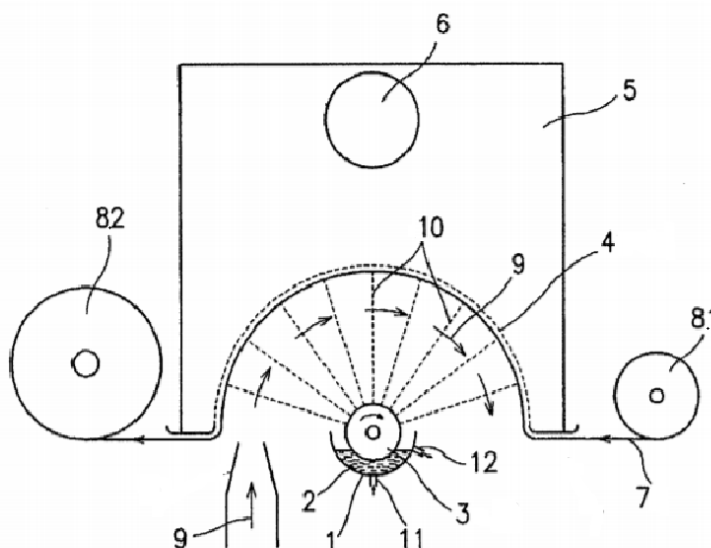
Zařízení používané pro elektrospinning je konstrukčně velmi jednoduché a adaptabilní, skládá se ze zdroje vysokého napětí, elektrody vysokého napětí, která je spojena s polymerním roztokem, injekční pumpy a elektrody opačného náboje sloužící také jako kolektor [105].

Polymerní roztok, na který je vkládáno vysoké napětí, je protlačen skrze zvlákňovací trysku, která je ukončena kapilárou, tak aby na špičce kapiláry vznikla převislá kapka polymerního roztoku. Vysoké napětí je aplikováno na roztok uvnitř stříkačky, čímž se v roztoku indukuje volný náboj. Tyto nabité ionty se vlivem elektrického pole pohybují ke kolektoru a přenášejí tahové síly na polymerní roztok. Na špičce kapiláry má převislá kapka vlivem elektrického pole kónický tvar (Taylorův kužel). V momentě, kdy intenzita elektrostatického pole překoná povrchové napětí roztoku, je kapalina vypuzena ze špičky kuželu směrem ke kolektoru. Jak tryska prochází atmosférou, dochází k odpařování rozpouštědla a vzniklé nabité vlákno směřuje ke kolektoru [106].

Při tomto uspořádání může současně vznikat pouze jedno nanovláknko, což omezuje produktivitu tohoto procesu a eventuální možnost pro komerční využití. Pro přípravu většího množství nanovláken byla vyvinuta metoda bezjehlového elektrospinningu, kdy průmyslové přístroje jsou schopny vytvářet nanovláknenné textilie o šíři až 1,6 metrů.

2.5.1 Nanospider™

Principem této metody, taktéž nazývané jako bezjehlový elektrospinning, je kontinuální přívod polymerního roztoku, který se do elektrického pole pro zvlákňování přivádí povrchem otáčející se kladně nabité elektrody. Kladná elektroda tvaru válce je částečně ponořena do polymerního roztoku, jejím otáčením na jejím povrchu zůstává tenká vrstva roztoku, která je vlivem elektrostatického pole schopna vytvářet Taylorovy kužely. Vznikající nanovlákná jsou vlivem elektrického pole a proudu vzduchu unášena k elektrodě opačného napětí, a před ní se ukládají na podpurnou textilií, která je propustná pro vzduch, a vytváří na ni vrstvu nanovláken. Podkladová tkanina se posouvá v protisměru otáčení válcové elektrody, rychlostí posunu se dá snadno ovlivňovat tloušťka vznikající vláknenné textilie [107]. Schéma zařízení pro bezjehlový elektrospinning se znázorněno na obrázku 1.5.



Obrázek 1.5: Schéma znázorňující řez zařízením Nanospider™ [107]. 1 zásobník polymerního roztoku; 2 polymerní roztok; 3 otočná válcová elektroda; 4 protielektróda; 5 podtlaková komora; 6 zdroj podtlaku; 7 podkladový materiál; 8.1 odvíjecí zařízení; 8.2 navíjecí zařízení; 9 sušící vzduch; 10 nově formovaná nanovlákná; 11 přívod polymerní směsi; 12 odvod polymerní směsi.

3 Experimentální část

3.1 Materiály

3.1.1 Chemikálie

- paklitaxel, standard (LC Laboratories, USA, Woburn, MA)
- acetonitril, LC-MS CHROMASOLV[®] (Sigma-Aldrich, Německo)
- deionizovaná voda
- methanol, LC-MS CHROMASOLV[®] (Sigma-Aldrich, Německo)
- fosfátový pufr, tablety (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-hydroxyethylmethakrylát (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- ethylenglykoldimethakrylát (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- kyselina metakrylová (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- 2-hydroxy-2-methylpropiofenon (Darocur 1173) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- hydrogen uhličitán sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- HEMA hydrogely s obsahem EDMA 0,3, 0,7 a 0,9 hmot. % (Ústav Makromolekulární Chemie AV ČR, v.v.i.)

3.1.2 PLA nanovlákna

PLA nanovlákna byla připravena společností NANOVIKA s.r.o. (Litvínov, Česká republika) metodou bezjehlového elektrospinningu za použití technologie Nanospider[™]. Nejprve byl PLA ($M_r = 420,000$ g/mol, koeficient polydisperzity 1,5; Nature Works, LLC, USA, Minnetonka, MN) rozpuštěn v chloroformu (PENTA, Praha, Česká republika), tak aby obsah PLA byl 54 hmot. %, následně byl přidán 1,2-dichlorethan (PENTA, Praha, Česká republika), tak že celkový obsah PLA v roztoku byl 29 hmot. %, nakonec byl přidán ethylacetát (PENTA, Praha, Česká republika), tím bylo celkové množství PLA v roztoku 10 hmot. %. Složení roztoku k elektrospinningu pro jednotlivé

typy nanovláken je uvedeno v tabulce 3.1. Parametry elektrospinningu byly následující: vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem 22 cm, napětí mezi elektrodami 20 - 60 kV, relativní vlhkost 25 - 30 % a teplota 20 °C. Připravená nanovlákná byla následně charakterizována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu pro zkoumání morfologie vláken, ¹H NMR spektroskopie pro ověření složení nanovláken. Pro určení specifické plochy povrchu nanovláken byla měřena metodou BET a teplotní vlastnosti nanovláken byly zkoumány pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie [108].

Tabulka 3.1: Složení směsi určené k elektrospinningu pro různý typ PLA nanovláken. Hodnoty obsahu jednotlivých složek jsou vztaženy na obsah PLA.

Typ nanovláken	Obsah PTX	Obsah PEG(20)	Obsah CD
	hmot. %		
PLA-PTX(10)	10	-	-
PLA-PTX(10)-PEG(20)	10	15	-
PLA-PTX(10)-CD	10	-	13,3

3.2 HPLC metoda pro stanovení PTX

K stanovení koncentrace PTX byla použita metoda HPLC s UV detekcí. K HPLC-UV analýzám byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity Quarternary LC (Agilent Technologies, Německo, Waldbronn) složený z vysokotlaké pumpy mobilní fáze (Agilent Technologies 1260 Infinity), automatického dávkovače s termostatem (Agilent Technologies 1260 Infinity), termostatu pro ohřev kolony (Agilent Technologies 1200 Series) a detektoru s diodovým polem (Agilent Technologies 1200 Series). Pro sběr dat a jejich vyhodnocení byl použit software Agilent OpenLab CDS ChemStation (Agilent Technologies).

Pro stanovení PTX byla použita kolona Astentic Express C18 (150 x 3,0 mm, s velikostí částic 5 μm) od firmy Sigma-Aldrich (Německo, Darmstadt). Teplota kolony byla udržována na 35 °C. Teplota v dávkovacím zařízení byla 25 °C. Objem nástřiku

vzorku byl 5 mm³. Pro detekci PTX byla nastavena vlnová délka 227 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril/voda (50/50, v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 cm³/min [109]. Takto nastavená separační metoda poskytla přijatelný retenční čas PTX (3,7 min) a pík PTX vykazoval gaussovský tvar.

Zásobní roztok PTX byl připraven navážením 10,0 mg PTX a jeho následným rozpuštěním v 10 cm³ methanolu. Takto připravený roztok byl skladován při teplotě - 20 °C, aby nedocházelo k degradaci PTX. Z tohoto roztoku byla následně připravena methanolicke řada kalibračních roztoků o koncentraci 100, 1000, 5000, 10000 ng/cm³ PTX. Pro sledování uvolňování PTX z PLA nanovláken do PBS byl připraven pracovní roztok PTX o koncentraci 100 µg/cm³ ze zásobního roztoku PTX smícháním s roztokem PBS s 0,5% přídavkem detergentu Tween 80. Z tohoto roztoku byla následně připravena kalibrační série pro stanovení PTX v PBS s přídavkem 0,5 % Tween 80 o koncentraci 100, 1000, 5000, 10000 ng/cm³ PTX.

3.3 Stanovení celkového množství PTX v PLA vláknech

Stanovení celkového množství PTX v různých typech nanovláken bylo provedeno metodou extrakce PTX do methanolu. Experiment byl proveden v temperované třepačce (Orbital Shaker-Incubator ES20, Biosan, Lotyšsko, Riga) při teplotě 25 °C a při 140 ot/min.

Pro každý pokus bylo ze studovaných PLA nanovláken vyraženo pět kruhových terčků o průměru 12,5 mm, ty byly následně zváženy, pro zjištění celkového teoretického množství PTX v nanovlákněch. Nanovlákná se následně vložila do 10 cm³ methanolu a byla umístěna do termostatované třepačky. Odběr vzorky byl proveden po 1, 2 a 24 hodinách od ponoření terčků. Pro analýzu bylo odebráno vždy 100 mm³ alikvotu. Tyto vzorky byly nejprve 10krát zředěny a poté v nich bylo stanoveno množství PTX pomocí HPLC-UV metody.

Stanovení celkového množství PTX bylo provedeno na všech PLA nanovlákněch v triplikátu. Výsledky byly následně statisticky zpracovány.

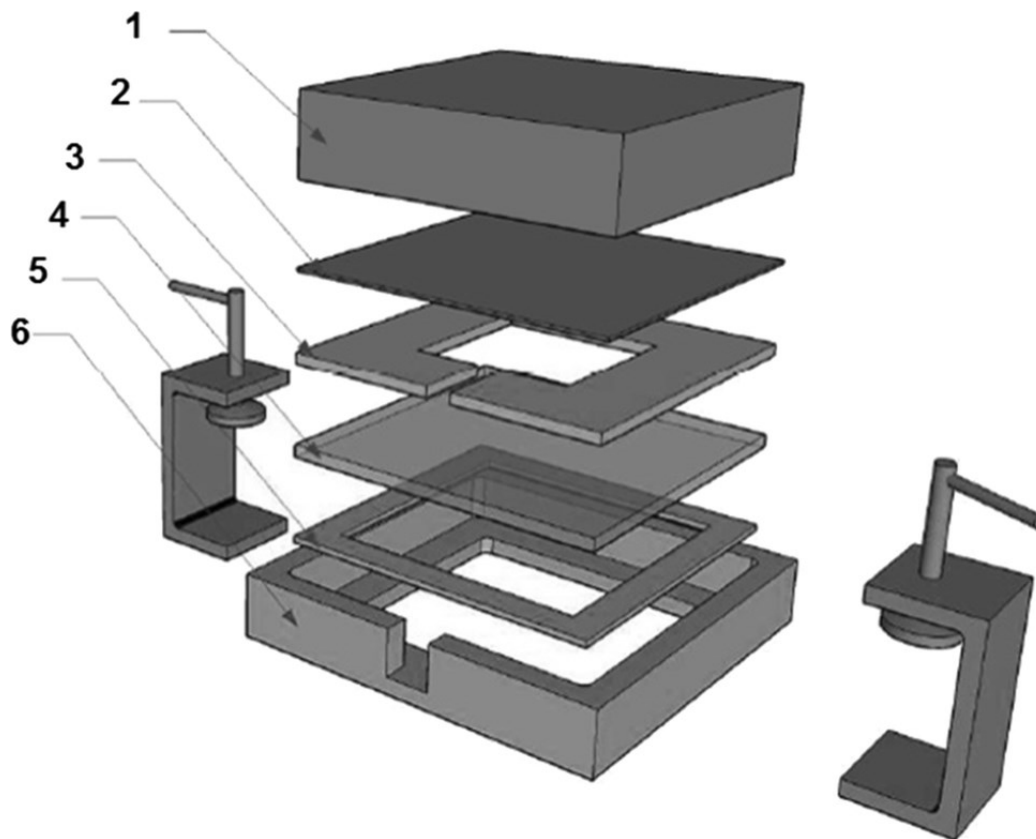
3.4 Extrakce PTX z nanovláken do PBS v režimu postupné výměny pufru

Sledování profilu uvolňování PTX do PBS bylo provedeno v temperované třepačce (Orbital Shaker-Incubator ES20, Biosan, Lotyšsko, Riga) při teplotě 37 °C a při 140 ot/min.

Pro každý experiment bylo z PLA nanovláken obsahujících PTX vyraženo pět kruhových terčků o průměru 12,5 mm, ty byly následně zváženy pro zjištění celkového množství PTX. Terčíky byly vloženy do 5 cm³ roztoku PBS s 0,5 % Tween 80. V době odběru vzorku byl z roztoku odebrán 1 cm³ roztoku pro stanovení koncentrace PTX a následně byl do extrakční cely přidán 1 cm³ čerstvého PBS s 0,5 % Tween 80. Odběr vzorku byl proveden v 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 a 72 hodin od ponoření terčků do roztoku. Ve vzorcích byla následně stanovena koncentrace PTX metodou HPLC-UV.

Studium kinetiky bylo provedeno na všech PLA nanovláčkách a v triplikátu. Výsledky byly následně statisticky zpracovány.

3.5 Příprava a stanovení stupně zbobtnání hydrogelů v rovnovážném stavu



Obrázek 3.1: Schéma formy pro přípravu hydrogelů [109]; (1) polypropylenový blok – 100x100x25 mm, (2) polypropylenová podložka, (3) silikonové těsnění, (4) skleněná destička – 100x100x4 mm, (5) silikonové těsnění, (6) hliníkový rám – 120x120x20 mm.

3.5.1 Příprava HEMA hydrogelů

K přípravě HEMA hydrogelů byla použita radikálová polymerizace iniciovaná UV zářením. Nejprve byla připravena polymerizační směs složená ze směsi HEMA/deionizovaná voda v poměru 60/40 (w/w), 0,5 % síťovacího činidla EDMA, vzhledem k celkovému množství HEMA) a 0,5 % iniciátoru polymerizace Darocur 1173 (vzhledem k celkovému množství HEMA a EDMA). Z polymerizační směsi byl následně odstraněn probubláním dusíkem po dobu 10 minut kyslík, který inhibuje radikálovou reakci. Polymerizační směs byla vpravena pomocí injekční stříkačky do

sestavené formy určené k polymerizaci. Schéma formy je znázorněno na obrázku 3.1. obrázek až za text Tloušťku vzniklého hydrogelu určovala tloušťka silikonového těsnění mezi polypropylenovou podložkou a skleněnou destičkou. Pro přípravu HEMA hydrogelů byla zvolena tloušťka 0,1 cm. Po naplnění formy byly vzorky polymerizovány po dobu 30 minut za použití 60W UV lampy ReptiGlo 8.0. Po skončení polymerizace byly vzniklé hydrogelové fólie vyjmuty z formy a byly umístěny do destilované vody po dobu jednoho týdne, aby se dosáhlo rovnovážného stavu zbotnění a došlo k vymytí nízkomolekulárních reziduí po polymeraci. Následně byly fólie umístěny do roztoku PBS s 0,5 % přídavkem Tween 80 po dobu dalšího týdne. Nakonec byly fólie upraveny na proužky o rozměrech 2,5 x 7 cm a opět byly uchovány v roztoku PBS s přídavkem Tween 80. Takto připravené hydrogely byly následně použity pro další experimenty.

3.5.2 Příprava HEMA-MA kopolymerního hydrogelu

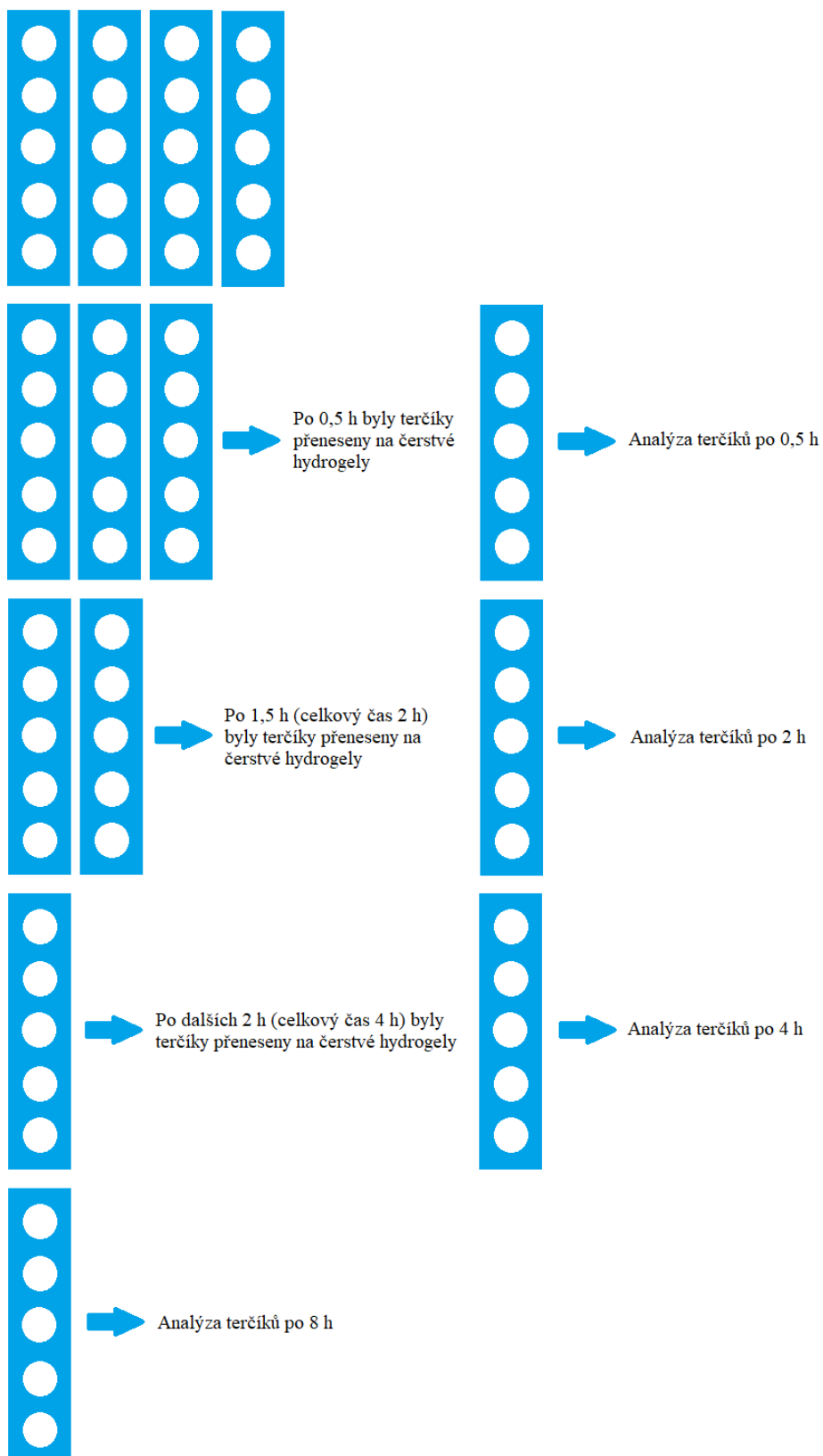
Další hydrogel, na kterém byly prováděny experimenty, byl kopolymer HEMA a MA. Nejprve byla připravena polymerizační směs složená z HEMA, dále bylo do směsi přidáno 1 hmot. % MA a 0,5 hmot. % EDMA vzhledem k celkovému množství HEMA, a nakonec byl do roztoku přidán UV iniciátor Darocur 1173 o 0,5 hmot. % vzhledem k celkovému množství polymerizační směsi. Roztok byl probublán dusíkem po dobu 5 minut a směs byla vpravena injekční stříkačkou do formy. Tloušťka hydrogelu HEMA-MA byla zvolena 0,05 cm. Následně byly vzorky polymerizovány 30 minut pomocí 60W UV lampy ReptiGlo 8.0. Po skončení polymerizace byly fólie vyjmuty z formy a byly vloženy do destilované vody po dobu jednoho týdne. Dále byly hydrogely přebotnány do 0,5% roztoku hydrogen uhličitany sodného, aby byl hydrogel převeden do sodné formy. Nakonec byly hydrogely umístěny do roztoku PBS s 0,5 % přídavkem Tween 80 po dobu dalšího týdne. Nakonec byly fólie upraveny na proužky o rozměrech 2,5 x 7 cm a opět byly uchovány v roztoku PBS s přídavkem Tween 80. Takto připravené hydrogely byly následně použity pro další experimenty.

3.5.3 Stanovení stupně zbobtnání hydrogelů

Pro stanovení stupně zbobtnání byly z hydrogelů vystřiženy tři čtverce o velikosti 2 x 2 cm, ze kterých byla definovaným způsobem odstraněna povrchová voda. Čtverce byly následně zváženy a poté vysušeny do konstantní hmotnosti ve vakuové sušárně. Nakonec se vypočetlo množství vody v zbobtnalém stavu a výsledky se statisticky zpracovaly.

3.6 Měření uvolňování PTX do hydrogelů

Pro studium uvolňování PTX z PLA nanovláken do hydrogelů bylo nejprve vyraženo pět terčíků z listu PLA nanovláken o průměru 12,5 mm, které byly následně zváženy pro určení teoretického množství PTX. Z povrchu hydrogelu byla pomocí filtračního papíru odstraněna voda. Mezi dva plátky hydrogelu byly umístěny terčíky PLA. Hydrogely s terčíky byly vloženy do plastových sáčků a poté do vodní lázně v inkubátoru (Orbital Shaker-Incubator ES20, Biosan, Lotyšsko, Riga) při teplotě 37 °C po dobu 0,5, 2, 4 a 8 h. Při každém časovém úseku byly hydrogely vyměněny za nové. Schéma experimentu je znázorněno na obrázku 3.2. Po ukončení uvolňování PTX do hydrogelu byly terčíky umístěny do 10 cm³ methanolu a zbytkový PTX byl kvantitativně převeden do roztoku. Extrakce PTX do methanolu byla provedena v temperované třepačce (Orbital Shaker-Incubator ES20, Biosan, Lotyšsko, Riga) při teplotě 25 °C a při 140 ot/min po dobu 24 hodin. Tyto roztoky byly nejprve 10krát zředěny a následně v nich bylo stanoveno metodou HPLC-UV zbytkové množství PTX. Následně bylo vypočteno celkové uvolněné množství PTX do hydrogelu. Dále bylo sledováno kumulativní množství PTX, které se uvolní do jedné série hydrogelových plátků (bez postupné výměny hydrogelů). Všechna měření byla provedena v triplicátu. Výsledky byly následně statisticky zpracovány.



Obrázek 3.2: Schéma experimentu pro sledování postupného uvolňování PTX do hydrogelů.

3.7 Sorpce PTX do hydrogelů

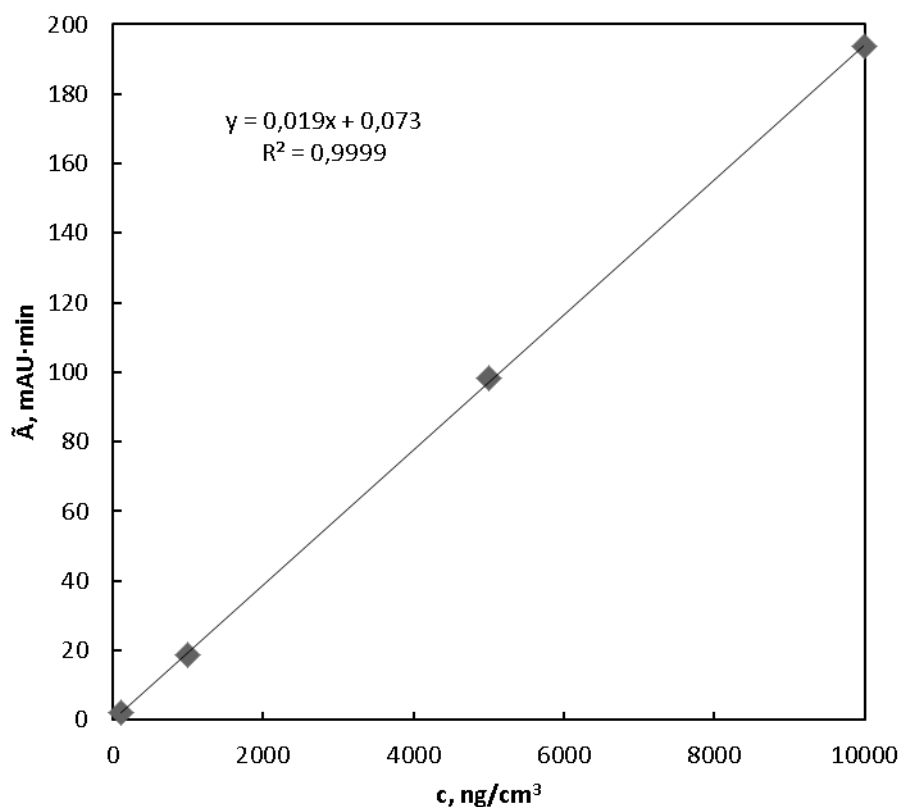
Pro studium sorpce PTX do hydrogelů byl vždy z hydrogelových placek vyražen terčík o průměru 12,5 mm, který byl následně zvážen. Z terčíku byla definovaným způsobem odstraněna povrchová voda, stejně jako při studiu uvolňování PTX do hydrogelů, a následně byl hydrogel vložen do roztoku PTX o koncentraci $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ připraveného v PBS s přídavkem 0,5 % Tween 80. Terčíky v roztoku byly umístěny v temperované třepačce (Orbital Shaker-Incubator ES20, Biosan, Lotyšsko, Riga) při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a při 140 ot/min a v daných časových úsecích 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480 a 1440 minut bylo z roztoku odebráno 80 mm^3 vzorku, ve kterém bylo následně stanoveno množství PTX HPLC-UV metodou. Po 24 hodinách byl terčík osušen a ponořen do 3 cm^3 methanolu po dobu 24 hodin. Nakonec bylo stanoveno množství PTX uvolněného do methanolu. Pro každý hydrogel bylo měření provedeno v triplikátu a výsledky byly následně statisticky zpracovány.

4 Výsledky

4.1 Kvantitativní hodnocení HPLC-UV analýz PTX

4.1.1 Kalibrační křivka v methanolu

Za separačních podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 3.2, byla proměřena kalibrační závislost ploch píků na koncentraci PTX v roztoku methanolu. Kalibrační závislost byla změřena pro čtyři koncentrace: 100, 1000, 5000 a 10000 ng/cm³. Na obrázku 4.1 je znázorněn graf kalibrační závislosti ploch píku na koncentraci PTX.



Obrázek 4.1: Kalibrační závislost PTX v methanolu vyhodnocena z plochy píku. Mobilní fáze: Acetonitril/voda (50/50, v/v) s průtokem 0,5 cm³/min.

Každý kalibrační bod byl změřen třikrát a výsledky byly statisticky zpracovány. Při statistickém zpracování byl zvolen koeficient spolehlivosti 0,95, neboli výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti 0,05. V tabulce 4,1 jsou statisticky zpracované plochy píků analyzovaného PTX.

Použitá metoda poskytuje lineární odezvu v celém uvedeném rozsahu koncentrací. Směrodatné odchylky byly v rozmezí od 0,49 do 1,55 %.

Tabulka 4.1: Statistické vyhodnocení kalibrační závislosti plochy píku PTX v methanolu, kde c je koncentrace PTX, \bar{A} střední hodnota plochy píku, s směrodatná odchylka, RSD relativní směrodatná odchylka a $L_{1,2}$ interval spolehlivosti ($n = 3$).

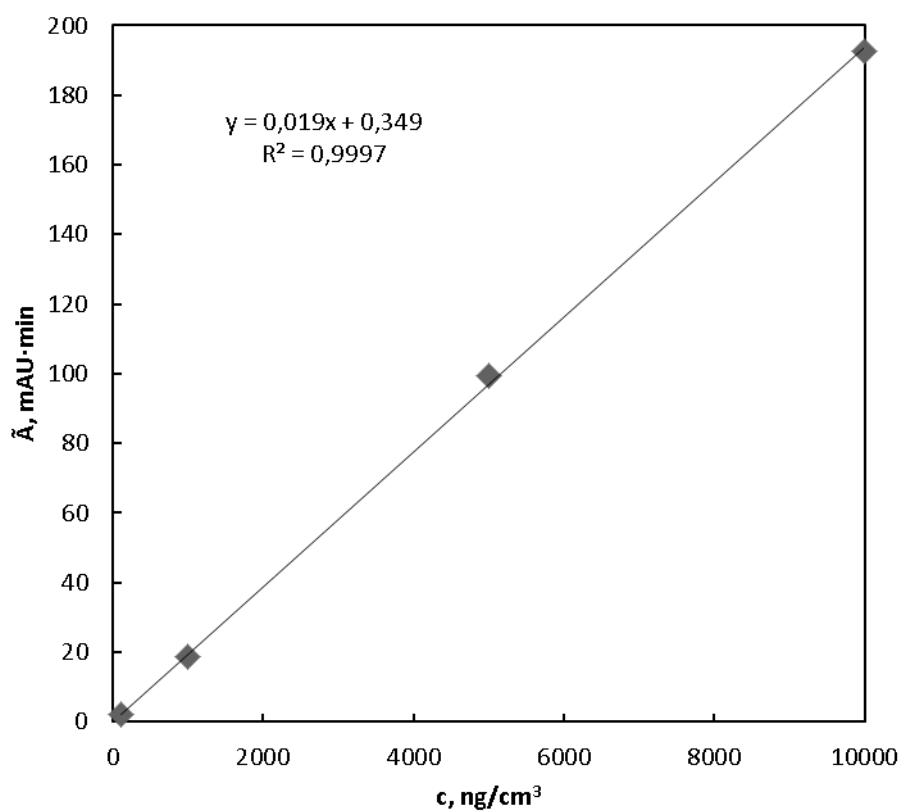
c (PTX)	\bar{A}	S	RSD	$L_{1,2}$
ng/cm ³	mAU·min	mAU·min	%	mAU·min
10000	193,60	0,95	0,49	1,24
5000	98,20	0,72	0,73	0,94
1000	18,90	0,20	1,06	0,26
100	1,97	0,03	1,55	0,04

4.1.2 Kalibrační křivka ve fosfátovém pufru

Dále za separačních podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 3.2, byla proměřena kalibrační závislost ploch píků na koncentraci PTX v roztoku PBS s 0,5% přídavkem detergentu Tween 80. Kalibrační závislost byla změřena pro čtyři koncentrace: 100, 1000, 5000 a 10000 ng/cm³. Na obrázku 4.2 je znázorněn graf kalibrační závislosti ploch píku na koncentraci PTX.

Každý kalibrační bod byl změřen třikrát a výsledky byly statisticky zpracovány. Při statistickém zpracování byl zvolen koeficient spolehlivosti 0,95, neboli výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti 0,05. V tabulce 4.2 jsou statisticky zpracované plochy píků analyzovaného PTX.

Použitá metoda poskytuje lineární odezvu v celém uvedeném rozsahu koncentrací. Směrodatné odchylky byly v rozmezí od 0,48 do 1,99 %.



Obrázek 4.2: Kalibrační závislost PTX v PBS s detergentem Tween 80 vyhodnocena z plochy píku. Mobilní fáze: Acetonitril/voda (50/50, v/v) s průtokem 0,5 cm³/min.

Tabulka 4.2: Statistické vyhodnocení kalibrační závislosti plochy píku PTX v PBS s 0,5 % přídavkem Tween 80, kde c je koncentrace PTX, \bar{A} střední hodnota plochy píku, s_r směrodatná odchylka, RSD relativní směrodatná odchylka a $L_{1,2}$ interval spolehlivosti ($n = 3$).

c (PTX)	\bar{A}	s_r	RSD	$L_{1,2}$
ng/cm ³	mAU·min	mAU·min	%	mAU·min
10000	192,63	1,16	0,60	1,51
5000	99,37	0,48	0,48	0,62
1000	18,75	0,35	1,87	0,46
100	1,99	0,04	1,99	0,05

4.2 Stanovení celkového množství PTX v PLA vláknech

Množství uvolněného PTX z různých druhů PLA nanovláken jsou uvedena v tabulce 4.3. Tímto experimentem bylo potvrzeno, že množství PTX přidané do polymerizační směsi, pro přípravu PLA nanovláken, bylo úspěšně inkorporováno do vlákněné struktury. Celková množství PTX v PLA nanovlákněch získaná v těchto experimentech byla použita pro výpočet teoretického množství PTX v dalších měřeních sledujících uvolňování PTX z PLA nanovláken.

Pro každá PLA nanovlákná byla provedena tři měření a výsledky byly statisticky zpracovány. Při statistickém zpracování byl zvolen koeficient spolehlivosti 0,95, neboli výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti 0,05.

Tabulka 4.3: Skutečné množství PTX v PLA nanovlákenech obsahujících 10 hmot. % PTX, 15 hmot % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a 13,3 hmot. % CD (n = 3).

Typ vláken	Teoretické	Množství	Množství	Množství
	množství PTX	PTX po 1 h	PTX po 2 h	PTX po 24 h
	%	%	%	%
PLA-PTX(10)	10	9,38 ± 0,03	9,76 ± 0,08	10,49 ± 0,05
PLA-PTX(10)-PEG(20)	10	9,16 ± 0,05	9,54 ± 0,05	10,05 ± 0,03
PLA-PTX(10)-CD	10	10,16 ± 0,05	10,19 ± 0,07	10,31 ± 0,03

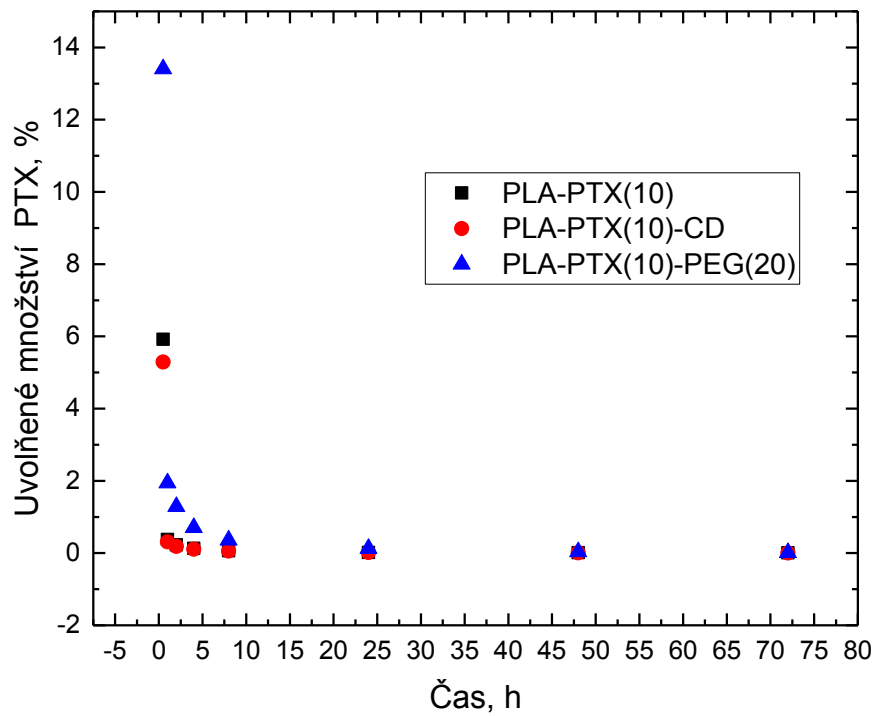
4.3 Extrakce PTX z nanovláken do PBS v režimu postupné výměny pufry

Z vypočtených rychlostí uvolňování, které jsou uvedeny v tabulce 4.4, je patrné, že z nanovláken obsahující PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa bylo uvolněno významně vyšší množství PTX a také dochází k prodlužování doby uvolňování léčiva v porovnání s nanovláknem obsahující pouze 10 hmot. % PTX. Nanovlákná, která obsahovala 13,3 hmot. % CD, vykazovala obdobnou rychlost uvolňování PTX jako nanovlákná, která obsahují pouze 10 hmot. % PTX. Je zřejmé, že přítomnost CD nemá vliv na uvolňování PTX do PBS.

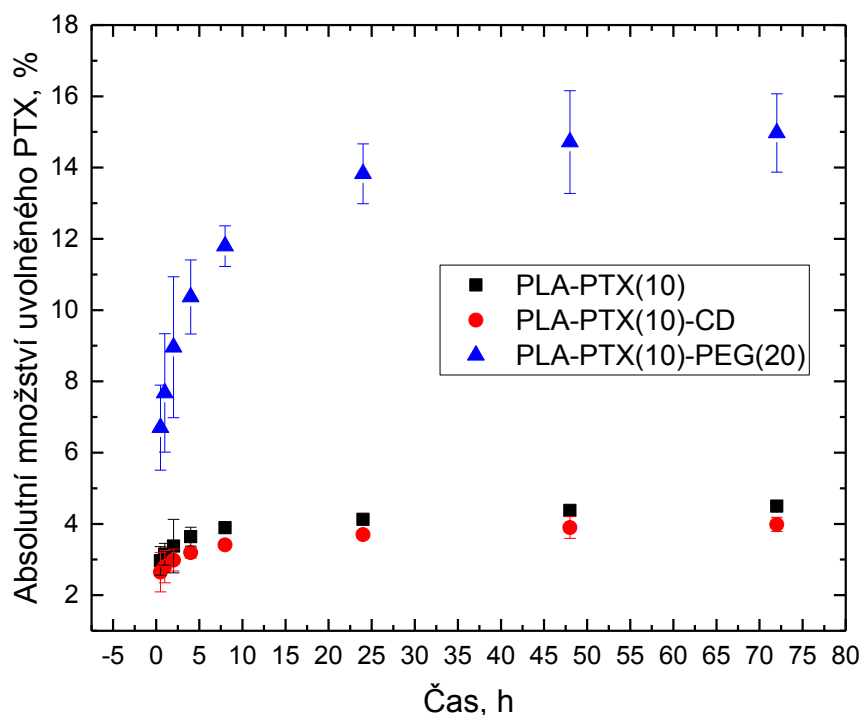
Tabulka 4.4: Porovnání kinetiky uvolňování PTX z PLA nanovláken obsahujících 10 hmot. % PTX, 15 hmot % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a 13,3 hmot. % CD do PBS.

Doba uvolňování	Rychlost uvolňování PTX		
	ng/h		
	h	PLA-PTX(10)	PLA-PTX(10)-CD
0-0,5	11251	17886	120656
0,5-1	717	1042	17480
1-2	432	627	11557
2-4	252	356	6350
4-8	118	181	3209
8-24	28	62	1142
24-48	20	28	334
48-72	9	12	95

Dále byla určena množství PTX uvolněného v jednotlivých krocích, která jsou zobrazena na obrázku 4.3, a absolutní množství uvolněného PTX, znázorněná na obrázku 4.4. Z kinetických profilů je zřejmé, že dochází nejprve k počátečnímu rychlému uvolňování PTX, které bylo následně nahrazeno jeho konstantním pomalým uvolňováním. U PLA vláken obsahujících PEG lze pozorovat vyšší uvolňování PTX oproti ostatním typům nanovláken. Tento účinek je možné vysvětlit vymýváním PEG z nanovláken, čímž dojde k zvýšení plochy mezi vlákny a okolním médiem.



Obrázek 4.3: Množství uvolněného PTX v jednotlivých časových úsecích do PBS s 0,5 % Tween 80 v režimu postupné výměny pufru z PLA nanovláken obsahujících 10 hmot. % PTX, 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a 13,3 hmot. % CD měřené pomocí HPLC-UV.



Obrázek 4.4: Absolutní množství uvolněného PTX do PBS s 0,5 % Tween 80 v režimu postupné výměny pufru z PLA nanovláken obsahujících 10 hmot. % PTX, 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a 13,3 hmot. % CD měřené pomocí HPLC-UV. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ($n = 3$).

4.4 Měření uvolňování PTX do hydrogelů

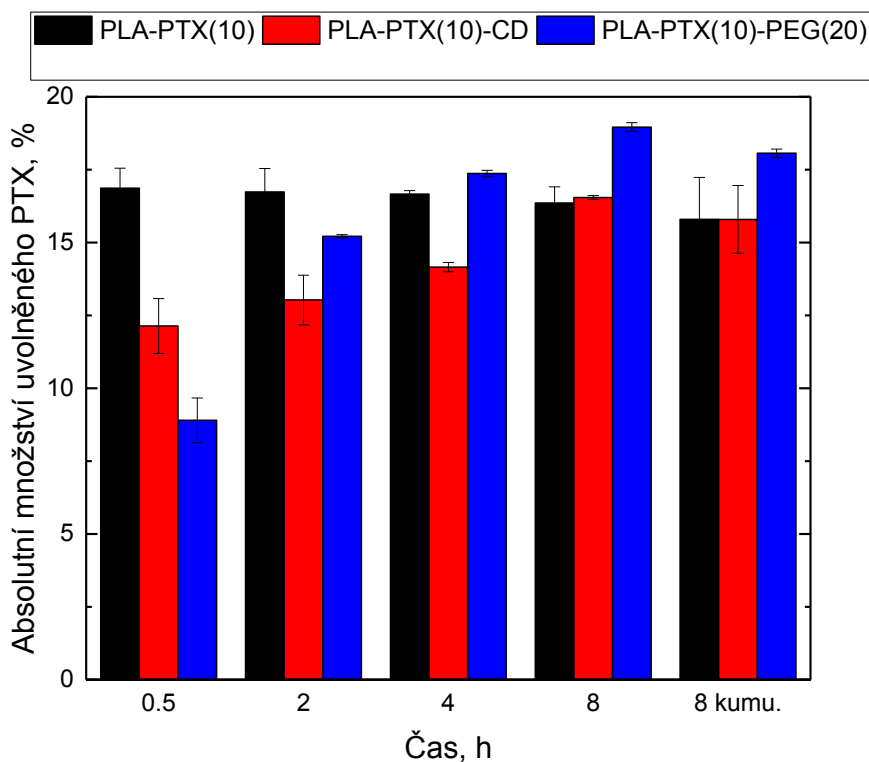
Po experimentech orientovaných na stanovení celkového množství PTX a na sledování uvolňování PTX do PBS byla dále sledována kinetika uvolňování PTX z PLA nanovláken do hydrogelů na bázi HEMA.

Důvodem sledování kinetiky uvolňování PTX z vláknenných nosičů do hydrogelů byla snaha přiblížit podmínky reálnému prostředí organismu. Na rozdíl od kapalných medií, které byly použity v předchozích experimentech, byla snaha potlačit vliv látkové konvekce vodního média, které se nalézá v okolí nanovláknenných nosičů při třepání.

4.4.1 HEMA

Nejprve byla sledována kinetika uvolňování PTX z PLA nanovláken do HEMA hydrogelů, připravených s přidavkem 0,5 hmot. % EDMA. Ještě před měření profilů uvolňování PTX bylo stanoveno množství vodné složky v rovnovážném zbotnalém stavu hydrogelu. Bylo zjištěno, že HEMA hydrogel obsahuje ve své struktuře $37,45 \pm 0,26$ % vody. Získané profily uvolňování PTX do HEMA hydrogelu v režimu postupné výměny i kumulativním módu jsou znázorněny na obrázku 4.5.

Z PLA nanovláken, které obsahují pouze 10 hmot. % PTX došlo během první půl hodiny k rychlému uvolnění PTX. V dalších časových úsecích nebylo pozorováno další uvolňování PTX z nanovláken. Oproti tomu u PLA nanovláken obsahujících PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a CD docházelo ke kontinuálnímu uvolňování PTX.



Obrázek 4.5: Porovnání uvolňování PTX z PLA nanovláken obsahujících 10 hmot. % PTX, 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a 13,3 hmot. % CD do HEMA hydrogelů s postupnou výměnou medií a kumulativním módu. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ($n = 3$).

Přítomnost PEG zároveň zvýšila celkové množství uvolněného PTX oproti vláknům obsahujících pouze PTX. U PLA nanovláken obsahujících CD bylo celkové uvolněné množství obdobné jako u vláken pouze s PTX. Z profilů uvolňování je zřejmé rychlé počáteční uvolňování PTX, které je pravděpodobně způsobeno jeho difuzí do vodného média, které vyplňuje prostory mezi vlákny, a následně do hydrogelové matrice.

Srovnáním celkového uvolněného množství PTX z vláken mezi experimenty s postupnou výměnnou hydrogelů a kumulativním módem je patrné, že u experimentů s postupnou výměnou bylo dosaženo mírně vyššího uvolnění léčiva z PLA nanovláken.

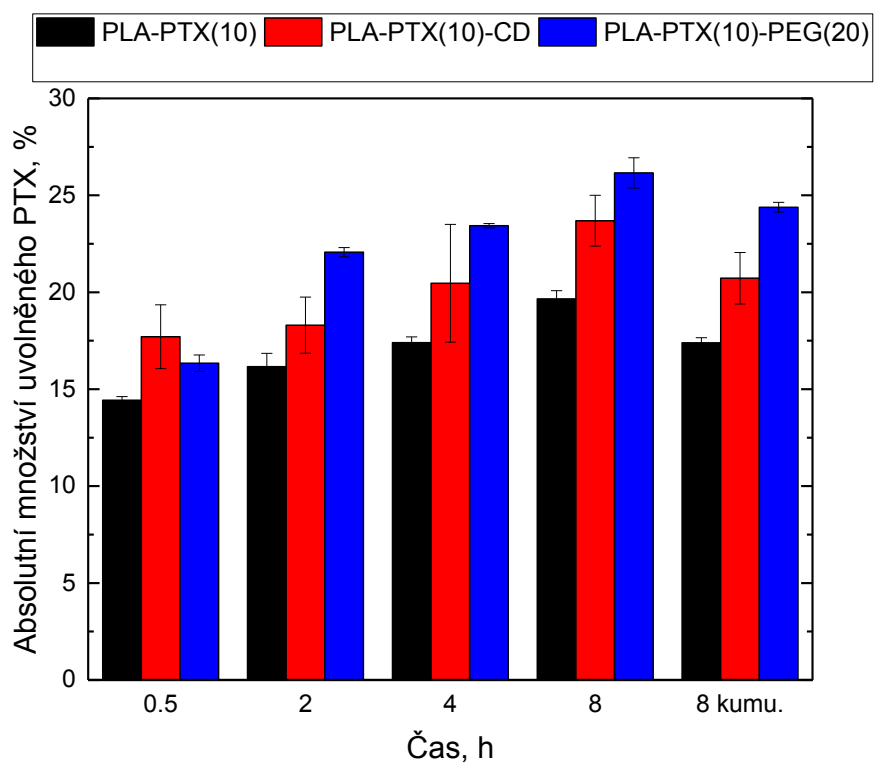
4.4.2 HEMA-MA

Druhým hydrogelem použitým ke sledování kinetiky uvolňování PTX z PLA nanovláken byl kopolymer HEMA-MA, který obsahuje 1 hmot. % MA a 0,5 hmot. % zesilovacího činidla EDMA. Ještě před měření profilů uvolňování PTX bylo stanoveno množství vodné složky v rovnovážném zotnalém stavu hydrogelu. Bylo zjištěno, že HEMA-MA hydrogel obsahuje ve své struktuře $44,05 \pm 0,56$ % vody. Získané profily uvolňování PTX do HEMA-MA hydrogelu jsou znázorněny na obrázku 4.6.

U PLA vláken obsahujících PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a obsahujících CD můžeme z profilu uvolňování PTX pozorovat podobný průběh jako při uvolňování PTX do HEMA. U PLA nanovláken obsahujících pouze 10 hmot. % PTX můžeme také pozorovat kontinuální uvolňování PTX po celý průběh experimentu.

Použitím HEMA-MA oproti HEMA se z PLA nanovláken uvolnilo výrazně více PTX jak je patrné u všech druhů PLA vláken.

Srovnáním celkového uvolněného množství PTX z vláken mezi experimenty s postupnou výměnnou hydrogelů a kumulativním módem se opět potvrdilo, že u experimentů s postupnou výměnou bylo dosaženo vyššího uvolnění léčiva.



Obrázek 4.6: Porovnání uvolňování PTX z PLA nanovláken obsahujících 10 hmot. % PTX, 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a 13,3 hmot. % CD do HEMA-MA kopolymerních hydrogelů s postupnou výměnou médií. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ($n = 3$).

4.5 Sorpce PTX do hydrogelů

Nakonec byla studována možnost použití hydrogelů jako nosiče léčiv pro jejich lokální aplikace. Hodnoty celkové sorpční kapacity hydrogelů a následného uvolněného množství PTX jsou uvedeny v tabulce 4.5. Profily sorpce PTX do jednotlivých hydrogelů jsou znázorněny na obrázku 4.7–4.9. Pro snadnější porovnávání vlivu složení hydrogelu byly hodnoty vztaženy na hmotnost zbotnalého hydrogelu.

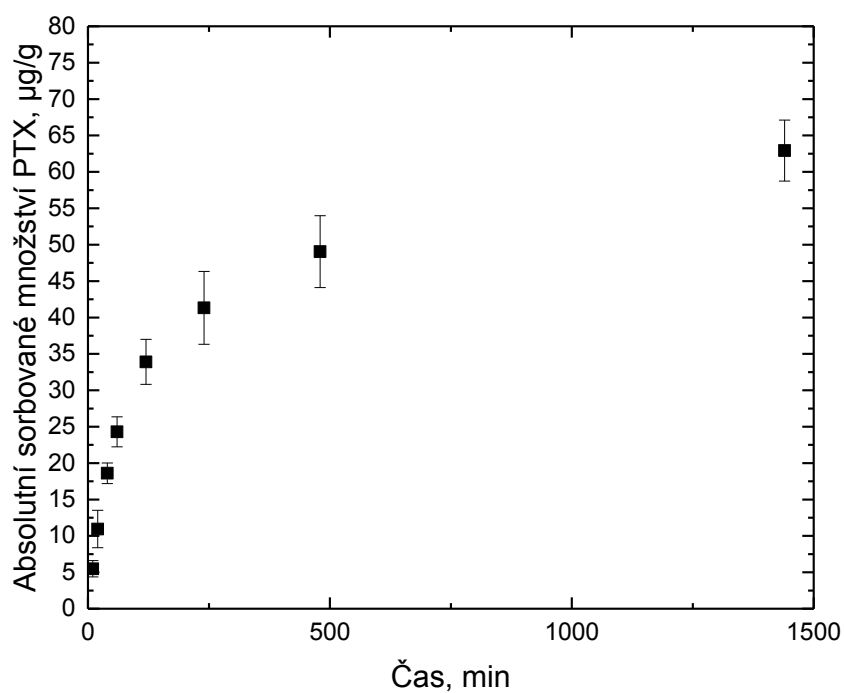
Každý experiment byl proveden třikrát a výsledky byly statisticky zpracovány. Při statistickém zpracování byl zvolen koeficient spolehlivosti 0,95, neboli výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti 0,05.

U hydrogelů obsahujících EDMA v různém hmotnostním zastoupení nebyly pozorovány významné rozdíly jak v průběhu sorpce PTX, tak i v následném uvolněném množství PTX. Z profilu sorpce PTX do kopolymerního hydrogelu HEMA-MA je zřejmé, že dochází k počáteční rychlé sorpci PTX do hydrogelu, a tento typ hydrogelu vykazuje pro PTX také mírně vyšší sorpční kapacitu.

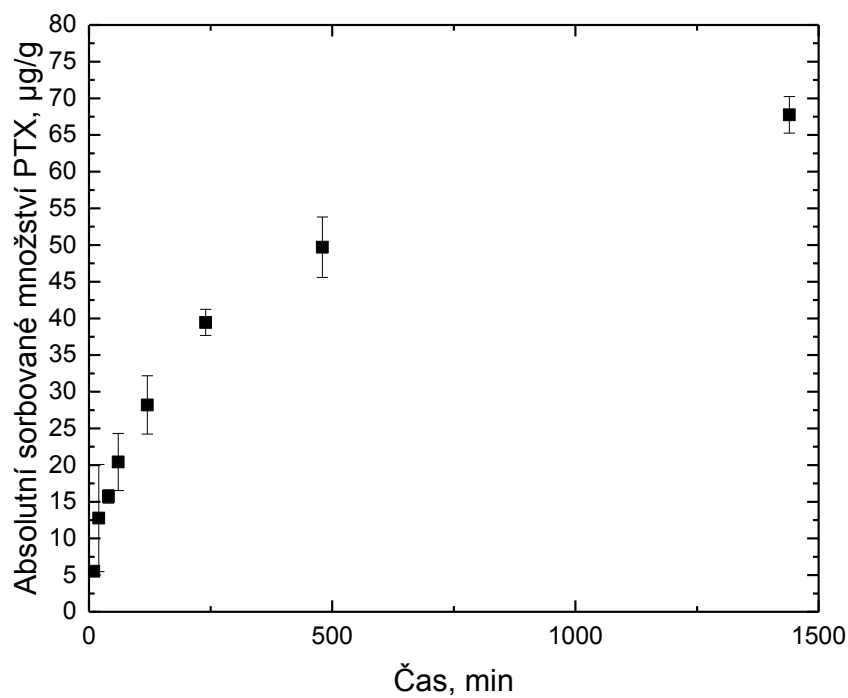
Jak je patrné z tabulky 4.5, tak při desorpci PTX do methanolu se u všech hydrogelů nepodařilo uvolnit přibližně 20 µg PTX na jeden gram zbotnalého hydrogelu. Paklitaxel se s největší pravděpodobností částečně ireverzibilně váže ve struktuře hydrogelu.

Tabulka 4.5: Porovnání hodnot sorpčních kapacit PTX a následné uvolněné množství PTX různých typů hydrogelů vztažené na hmotnost zbotnalého hydrogelu. (n = 3)

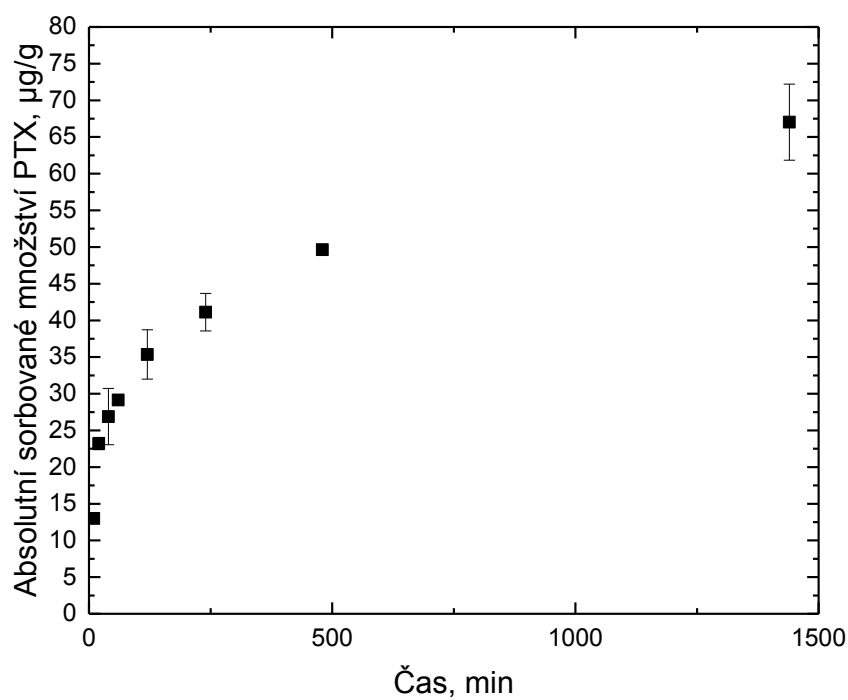
Typ hydrogelu	Sorpční kapacita	Uvolněné množství PTX
	µg/g	µg/g
HEMA-EDMA(0,3%)	62,93 ± 3,14	41,90 ± 2,50
HEMA-EDMA(0,7%)	67,74 ± 2,98	42,57 ± 2,00
HEMA-EDMA(0,9%)	67,03 ± 4,13	39,87 ± 2,87
HEMA-EDMA(0,5%)-MA(1%)	71,77 ± 2,67	54,89 ± 5,51



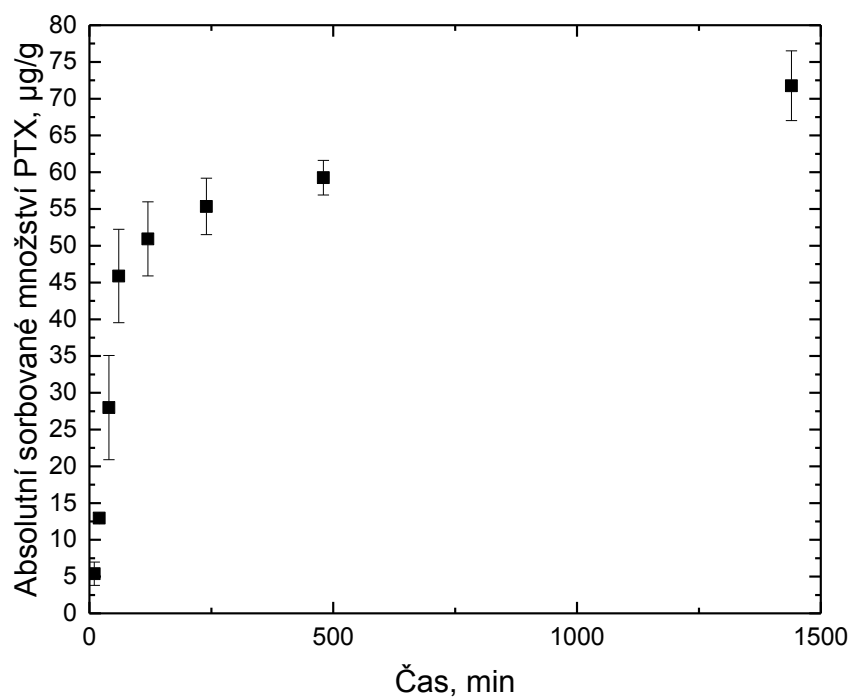
Obrázek 4.7: Sorbované množství PTX do terčíku HEMA s 0,3 hmot. % zesíťovacího činidla EDMA z roztoku PTX o koncentraci $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ připraveného v PBS s přidavkem 0,5 % Tween 80 vztažené na hmotnost zbotnalého hydrogelu. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ($n = 3$).



Obrázek 4.8: Sorbované množství PTX do terčíku HEMA s 0,7 hmot. % zesíťovacího činidla EDMA z roztoku PTX o koncentraci $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ připraveného v PBS s přidavkem 0,5 % Tween 80 vztažené na hmotnost zbotnalého hydrogelu. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ($n = 3$).



Obrázek 4.9: Sorbované množství PTX do terčíku HEMA s 0,9 hmot. % zesilovacího činidla EDMA z roztoku PTX o koncentraci $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ připraveného v PBS s přidavkem 0,5 % Tween 80 vztažené na hmotnost zbotnalého hydrogelu. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ($n = 3$).



Obrázek 4.9: Sorbované množství PTX do terčíku HEMA-MA kopolymerního hydrogelu z roztoku PTX o koncentraci $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ připraveného v PBS s přidavkem 0,5 % Tween 80 vztažené na hmotnost zbotnalého hydrogelu. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ($n = 3$).

5 Závěr

V této diplomové práci bylo studováno použití hydrogelů na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu pro sledování uvolňování hydrofobního léčiva paklitaxelu, který byl inkorporován v nanovákenném materiálu založeném na polylaktidu. Pro stanovení PTX byla použita HPLC metoda s UV detekcí při 227 nm. Separace byla provedena za pomoci kolony Astentic Express C18 a jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril/voda (50/50, v/v). Pro experimenty byly použity tři druhy PLA nanovláken s 10 hmot. % PTX, a to PLA nanovlákná obsahující pouze 10 hmot. % PTX, PLA nanovlákná obsahující 10 hmot. % PTX s 15 hmot. % přídavkem PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a PLA nanovlákná obsahující 10 hmot. % PTX s 13,3 hmot. % přídavkem CD.

Nejprve bylo sledováno uvolňování PTX z PLA nanovláken do PBS s 0,5% přídavkem Tween 80. Vlákna, která obsahovala PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa, uvolnila výrazně větší množství PTX a vykazovala delší dobu uvolňování léčiva.

Studium kinetiky uvolňování PTX do hydrogelů, bylo provedeno na dvou typech hydrogelových matric založených na HEMA. Z výsledků je patrný rozdíl mezi uvolňování PTX do PBS a do hydrogelových matric. Tudiž na uvolňování PTX z PLA nanovláken nemá vliv jenom případná modifikace vláken samotných, ale důležitou roli hraje i typ prostředí. Správnou volbou hydrogelu lze dobře simulovat *in vivo* prostředí. Také lze konstatovat, že nanovlákná, která byla modifikována pomocí PEG, uvolňují výrazně vyšší množství hydrofobního léčiva. Tento trend je zřejmý jak u experimentů sledující uvolňování PTX do PBS tak i do hydrogelových matric. Vliv přídavku CD na uvolňování PTX byl zřejmý pouze u sledování kinetiky uvolňování PTX do hydrogelových matric, kde docházelo k většímu uvolňování PTX z těchto vláken.

Nakonec bylo studováno použití hydrogelu jako nosiče léčiv pro případné lokální aplikace. Byla sledována sorpce PTX z roztoku PBS s 0,5% přídavkem detergentu Tween 80 do čtyř druhů hydrogelů. Tři z nich byly hydrogely HEMA s různým obsahem EDMA a čtvrtý byl kopolymerní hydrogel HEMA-MA. Vyšší sorpční kapacitu pro PTX vykazoval kopolymerní hydrogel, sorpční kapacita hydrogelů HEMA-EDMA byla srovnatelná.

6 Literatura

- [1] HABIB, M, M AKTER, M ALAM, Z KARIM a M JOADER. Hydrogel: a noble approach to healthcare. *Int. J. Innovat. Pharmaceut. Sci. Res.* 2015, **3**(72), 1372-1388.
- [2] ASWATHY, S.H., U. NARENDRAKUMAR a I. MANJUBALA. Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon*. 2020, **6**(4). DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03719.
- [3] ULLAH, Faheem, Muhammad Bisyrul Hafi OTHMAN, Fatima JAVED, Zulkifli AHMAD a Hazizan Md. AKIL. Classification, processing and application of hydrogels: *A review. Materials Science and Engineering: C.* 2015, **57**, 414-433. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.053.
- [4] ROSIAK, J.M., P. ULAŃSKI a A. RZEŹNICKI. Hydrogels for biomedical purposes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 1995, **105**(1-4), 335-339. DOI: 10.1016/0168-583X(95)00550-1.
- [5] HOLBACK, H., Y. YEO a K. PARK. Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications. *Biomedical Hydrogels.*, 2011, **2011**, 3-24. DOI: 10.1533/9780857091383.1.3.
- [6] GIBAS, I a H JANIK. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. *Chemistry and Chemical Technology.* 2010, **4**(4), 297 - 304. DOI: <http://ena.lp.edu.ua:8080/handle/ntb/8079>
- [7] OKAY, O. General Properties of Hydrogels. GERLACH, Gerald a Karl-Friedrich ARNDT, ed. *Hydrogel Sensors and Actuators.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 1-14. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. DOI: 10.1007/978-3-540-75645-3_1.
- [8] EL-SHERBINY, Ibrahim M. a Magdi H. YACOUB. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice.* 2013, **2013**(3). DOI: 10.5339/gcsp.2013.38.

- [9] SINGH, Manju Rawat, Satish PATEL a Deependra SINGH. Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering. *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*. Elsevier, 2016, **2016**, 231-260. DOI: 10.1016/B978-0-323-42865-1.00009-X.
- [10] CROISIER, Florence a Christine JÉRÔME. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013, **49**(4), 780-792. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
- [11] LEE, Jung-Hwan a Hae-Won KIM. Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*. 2018, **9**. DOI: 10.1177/2041731418768285.
- [12] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2015, **6**(2), 105-121. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [13] BASU, Poulami, U. NARENDRA KUMAR a I. MANJUBALA. Wound Healing Materials - A Perspective for Skin Tissue Engineering. *Current Science*. 2017, **112**(12), 2392-2404. DOI: 10.18520/cs/v112/i12/2392-2404.
- [14] WHITNEY, JoAnne D. Overview: Acute and Chronic Wounds. *Nursing Clinics of North America*. 2005, **40**(2), 191-205. DOI: 10.1016/j.cnur.2004.09.002.
- [15] LIU, He, Chenyu WANG, Chen LI, Yanguo QIN, Zhonghan WANG, Fan YANG, Zuhao LI a Jincheng WANG. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Advances*. 2018, **8**(14), 7533-7549. DOI: 10.1039/C7RA13510F.
- [16] CATANZANO, O., V. D'ESPOSITO, S. ACIERNO, et al. Alginate-hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process. *Carbohydrate Polymers*. 2015, **131**, 407-414. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.05.081.
- [17] PAPAKONSTANTINO, Eleni, Michael ROTH a George KARAKIULAKIS. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*. 2014, **4**(3), 253-258. DOI: 10.4161/derm.21923.

- [18] VERDIER-SÉVRAIN, Sylvie a Frédéric BONTÉ. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2007, **6**(2), 75-82. DOI: 10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x.
- [19] BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology*. 2007, **211**(2), 241-251. DOI: 10.1002/path.2098.
- [20] PARENTE, M. E., A. OCHOA ANDRADE, G. ARES, F. RUSSO a Á. JIMÉNEZ-KAIRUZ. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science*. 2015, **37**(5), 511-518. DOI: 10.1111/ics.12227.
- [21] FARANDOS, Nicholas M., Ali K. YETISEN, Michael J. MONTEIRO, Christopher R. LOWE a Seok Hyun YUN. Contact Lens Sensors in Ocular Diagnostics. *Advanced Healthcare Materials*. 2015, **4**(6), 792-810. DOI: 10.1002/adhm.201400504.
- [22] GEIGES, Hansjörg. A brief history of contact geometry and topology. *Expositiones Mathematicae*. 2001, **19**(1), 25-53. DOI: 10.1016/S0723-0869(01)80014-1
- [23] WICHTERLE, O., LÍM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*. 1960, **185**, 117–118. DOI: 10.1038/185117a0
- [24] LIU, Wanyun, Junchao WEI a Yiwang CHEN. Electrospun poly(l - lactide) nanofibers loaded with paclitaxel and water-soluble fullerenes for drug delivery and bioimaging. *New J. Chem*. 2014, **38**(12), 6223-6229. DOI: 10.1039/C4NJ01259C.
- [25] MUSGRAVE, Christopher Stephen Andrew a Fengzhou FANG. Contact Lens Materials: A Materials Science Perspective. *Materials*. 2019, **12**(2). DOI: 10.3390/ma12020261.
- [26] MUNČAN, Jelena, Ivana MILEUSNIĆ, Jovana ŠAKOTA ROSIĆ, Aleksandra VASIĆ-MILOVANOVIĆ a Lidija MATIJA. Water Properties of Soft Contact Lenses: A Comparative Near-Infrared Study of Two Hydrogel Materials. *International Journal of Polymer Science*. 2016, **2016**, 1-8. DOI: 10.1155/2016/3737916.

[27] NICOLSON, Paul C. a Jürgen VOGT. Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials*. 2001, **22**(24), 3273-3283 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00165-X.

[28] MCMAHON, Timothy T. a Karla ZADNIK. Twenty-five Years of Contact Lenses. *Cornea*. 2000, **19**(5), 730-740. DOI: 10.1097/00003226-200009000-00018.

[29] CALÓ, Enrica a Vitaliy V. KHUTORYANSKIY. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 2015, **65**, 252-267. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024. ISSN 00143057.

Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305714004091>.

[30] TIWARI, Gaurav, Ruchi TIWARI, SaurabhK BANNERJEE, L BHATI, S PANDEY, P PANDEY a Birendra SRIWASTAWA. Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2012, **2**(1). DOI: 10.4103/2230-973X.96920.

[31] SANDEEP, C., HARIKUMAR SL and KANUPRIYA. Hydrogels: A smart drug delivery system. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*. 2012, **2**(3), 603-614

[32] NARAYANASWAMY, Radhika a Vladimir P. TORCHILIN. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery. *Molecules*. 2019, **24**(3). DOI: 10.3390/molecules24030603.

[33] MISHRA B, UPADHYAY M, REDDY ADENA SK, VASANT BG and MUTHU MS. Hydrogels: An Introduction to a Controlled Drug Delivery Device, Synthesis and Application in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Austin J Biomed Eng*. 2017; **4**(1): 1037

[34] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008, **49**(8), 1993-2007. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027.

- [35] LARRAÑETA, Eneko, Sarah STEWART, Michael ERVINE, Rehan AL-KASASBEH a Ryan DONNELLY. Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018, **9**(1). DOI: 10.3390/jfb9010013.
- [36] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, **14**(3), 88-95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [37] CASCONE, Sara a Gaetano LAMBERTI. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020, **573**. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118803.
- [38] CHAN, B. P. a K. W. LEONG. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 2008, **17**(S4), 467-479. DOI: 10.1007/s00586-008-0745-3.
- [39] AL-SABAH, Ayesha, Stephanie E.A. BURNELL, Irina N. SIMOES, Zita JESSOP, Nafiseh BADIEI, Emma BLAIN a Iain S. WHITAKER. Structural and mechanical characterization of crosslinked and sterilised nanocellulose-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. 2019, **212**, 242-251. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.02.057.
- [40] BURDICK, Jason A. a Kristi S. ANSETH. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2002, **23**(22), 4315-4323. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00176-X.
- [41] JEONG, Su-Yeong, Ji-Hyun LEE, Yoojin SHIN, Seok CHUNG, Hyo-Jeong KUH a Jung Weon LEE. Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment. *PLOS ONE*. 2016, **11**(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0159013.
- [42] BENTON, Gabriel, Irina ARNAOUTOVA, Jay GEORGE, Hynda K. KLEINMAN a Jennifer KOBLINSKI. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, **79-80**, 3-18. DOI: 10.1016/j.addr.2014.06.005.

[43] LIU, Jing, Youhua TAN, Huafeng ZHANG, et al. Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nature Materials*. 2012, **11**(8), 734-741. DOI: 10.1038/nmat3361.

[44] BOJ, Sylvia F., Chang-Il HWANG, Lindsey A. BAKER, et al. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell*. 2015, **160**(1-2), 324-338. DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.021.

[45] YEUNG, Trevor M., Shaan C. GANDHI, Jennifer L. WILDING, Ruth MUSCHEL a Walter F. BODMER. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, **107**(8), 3722-3727. DOI: 10.1073/pnas.0915135107.

[46] DEROSE, Yoko S, Guoying WANG, Yi-Chun LIN, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nature Medicine*. 2011, **17**(11), 1514-1520. DOI: 10.1038/nm.2454.

[47] LI, Wei, Samuel LEE, Minglin MA, et al. Microbead-based biomimetic synthetic neighbors enhance survival and function of rat pancreatic β -cells. *Scientific Reports*. 2013, **3**(1). DOI: 10.1038/srep02863.

[48] PROVENZANO, Paolo P, Kevin W ELICEIRI, Jay M CAMPBELL, David R INMAN, John G WHITE a Patricia J KEELY. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*. 2006, **4**(1). DOI: 10.1186/1741-7015-4-38.

[49] CLEVERS, Hans. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 2016, **165**(7), 1586-1597. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.082.

[50] GJOREVSKI, Nikolce, Norman SACHS, Andrea MANFRIN, Sonja GIGER, Maiia E. BRAGINA, Paloma ORDÓÑEZ-MORÁN, Hans CLEVERS a Matthias P. LUTOLF. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*. 2016, **539**(7630), 560-564. DOI: 10.1038/nature20168.

[51] BLAKNEY, Anna K., Adam B. LITTLE, Yonghou JIANG a Kim A. WOODROW. In vitro–ex vivo correlations between a cell-laden hydrogel and mucosal tissue for screening composite delivery systems. *Drug Delivery*. 2017, **24**(1), 582-590. DOI: 10.1080/10717544.2016.1242178.

[52] LIANG, Songmiao, Jian XU, Lihui WENG, Hongjun DAI, Xiaoli ZHANG a Lina ZHANG. Protein diffusion in agarose hydrogel in situ measured by improved refractive index method. *Journal of Controlled Release*. 2006, **115**(2), 189-196. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.08.006.

[53] MCCABE, M. The diffusion coefficient of caffeine through agar gels containing a hyaluronic acid–protein complex. A model system for the study of the permeability of connective tissues. *Biochemical Journal*. 1972, **127**(1), 249-253. DOI: 10.1042/bj1270249.

[54] BEVERNAGE, Jan, Joachim BROUWERS, Marcus E. BREWSTER a Patrick AUGUSTIJNS. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, **453**(1), 25-35. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.026.

[55] LIU, Peng, Odile DE WULF, Johanna LARU, et al. Dissolution Studies of Poorly Soluble Drug Nanosuspensions in Non-sink Conditions. *AAPS PharmSciTech*. 2013, **14**(2), 748-756. DOI: 10.1208/s12249-013-9960-2.

[56] SHEIKH, Zeeshan, Shariq NAJEEB, Zohaib KHURSHID, Vivek VERMA, Haroon RASHID a Michael GLOGAUER. *Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications*. *Materials*. 2015, **8**(9), 5744-5794. DOI: 10.3390/ma8095273.

[57] VROMAN, Isabelle a Lan TIGHZERT. Biodegradable Polymers. *Materials*. 2009, **2**(2), 307-344. DOI: 10.3390/ma2020307.

[58] LIANG, Hanxue, Lixin LYU a Muhammad WAHAB. A 382-year reconstruction of August mean minimum temperature from tree-ring maximum latewood density on the southeastern Tibetan Plateau, China. *Dendrochronologia*. 2016, **37**, 1-8. DOI: 10.1016/j.dendro.2015.11.001.

[59] KAMALY, Nazila, Zeyu XIAO, Pedro M. VALENCIA, Aleksandar F. RADOVIC-MORENO a Omid C. FAROKHZAD. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*. 2012, **41**(7). DOI: 10.1039/c2cs15344k.

[60] ANDERSON, James M. a Matthew S. SHIVE. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, **64**, 72-82. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.004.

[61] PAGELS, Robert F. a Robert K. PRUD'HOMME. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 2015, **219**, 519-535. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.001.

[62] DANHIER, Fabienne, Eduardo ANSORENA, Joana M. SILVA, Régis COCO, Aude LE BRETON a Véronique PRÉAT. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012, **161**(2), 505-522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.

[63] MITRAGOTRI, Samir, Paul A. BURKE a Robert LANGER. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014, **13**(9), 655-672. DOI: 10.1038/nrd4363.

[64] COELHO, Jorge F., Paula C. FERREIRA, Patricia ALVES, Rosemeyer CORDEIRO, Ana C. FONSECA, Joana R. GÓIS a Maria H. GIL. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*. 2010, **1**(1), 164-209. DOI: 10.1007/s13167-010-0001-x.

[65] XING, Jie, Dianrui ZHANG a Tianwei TAN. Studies on the oridonin-loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007, **40**(2), 153-158. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.07.001.

[66] SAH, Edel a Hongkee SAH. Recent Trends in Preparation of Poly(lactide- co -glycolide) Nanoparticles by Mixing Polymeric Organic Solution

with Antisolvent. *Journal of Nanomaterials*. 2015, **2015**, 1-22. DOI: 10.1155/2015/794601.

[67] TAKEUCHI, Hirofumi, Hiromitsu YAMAMOTO a Yoshiaki KAWASHIMA. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, **47**(1), 39-54. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00120-4.

[68] HSU, Cheng-Hsuan, Zhengrong CUI, Russell J. MUMPER a Michael JAY. Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS PharmSciTech*. 2003, **4**(3), 24-35. DOI: 10.1208/pt040332.

[69] YANG, Xian-Zhu, Shuang DOU, Tian-Meng SUN, Cheng-Qiong MAO, Hong-Xia WANG a Jun WANG. Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2011, **156**(2), 203-211. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.035.

[70] GU, Guangzhi, Quanyin HU, Xingye FENG, et al. PEG-PLA nanoparticles modified with APTEDB peptide for enhanced anti-angiogenic and anti-glioma therapy. *Biomaterials*. 2014, **35**(28), 8215-8226. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.022.

[71] TYLER, Betty, David GULLOTTI, Antonella MANGRAVITI, Tadanobu UTSUKI a Henry BREM. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **107**, 163-175. DOI: 10.1016/j.addr.2016.06.018.

[72] JAIN, Darshana S., Rajani B. ATHAWALE, Amrita N. BAJAJ, Shruti S. SHRIKHANDE, Peeyush N. GOEL, Yuvraj NIKAM a Rajiv P. GUDE. Poly lactic acid (PLA) nanoparticles sustain the cytotoxic action of temozolomide in C6 Glioma cells. *Biomedicine & Aging Pathology*. 2013, **3**(4), 201-208. DOI: 10.1016/j.biomag.2013.08.003.

[73] HRKACH, J., D. VON HOFF, M. M. ALI, et al. Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile. *Science Translational Medicine*.

2012, **4**(128), 128ra39-128ra39. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003651.

[74] VON HOFF, D. D., M. M. MITA, R. K. RAMANATHAN, et al. Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2016, **22**(13), 3157-3163. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2548.

[75] MICHAELIS, Martin, Josef MATOUSEK, Jens-Uwe VOGEL, et al. Bovine seminal ribonuclease attached to nanoparticles made of polylactic acid kills leukemia and lymphoma cell lines in vitro. *Anti-Cancer Drugs*. 2000, **11**(5), 369-376. DOI: 10.1097/00001813-200006000-00007.

[76] LV, Gang, Fang HE, Xuemei WANG, et al. Novel Nanocomposite of Nano Fe₃O₄ and Polylactide Nanofibers for Application in Drug Uptake and Induction of Cell Death of Leukemia Cancer Cells. *Langmuir*. 2008, **24**(5), 2151-2156. DOI: 10.1021/la702845s.

[77] YADAV, Khushwant S., Sheeba JACOB, Geetanjali SACHDEVA, Krishna CHUTTANI, Anil K. MISHRA a Krutika K. SAWANT. Long circulating PEGylated PLGA nanoparticles of cytarabine for targeting leukemia. *Journal of Microencapsulation*. 2011, **28**(8), 729-742. DOI: 10.3109/02652048.2011.615949.

[78] MONTIEL-EULEFI, E, F JARA, C TORO, M GARCÉS a P LEAL. Cytotoxic Effect of Double Emulsion (W/O/W) CuSO₄ Loaded PLA Nanoparticles on MKN-45 Gastric Adenocarcinoma Cell Line. *International Journal of Morphology*. 2014, **32**(1), 61-69. DOI: 10.4067/S0717-95022014000100011.

[79] CHO, Hyunah, Jieming GAO a Glen S. KWON. PEG- b -PLA micelles and PLGA-b -PEG- b -PLGA sol-gels for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016, **240**, 191-201. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.12.015.

[80] LEE, Keun Seok, Hyun Cheol CHUNG, Seock Ah IM, et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008, **108**(2), 241-250. DOI: 10.1007/s10549-007-9591-y.

[81] SHIN, Ho-Chul, Hyunah CHO, Tsz Chung LAI, Kevin R. KOZAK, Jill M. KOLESAR a Glen S. KWON. Pharmacokinetic study of 3-in-1 poly(ethylene glycol)-block-poly(D, L-lactic acid) micelles carrying paclitaxel, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, and rapamycin. *Journal of Controlled Release*. 2012, **163**(1), 93-99. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.04.024.

[82] WALSH, Mary C, Jeffrey A BANAS, Stanley P MUDZINSKI, Mark T PREISSLER, Robert F GRAZIANO a Edmund J GOSSELIN. A two-component modular approach for enhancing T-cell activation utilizing a unique anti-Fc γ RI-streptavidin construct and microspheres coated with biotinylated-antigen. *Biomolecular Engineering*. 2003, **20**(1), 21-33. DOI: 10.1016/S1389-0344(02)00089-8.

[83] CLIMENT, Núria, Séverine MUNIER, Núria PIQUÉ, et al. Loading dendritic cells with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses. *Vaccine*. 2014, **32**(47), 6266-6276. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.09.010.

[84] WHITAKER, Martin J., Jianyuan HAO, Owen R. DAVIES, Gulay SERHATKULU, Snow STOLNIK-TRENKIC, Steven M. HOWDLE a Kevin M. SHAKESHEFF. The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying. *Journal of Controlled Release*. 2005, **101**(1-3), 85-92. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.07.017.

[85] LEE, Byung Kook, Yeonhee YUN a Kinam PARK. PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **107**, 176-191. DOI: 10.1016/j.addr.2016.05.020.

[86] YUN, Yeon Hee, Byung Kook LEE a Kinam PARK. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *Journal of Controlled Release*. 2015, **219**, 2-7. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.005.

[87] CHEN, Mei-Chin, Shih-Fang HUANG, Kuan-Ying LAI a Ming-Hung LING. Fully embeddable chitosan microneedles as a sustained release depot for

intradermal vaccination. *Biomaterials*. 2013, **34**(12), 3077-3086. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.041.

[88] ADAMS JD, FLORA KP, GOLDSPIEL BR, WILSON JW, ARBUCK SG, FINLEY R. Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*. 1993, **15**, 141-147.

[89] SINGLA, Anil K, Alka GARG a Deepika AGGARWAL. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, **235**(1-2), 179-192. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00986-3.

[90] WANI, Mansukhlal C., Harold Lawrence TAYLOR, Monroe E. WALL, Philip COGGON a Andrew T. MCPHAIL. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 1971, **93**(9), 2325-2327. DOI: 10.1021/ja00738a045.

[91] WALL, Monroe E. a Mansukh C. WANI. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996, **51**(1-3), 239-254. DOI: 10.1016/0378-8741(95)01367-9.

[92] TIAN, Jiaher a Valentino J. STELLA. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: Epimerization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008, **97**(3), 1224-1235. DOI: 10.1002/jps.21112.

[93] AMINI-FAZL, Mohammad Sadegh, Hamid MOBEDI a Jalal BARZIN. Investigation of aqueous stability of taxol in different release media. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013, **40**(4), 519-526. DOI: 10.3109/03639045.2013.771646.

[94] SPENCER, Caroline M. a Diana FAULDS. Paclitaxel. *Drugs*. 1994, **48**(5), 794-847. DOI: 10.2165/00003495-199448050-00009.

[95] BOCCI, Guido, Antonello DI PAOLO a Romano DANESI. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis*. 2013, **16**(3), 481-492. DOI: 10.1007/s10456-013-9334-0.

[96] OOOYA, T. Effects of ethylene glycol-based graft, star-shaped, and dendritic polymers on solubilization and controlled release of paclitaxel. *Journal of Controlled Release*. 2003, **93**(2), 121-127. DOI: 10.1016/j.jconrel.2003.07.001.

[97] RUAN, Gang a Si-Shen FENG. Preparation and characterization of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid) (PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials*. 2003, **24**(27), 5037-5044. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00419-8.

[98] 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*. 2013, **75**, 672-673. DOI: 10.4103/0250-474x.124762.

[99] ZENG, Jing, Lixin YANG, Qizhi LIANG, Xuefei ZHANG, Huili GUAN, Xiuling XU, Xuesi CHEN a Xiabin JING. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *Journal of Controlled Release*. 2005, **105**(1-2), 43-51. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.02.024.

[100] KIM, Dong Wuk, Abid Mehmood YOUSAF, Dong Xun LI, Jong Oh KIM, Chul Soon YONG, Kwan Hyung CHO a Han-Gon CHOI. Development of RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and curcumin in rat plasma: Validation and stability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **12**(1), 105-113. DOI: 10.1016/j.ajps.2016.08.002.

[101] REZAZADEH, Mahboubeh, Jaber EMAMI, Abolfazl MOSTAFAVI, Mahboubeh ROSTAMI, Farshid HASSANZADEH, Hojjat SADEGHI, Mohsen MINAIYAN a Afsaneh LAVASANIFAR. 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.... *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2015, **18**(5), 647-660. DOI: 10.18433/J3RP6Z.

[102] 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*. 1998, **12**, 251-255. DOI: 10.1002/(sici)1097-0231(19980314)12:5251::aid-rcm1453.0.co;2-z

[103] TONG, X., J. ZHOU a Y. TAN. Determination of Paclitaxel in Rat Plasma by LC--MS--MS. *Journal of Chromatographic Science*. 2006, **44**(5), 266-271. DOI: 10.1093/chromsci/44.5.266.

[104] SUBBIAH, Thandavamoorthy, BHAT, G. S., TOCK, R. W., PARAMESWARAN, S., RAMKUMAR, S. S., 2005. Electrospinning of nanofibers. *J Appl Polym Sci*, **96**, 557-569. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.21481>

[105] CHEW, S. Y.; WEN, Y.; DZENIS, Y.; LEONG, K. W. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Current Pharmaceutical Design*. 2006, **12**(36), 4751-4770. DOI: <https://doi.org/10.2174/138161206779026326>

[106] YARIN, L., KOOMBHONGSE, S., RENEKER, D. H. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*. 2001, **90**, 4836. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.1408260>.

[107] TECHNICKA UNIVERZITA V LIBERCI, 2009 Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. Původci: Oldřich Jirsák, Filip Sanetník, David Lukáš, Václav Kotek, Lenka Martinova a Jiří Chaloupek. United States Patent and Trademark Office. US7585437B2. 8. 9. 2009.

[108] HOBZOVA, Radka, Zuzana HAMPEJSOVA, Tereza CERNA, et al. Poly(d,l-lactide)/polyethylene glycol micro/nanofiber mats as paclitaxel-eluting carriers: preparation and characterization of fibers, in vitro drug release, antiangiogenic activity and tumor recurrence prevention. *Materials Science and Engineering: C*. 2019, **98**, 982-993. DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.046.

[109] HAMPEJSOVA, Zuzana, Jan BATEK, Jakub SIRC, Radka HOBZOVA a Zuzana BOSAKOVA. Polylactide/polyethylene glycol fibrous mats for local paclitaxel delivery: comparison of drug release into liquid medium and to HEMA-based hydrogel model. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly. 2019, 150(9), 1691-1696. DOI: 10.1007/s00706-019-02469-5.