

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Mudrová

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE  
2-HYDROXYETHYL METHAKRYLÁTOVÝCH  
HYDROGELŮ PRO TESTOVÁNÍ NOSIČŮ  
PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV

Preparation and characterization of 2-hydroxyethyl  
methacrylate hydrogels for testing of anticancer drugs  
carriers

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Konzultanti: RNDr. Jakub Širc, Ph.D.

Ing. Radka Hobzová, Ph.D.

Praha 2021

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 1. června 2021.

## Abstrakt

V této bakalářské práci byly připraveny a charakterizovány hydrogely na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu a kyseliny methakrylové (pHEMA-MA). Hydrogely by mohly sloužit jako testovací médium při vývoji nanovlákných polyaktidových (PLA) systémů pro lokální aplikaci paklitaxelu (PTX). Toto médium bylo studováno ve snaze vytvořit podmínky, které lépe odpovídají skutečnému prostředí lidského těla než běžně používaná kapalná média. Lokální aplikace cytostatik u léčby pevných nádorů má řadu výhod. PTX je představitelem hydrofobního protinádorového léčiva s vážnými vedlejšími účinky. Lokální aplikací tohoto léčiva pomocí PLA nanovlákných nosičů by bylo možné vedlejší účinky značně omezit a při tom zvýšit jeho koncentraci a dobu působení v cílových nádorových tkáních. Dále byl zkoumán vliv přídavku polyethylenglykolu (PEG) o molekulové hmotnosti 20 kDa a  $\beta$ -cyklodextrinu (CD) do struktury nanovláken pro optimalizaci uvolňování inkorporovaného léčiva.

Kinetika uvolňování PTX z PLA nanovláken do pHEMA-MA hydrogelů byla sledována analytickou metodou HPLC s UV detekcí. Experiment byl také proveden za použití vodného roztoku PBS jako uvolňovacího média pro porovnání profilů uvolňování PTX. Za použití metody HPLC s UV detekcí byla testována také sorpce PTX do pHEMA a pHEMA-MA hydrogelů o různém obsahu MA z roztoku PTX v PBS s Tween 80.

Bylo prokázáno, že z nanovláken se do pHEMA-MA hydrogelů uvolnilo výrazně více PTX než do PBS. Při experimentech uvolňování PTX z nanovláken do hydrogelů i do PBS bylo potvrzeno, že přídavek PEG do struktury nanovláken výrazně zvyšuje množství uvolněného léčiva a zároveň také prodlužuje dobu, po kterou se léčivo uvolňuje. PEG se ukázal být vhodným modifikačním činidlem pro PTX ke zvýšení jeho uvolňování do vodného prostředí. Vliv přídavku CD do struktury nanovláken nebyl při uvolňování léčiva do PBS významný. Při experimentu uvolňování PTX z PLA-PTX-CD do hydrogelů dokonce došlo k uvolnění nižšího množství PTX, než v případě PLA nanovláken obsahujících pouze PTX.

## Abstract

In present bachelor thesis, hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate and methacrylic acid (pHEMA-MA) were prepared and characterized. Hydrogels could serve as a testing medium in the development of nanofiber polylactide (PLA) systems for local application of paclitaxel (PTX). This medium has been studied in an effort to create conditions that better correspond to the actual environment of a human body than commonly used liquid media. Local application of cytostatics in the treatment of solid tumors has a number of advantages. PTX represents a hydrophobic anticancer drug with serious side effects. Local distribution of presented drug using nanofiber carriers could greatly reduce the adverse side effects while increasing its concentration and duration of effect in target tumor tissues. The effect of the addition of polyethylene glycol (PEG) with a molecular weight of 20 kDa and  $\beta$ -cyclodextrin (CD) to the nanofiber structure was further investigated to optimize the release of the incorporated drug.

The release kinetics of PTX from PLA nanofibers into pHEMA-MA hydrogels were studied using analytical method HPLC with UV detection. The experiment was also performed using an aqueous PBS solution as the release medium for comparison of the PTX release profiles. The sorption of PTX into pHEMA and pHEMA-MA hydrogels with different MA contents from a solution of PTX in PBS with Tween 80 was also examined using HPLC method with UV detection.

It has been confirmed that significantly more PTX was released from nanofibers into pHEMA-MA hydrogels than into PBS. In experiments on the release of PTX into hydrogels and into PBS was found, that the addition of PEG to the nanofiber structure significantly increases the amount of drug released and also prolongs the time for which the drug is released. PEG has been shown to be a suitable modifying agent for PTX to increase its release into aqueous environment. The effect of the addition of CD to the nanofiber structure was not significant during drug release into PBS. In the experiment of releasing PTX from PLA-PTX-CD into hydrogels, a lower amount of PTX was released than in the case of PLA nanofibers containing only PTX.

## Klíčová slova

Hydrogely  
Nanovlákná  
Paklitaxel  
HEMA  
Kyselina methakrylová  
Polylaktid  
Polyethylenglykol  
Cyklodextrin  
HPLC-UV  
Lokální aplikace léčiv

## Key words

Hydrogels  
Nanofibers  
Paclitaxel  
HEMA  
Methacrylic acid  
Polylactide  
Polyethylene glycol  
Cyclodextrin  
HPLC-UV  
Local drug delivery

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce, prof. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., svým konzultantům RNDr. Jakobovi Šircovi Ph.D. a Ing. Radce Hobzové, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR za odborné vedení, cenné rady a především vstřícnost, trpělivost a ochotu při vypracovávání této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině, která mi umožnila studium na vysoké škole.

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <u>PROHLÁŠENÍ</u>   | <u>2</u>  |
| <u>ABSTRAKT</u>   | <u>3</u>  |
| <u>ABSTRACT</u>   | <u>4</u>  |
| <u>KLÍČOVÁ SLOVA</u>  | <u>5</u>  |
| <u>KEY WORDS</u>  | <u>5</u>  |
| <u>PODĚKOVÁNÍ</u>   | <u>6</u>  |
| <u>OBSAH</u>  | <u>7</u>  |
| <u>SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ</u>                                       | <u>9</u>  |
| <u>1 CÍL PRÁCE</u>  | <u>10</u> |
| <u>2 TEORETICKÁ ČÁST</u>  | <u>11</u> |
| 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 Hydrogely v tkáňovém inženýrství                              | 14        |
| 2.1.3.2 Hydrogely jako nosiče léčiv                                   | 15        |
| 2.1.3.3 Hydrogely jako prostředky pro vlhké hojení ran                | 15        |
| 2.1.3.4 Hydrogely jako kontaktní čočky                                | 16        |
| 2.1.3.5 Hydrogely jako prostředí simulující pevný nádor               | 17        |
| 2.2 LOKÁLNÍ APLIKACE LÉČIV  | 18        |
| 2.2.1 LOKÁLNÍ LÉČBA RAKOVINY  | 18        |
| 2.3 NANOVLÁKNA  | 19        |
| 2.3.1 VÝROBA NANOVLÁKEN   | 20        |
| 2.4 LOKÁLNÍ APLIKACE LÉČIV POMOCÍ NANOVLÁKEN                          | 21        |
| 2.5 PAKLITAXEL  | 22        |
| <u>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>  | <u>24</u> |
| 3.1 MATERIÁLY   | 24        |
| 3.1.1 CHEMIKÁLIE  | 24        |
| 3.1.2 PLA NANOVLÁKNA  | 25        |
| 3.2 HPLC METODA PRO STANOVENÍ PTX                                     | 26        |
| 3.3 STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ PTX V PLA NANOVLÁKNECH               | 27        |
| 3.4 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ A STANOVENÍ STUPNĚ BOTNÁNÍ V ROVNOVÁŽNÉM STAVU | 27        |
| 3.4.1 PŘÍPRAVA PHEMA-MA HYDROGELŮ S RŮZNÝM OBSAHEM MA                 | 27        |
| 3.4.2 STANOVENÍ STUPNĚ BOTNÁNÍ PHEMA-MA HYDROGELŮ                     | 28        |
| 3.4.3 PŘÍPRAVA PHEMA-MA HYDROGELU PRO EXPERIMENT S UVOLŇOVÁNÍM PTX    | 30        |
| 3.4.4 PŘÍPRAVA PHEMA HYDROGELU  | 30        |
| 3.5 UVOLŇOVÁNÍ PTX Z PLA NANOVLÁKEN DO PBS                            | 31        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.6      | MĚŘENÍ UVOLŇOVÁNÍ PTX Z PLA NANOVLÁKEN DO PHEMA-MA HYDROGELŮ | 32        |
| 3.7      | SORPCE PTX DO PHEMA A PHEMA-MA HYDROGELŮ                     | 34        |
| <u>4</u> | <u>VÝSLEDKY A DISKUZE</u>                                    | <u>35</u> |
| 4.1      | KALIBRAČNÍ KŘIVKA V METHANOLU A PBS                          | 35        |
| 4.2      | STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ PTX V PLA NANOVLÁKNECH          | 37        |
| 4.3      | STANOVENÍ STUPNĚ BOTNÁNÍ PHEMA-MA HYDROGELŮ                  | 37        |
| 4.4      | UVOLŇOVÁNÍ PTX Z PLA NANOVLÁKEN DO PBS                       | 38        |
| 4.5      | MĚŘENÍ UVOLŇOVÁNÍ PTX Z PLA NANOVLÁKEN DO PHEMA-MA HYDROGELŮ | 40        |
| 4.6      | SORPCE PTX DO PHEMA A PHEMA-MA HYDROGELŮ                     | 43        |
| <u>5</u> | <u>ZÁVĚR</u>   | <u>46</u> |
| <u>6</u> | <u>LITERATURA</u>  | <u>47</u> |

## Seznam zkratek a symbolů

|         |   |
|---------|---|
| CD      | $\beta$ -Cyklodextrin                     |
| DMSO    | Dimethylsulfoxid                          |
| EDMA    | Ethylenglykoldimethakrylát                |
| HEMA    | 2-Hydroxyethylmethakrylát                 |
| hmot. % | Hmotnostní procento                       |
| HPLC    | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie    |
| IPN     | Multipolymerní interpenetrované hydrogely |
| MA      | Kyselina methakrylová                     |
| PBS     | Fosfátový pufr                            |
| PDLA    | Kyselina poly(D-mléčná)                   |
| PDLLA   | Poly(D, L-kyselina mléčná)                |
| PEG     | Polyethylenglykol                         |
| PLA     | Polylaktid                                |
| PLGA    | Poly(lactid-co-glycolid)                  |
| PLLA    | Kyselina poly(L-mléčná)                   |
| PTX     | Paklitaxel                                |
| RSD     | Relativní směrodatná odchylka             |
| SB      | Stupeň botnání                            |
| SEM     | Snímací elektronová mikroskopie           |
| $s_r$   | Směrodatná odchylka                       |

# 1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo studium využití hydrogelů na bázi kopolymerů 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) a kyseliny methakrylové (MA) simulujících *in vivo* prostředí při uvolňování hydrofobního léčiva paklitaxelu (PTX), inkorporovaného do struktury nanovláčenného materiálu polylaktidu (PLA).

Dílčí cíle této bakalářské práce jsou:

1. Příprava hydrogelů na bázi HEMA a MA radikálovou polymerizací a stanovení jejich stupně botnění.
2. Sledování kinetiky uvolňování PTX z PLA nanovláčken.
3. Studium vlivu přídavku amfifilní molekuly polyethylenglykolu (PEG) a cyklodextrinu (CD) do struktury nanovláčken na profil uvolňování léčiva zakotveného v nanovláččenném nosiči do hydrogelu.
4. Sledování kinetiky sorpce PTX do hydrogelů a porovnání sorpční schopnosti hydrogelů pHEMA a pHEMA-MA.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Hydrogely

Hydrogely jsou polymerní materiály s trojrozměrnou strukturou sítě. Jsou schopny absorbovat značné objemy tekutin prostřednictvím hydrofilních skupin, kterých tyto polymerní materiály obsahují velké množství. Hydrogely jsou materiály velice všestranné. Kromě skvělé absorpční schopnosti mají i jiné výhodné vlastnosti, jako jsou elasticita, flexibilita, porozita a velmi dobrá kompatibilita s živými tkáněmi. Právě tyto vlastnosti jsou důvodem rozsáhlého využití hydrogelů v medicíně a dalších odvětvích (Aswathy et al., 2020, Buenger et al., 2012).

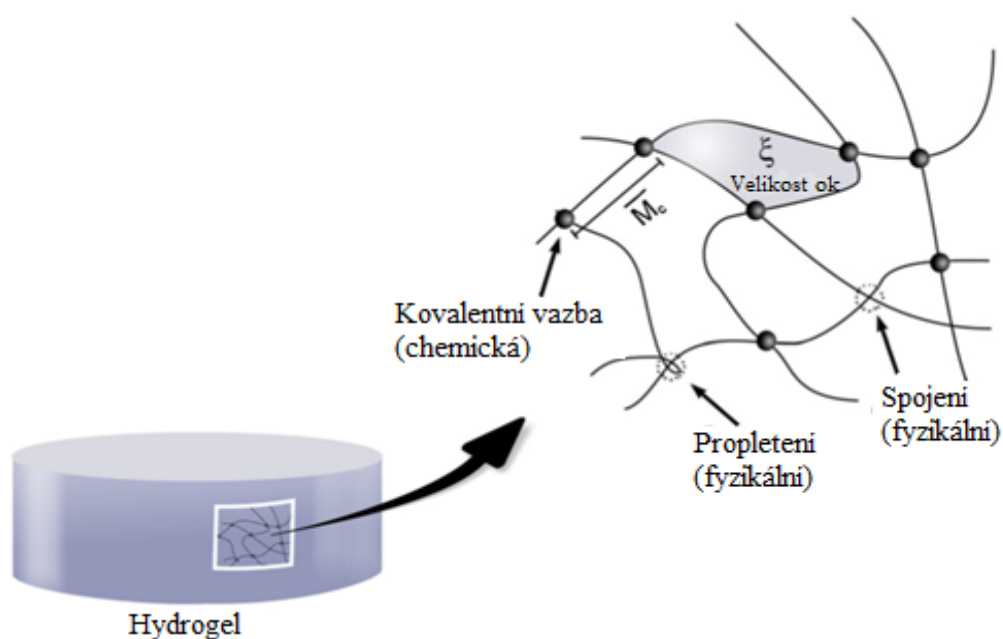
Poprvé termín hydrogel použil J. M. van Bemmelen v roce 1884. V dalších letech se hydrogely díky práci Otty Wichterleho a Drahoslava Líma dočkaly využití zejména v očním lékařství, jako výplně po enukleaci oka nebo jako materiál pro výrobu kontaktních a nitroočních čoček. Od té doby se použití hydrogelů rozšířilo do mnoha oblastí lidské činnosti, například i do zemědělství a potravinářství. Využívají se také jako systémy pro dopravu léčiv, v tkáňovém inženýrství jako tzv. skafoldy, či jako kryty na vlhké hojení ran (Varaprasad et al., 2017). V posledních desetiletích se hydrogely dočkaly opravdu velkého rozvoje a jejich význam roste každým rokem. V dalším odstavci budou probrány vlastnosti a struktura hydrogelů.

#### 2.1.1 Struktura hydrogelů

Hydrogely jsou tvořeny polymerními řetězci uspořádanými do trojrozměrné zesíťované struktury. Právě kvůli tomuto uspořádání dosahuje molekulová hmotnost hydrogelů velmi vysokých hodnot. Může se dokonce blížit až k nekonečnu (Michalek et al., 2010). Tyto polymery, ať už přírodního nebo syntetického původu, jsou hydrofilní. Hydrogely ve velkém množství absorbují vodu, jsou nerozpustné ve vodě za fyziologické teploty, pH a iontové síly.

Síťová struktura hydrogelů je realizována spoji mezi jednotlivými polymerními řetězci. Tyto spoje mohou být zformovány vlivem silných chemických interakcí, jako jsou kovalentní a iontové vazby nebo vlivem fyzikálních nekovalentních interakcí, tedy vodíkovými vazbami, hydrofobními nebo elektrostatickými interakcemi (Slaughter et al., 2009).

Důležitými strukturálními parametry hydrogelů jsou stupeň zesíťování a molární hmotnost polymerních řetězců mezi jednotlivými spoji. Stupeň zesíťování charakterizuje hustotu spojů mezi jednotlivými polymerními řetězci. Tyto parametry mohou být upraveny k dosažení požadovaných vlastností hydrogelu. Pro příklad, vyšší stupeň zesíťování vede ke zvýšené mechanické odolnosti hydrogelu, ke snížení rychlosti difúze molekul hydrogelem a ke zmenšení velikosti ok trojrozměrné sítě. Velikost ok definuje prostor pro difúzi molekul nebo částic strukturou hydrogelu (Buenger et al., 2012). Na obrázku 1 je znázorněna struktura hydrogelu na molekulární úrovni.

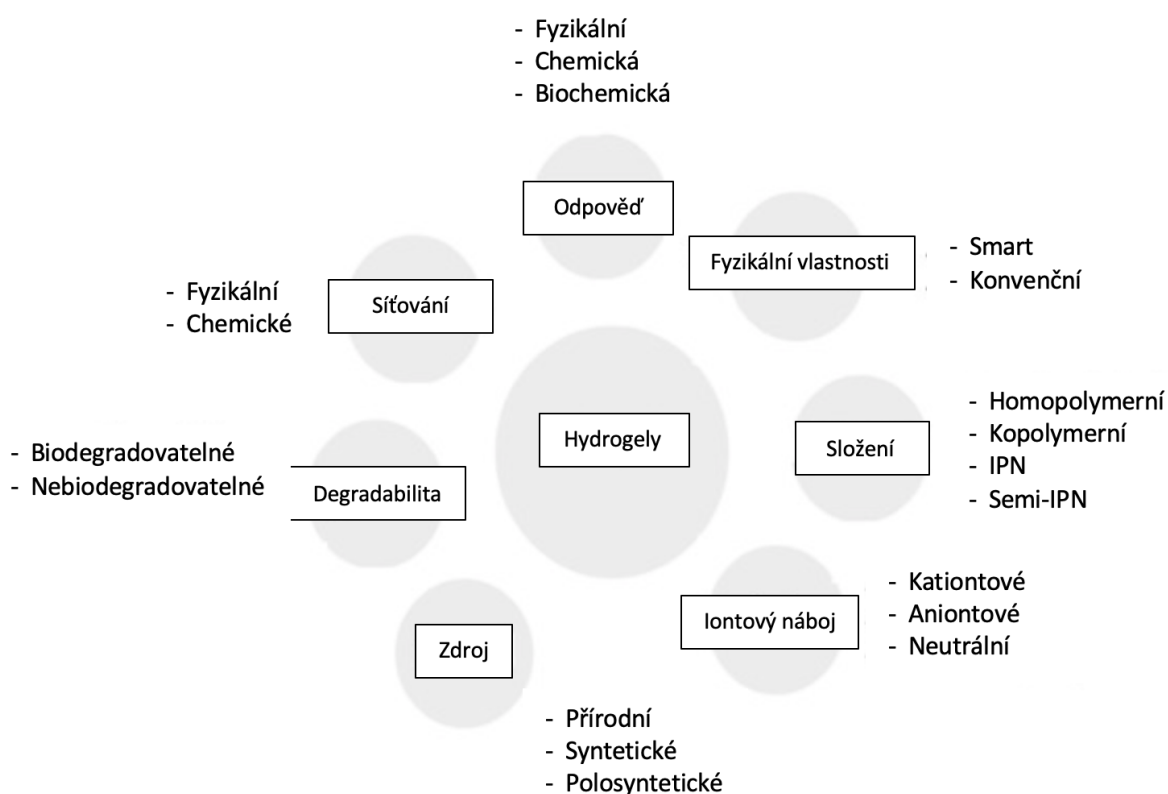


Obrázek 1.: Síťovaná struktura hydrogelu na molekulární úrovni. Zdroj: (Buenger et al., 2012)

Voda se v hydrogelech nachází v několika formách – vázaná slabými interakcemi na molekulární strukturu polymerní sítě (nonfreezing – nemrzoucí) a volná (freezing), která pod bodem mrazu vytváří krystalickou strukturu ledu. Množství vody absorbované hydrogelem závisí na teplotě a na specifické interakci mezi molekulami vody a polymerními řetězci (Ullah et al., 2015). Čím vyšší je stupeň zesíťování, tím méně je hydrogel pružný, tím pomaleji botná a je méně ochoten ke změně fáze v reakci na podněty. V případech vysokého stupně zesíťování byla pozorována zvýšená křehkost hydrogelu (Peppas et al., 2000).

## 2.1.2 Klasifikace hydrogelů

Hydrogely se dají rozdělit z různých úhlů pohledu, např. na základě zdroje, ze kterého je hydrogel připraven, dále podle složení, iontového náboje, odezvy, síťování, fyzikálních vlastností nebo degradability (Ullah et al., 2015). Přehled klasifikace hydrogelu je uveden na obrázku 2.



Obrázek 2.: Klasifikace hydrogelů. Zdroj: (Ullah et al., 2015)

V závislosti na iontovém náboji skupin navázaných v postranním řetězci hydrogelu se hydrogely dělí na kationtové, aniontové a neutrální. Na základě způsobu zesítnění hydrogely dělíme na fyzikální a chemické. Lze je také dělit do skupin podle jejich struktury na amorfnní, krystalické a semikrystalické.

Hydrogely mohou být přírodní, syntetické nebo polosyntetické. V medicíně jsou upřednostňovány přírodní hydrogely, a to z toho důvodu, že jsou vysoce biokompatibilní. Nevýhodou přírodních hydrogelů může být jejich omezená mechanická odolnost a také stabilita (Singh et al., 2016). Přírodní polymery využívané k produkci hydrogelů jsou např. želatina, kolagen, alginát nebo chitosan (Croisier and Jérôme, 2013). Mezi syntetické polymerní

materiály využívané k výrobě hydrogelů řadíme např. polyvinylalkohol, polyethylenglykol nebo polymery na bázi kyseliny metakrylové a jejích esterů, např. poly(2-hydroxyethylmethakrylátu).

Jak můžeme vidět na obrázku 2, hydrogely se podle svého složení dělí na homopolymerní, kopolymerní a multipolymerní interpenetrované hydrogely (IPN). Homopolymerní hydrogely tvoří polymerní síť odvozenou od jednoho druhu monomeru, který je základem celé struktury daného polymeru. Kopolymerní hydrogely obsahují dva nebo více druhů monomeru, kde minimálně jedna složka však musí být hydrofilní. Multipolymerní interpenetrované hydrogely jsou vyráběny ze dvou nezávislých polymerních složek již v síťové formě (M. Trudičová, 2018).

### 2.1.3 Použití hydrogelů

Jak již bylo uvedeno výše, hydrogely mají v dnešní době početné množství aplikací. V této části mé práce se budu věnovat především uplatnění hydrogelů v medicíně.

#### 2.1.3.1 Hydrogely v tkáňovém inženýrství

V případě selhání některých tkání nebo orgánů existuje několik možností léčby, oprava tkáně nebo orgánu, jejich výměna za syntetickou nebo přírodní náhradu, či regenerace. Přestože implantáty mohou být úspěšným řešením tohoto problému, tkáňové inženýrství je v dnešní době slibnou možností regenerace tkání či orgánů (A. S. Hoffman, 2002).

Hydrogely jsou v posledních letech stále více zkoumány jako matrice, tzv. skafoldy pro tkáňové inženýrství, jelikož mohou obsahovat póry natolik velké, aby pojaly živé buňky. Jak již bylo zmíněno dříve, hydrogely lze přizpůsobit natolik, aby dostatečně připomínaly nativní tkáň. Dále mohou být hydrogely navrženy tak, aby se postupně (řízeně) rozpustily nebo degradovaly, a tím vytvářely nové póry umožňující živým buňkám pronikat do struktury hydrogelu a dále proliferovat. S výhodou lze také využít inkorporace biologicky aktivních látek do struktury hydrogelu (např. růstové faktory), které se z hydrogelu uvolňují a podporují tak růst buněk a nové tkáně. Hydrogelové skafoldy také

mohou zprostředkovávat transport živin a odstraňování odpadních látek (A. S. Hoffman, 2002).

### 2.1.3.2 Hydrogely jako nosiče léčiv

Hydrogely se často používají jako lokální nosiče léčiv, jelikož jsou hydrofilní, biokompatibilní a rychlost uvolňování léčiva z nich lze regulovat. Vhodnou morfologií, regulací stupně botnání nebo rychlostí degradace hydrogelu lze upravit kinetiku uvolňování léčiva podle požadovaného terapeutického účinku (Slaughter et al., 2009).

Hydrogely jako nosiče léčiv jsou slibným nástrojem kontrolované distribuce hned v několika oblastech medicíny. Například při léčbě rakoviny, artrózy, diabetu, bakteriální či virové infekce a srdečních chorob (Mishra et al., 2017).

Existují dva hlavní způsoby inkorporace léčiva do hydrogelu. Prvním způsobem je přidání léčiva do polymerizační směsi a její následná polymerizace. Druhým způsobem je inkorporace léčiva do již zpolymerovaného hydrogelu, zpravidla sorpce z roztoku léčiva. Během botnání anebo koncentračním gradientem řízenou difúzí molekul léčiva do hydrogelu je léčivo absorbováno do jeho struktury, dokud nedojde k ustavení rovnováhy (Mishra et al., 2017).

Hlavní nevýhoda hydrogelů jako nosičů léčiv spočívá v obtížnosti inkorporace zpravidla hydrofobních léčiv do hydrofilní matrice hydrogelu. Tento problém bývá řešen například zavedením hydrofobních skupin do hydrogelové struktury (Larrañeta et al., 2018).

### 2.1.3.3 Hydrogely jako prostředky pro vlhké hojení ran

Rozsáhlé popáleniny a další defekty kůže, ať už způsobené úrazem či metabolickou poruchou, jsou vážným lékařským, sociálním a ekonomickým problémem. Řízení procesu hojení ran stále představuje výzvu pro současný výzkum v lékařské oblasti. Rozmanitost druhů ran, jako jsou popáleniny, chirurgické rány, dekubity, diabetické bérkové vředy atp., vedla k vývoji mnoha druhů obvazových materiálů. Obvazové materiály prošly vývojem od aplikace bylin, tradičních obvazů, jako jsou vata, syntetické i přírodní obvazy, či gáza, až

po moderní materiály, které kromě krytí rány zajišťují i vlhké prostředí v okolí rány, které je pro hojení velice důležité (Michalek et al., 2010).

Hydrogely hrají v oblasti hojení ran důležitou roli zejména pro jejich schopnost pojmout značné množství vody, tedy až 90 % (m/m). Kromě zajištění vlhkého prostředí hydrogely přispívají k hojení rány i tím, že absorbují nadbytek exsudátu. Hydrogely jsou skvěle akceptovány živou tkání, jsou propustné pro metabolity, nepůsobí žádné problémy po odstranění díky jejich elasticitě, a navíc také ochlazují okolní tkáň. Tato skutečnost vede ke snížení bolesti, a tím tedy i k vysoké přijatelnosti pacienty (Michalek et al., 2010).

#### 2.1.3.4 Hydrogely jako kontaktní čočky

Kontaktní čočka je malým optickým zařízením, které se pokládá přímo na oční rohovku. Technologie její výroby musí umožňovat upravování optických vlastností čočky. Musí být umožněno přesně upravit tvar k zajištění správné fyziologické funkce čočky v kontaktu s okem (Michalek et al., 2010). Rohovka je průhledná tkáň bez jakýchkoliv cév, pro jejich správnou funkci je důležitá dostupnost vzdušného kyslíku. Umělá kontaktní čočka však jistým způsobem vždy ovlivňuje metabolismus rohovky, je proto důležité hypoxii a mechanické namáhání rohovky při užívání kontaktních čoček co nejvíce minimalizovat (Michalek et al., 2010).

Pozoruhodným úspěchem v technologii kontaktních čoček byl objev syntetických hydrofilních polymerů, hydrogelů, které mají několik důležitých vlastností. Jsou měkké, smáčitelné a kompatibilní s živou tkání. Díky schopnosti hydrogelů absorbovat vodu obsahují kontaktní čočky vyrobené z nich stále nějaké množství vody, která slouží jako transportní médium pro nízkomolekulární látky a metabolity jako jsou kyslík, ionty apod. (Michalek et al., 2010).

Polymerní materiál využívaný pro výrobu kontaktních čoček, poly(2-hydroxyethyl methakrylát) (pHEMA), byl vyvinut v padesátých letech 20. století Ottou Wichterlem a Drahoslavem Límem. Syntetické hydrogely na bázi methakrylátů stále reprezentují hojně využívané materiály pro výrobu měkkých kontaktních čoček (Michalek et al., 2010). Při vývoji kontaktních čoček se ukázalo, že limitujícím parametrem HEMA hydrogelu je relativně malý obsah

vody (za laboratorní teploty absorbuje dle stupně zesíťování jen cca 40 % vody). Ve snaze zvýšit absorpci vody hydrogely a zvýšit tak následně propustnost pro kyslík byly zkoumány možnosti kopolymerizace HEMA s dalšími hydroxyalkyl methakryláty, kyselinou methakrylovou nebo jejími solemi. Tyto hydrogely botnají až na 55–60 % (m/m) rovnovážného obsahu vody a jejich prostupnost pro kyslík je výrazně vyšší než u HEMA.

### 2.1.3.5 Hydrogely jako prostředí simulující pevný nádor

Při výzkumu rakoviny a vývoji účinných terapií se využívá mnoho strategií, včetně analýzy klinických biopsií, zvířecích modelů *in vivo* a modelů *in vitro*.

Pevné nádory jsou trojrozměrné shluky rakovinných buněk. Přesto se velká většina buněčných studií, zabývajících se onkogenezí a protinádorovými léčivými, provádí pomocí konvenčních jednovrstvých kultivačních systémů, kde se buňky pěstují na plastovém substrátu v prostředí za přístupu vzdušného kyslíku, anebo homogenních kapalných suspenzí nádorových buněk. Tyto podmínky neodpovídají skutečnému prostředí v těle pacienta (Wang et al., 2018).

Modely nádorů *in vitro* ve 3D, jako jsou organoidy, se ukazují být slibným nástrojem, který replikuje mnoho vlastností pevných nádorů *in vivo*. Rakovinové organoidy jsou miniaturní trojrozměrné modely buněčných kultur, které lze kultivovat z embryonálních kmenových buněk, pluripotentních kmenových buněk a dospělých kmenových buněk (Gunti et al., 2012).

Hydrogely jsou vhodnými materiály pro výrobu umělých extracelulárních matic, jelikož nabízejí řadu výhodných vlastností. Lze je chemicky modifikovat, měnit jejich strukturu, tvar, či povrch. Biomimetické hydrogelové nosiče, tzv. skafoldy, pomáhají reprodukovat chování přirozené extracelulární matrice a jsou přínosné pro studium chování rakovinných buněk a jejich odpovědí na různé druhy terapií. Mezi takové materiály patří i Biogelx hydrogely (Biogelx, 2018).

Rozsáhlé experimenty ukázaly, že mechanické vlastnosti matrice ovlivňují růst a aktivitu rakovinných buněk. Tkáň navíc během patologické progresy rakoviny tuhne. Pro trojrozměrné rakovinné kultury se běžně používají hydrogely na bázi bílkovin jako je kolagen nebo matrigel. Nevýhoda těchto

materiálů však spočívá v tom, že nejsou příliš tuhé. Nedokáží tedy napodobit přirozené tuhé prostředí v okolí nádoru (Biogelx, 2018).

Biogelx materiály lze připravit v širokém rozsahu tuhosti a s požadovanými biochemickými vlastnostmi. Jsou tedy vhodnými materiály pro reprodukovatelný výzkum v biologii rakoviny a objevování léčiv (Biogelx, 2018).

## 2.2 Lokální aplikace léčiv

Lokální distribuce léčiv byla z počátku vývoje využívána především k prevenci, či kontrole bakteriemi vyvolaných zánětů a k udržení po delší dobu stálé koncentrace nutné k dosažení terapeutických účinků. V porovnání s ostatními systémy distribuce léčiv je systém pro lokální distribuci velice výhodný. Je schopen dosáhnout vysoké koncentrace léčiva v místě potřeby a zároveň se snižuje toxicita léčiva vůči ostatním tkáním (Chen et al., 2019).

Biomateriály používané pro lokální distribuci léčiv by měly být schopné zvýšit dostupnost, rozpustnost a stabilitu léčiv v místě potřeby. Dále by v řadě aplikací měly být degradovatelné a neměly by bránit regeneraci či proliferaci buněk. Tyto biomateriály, jejich metabolity, popřípadě deriváty by neměly být toxické nebo vyvolávat imunitní odpověď. Kinetika uvolňování léčiva by měla být nastavitelná tak, aby mohla splňovat farmakokinetické požadavky v závislosti na typu léčiva a zvolené terapii (Chen et al., 2019). Jako systémy pro lokální distribuci léčiv lze použít polymerní nosiče, například ve formě nanočástic, nebo gelů. Velice slibnými materiály jsou pak mikrovláknna či nanovláknna. Přestože využití lokální distribuce léčiv je stále na úrovni výzkumu, mnohé preklinické studie potvrzují její efektivitu a užitečnost. Například přípravek OncoGel, injekční gel založený na poly(laktid-*co*-glykolidu) (PLGA) a polyethylenglykolu (PEG) s přídatkem protinádorového léčiva PTX, je již používán v klinické praxi pro léčbu rakoviny jícnu, nádoru mozku a dalších pevných nádorů (Elstad et al., 2009).

### 2.2.1 Lokální léčba rakoviny

V současné době je chemoterapie nejčastější léčbou onkologických onemocnění. Systémové podávání chemoterapeutik zajišťuje snadnou a účinnou

distribuci aktivních látek v těle pacienta, přičemž léčivo působí i na rakovinné buňky mimo oblast jejich vzniku. Značnou nevýhodou tohoto způsobu léčiva u léčby některých nádorů však je, že jen velmi malá část systemicky distribuovaného léčiva se dostane na potřebné místo, tedy k nádoru. Chemoterapie bývá spojena s vážnými vedlejšími účinky zejména kvůli vysoké expozici orgánů účinkům léčiv. U mnoha onkologických onemocnění, zejména u pevných nádorů, by byla lokální aplikace chemoterapeutik výhodná. V poslední době přitahují velkou pozornost nanovláknenné materiály jako lokální systémy pro distribuci léčiv. Mají značný potenciál při léčbě různých druhů rakoviny, protože mohou poskytovat vysokou koncentraci léčiva v cílovém místě po delší dobu, čímž snižují celkovou expozici a nepříznivé účinky (Poláková et al., 2019).

Většina výzkumných prací týkajících se materiálů pro lokální podávání protinádorových léčiv popisuje optimalizaci uvolňování léčiv *in vitro* za modelových laboratorních podmínek. Chování takových farmakologicky aktivních materiálů se však při použití v živém organismu může značně lišit od experimentů prováděných *in vitro* (Poláková et al., 2019).

Řada procesů významně ovlivňuje uvolňování léčiva ze samotného nosiče a zejména následnou distribuci léčiva v cílové nádorové tkáni. Mikroprostředí nádoru je složitým a heterogenním prostředím, kde by při navrhování systému pro podávání léčiva měly být brány v úvahu různé fyziologické faktory (Poláková et al., 2019).

## 2.3 Nanovláknna

Nanovláknna jsou v současnosti jedním z intenzivně studovaných materiálů pro aplikace v biomedicínských oblastech. Byly použity jako nosiče pro kultivaci buněk, jako tzv. skafoldy v obvazech na rány nebo pro imobilizaci enzymů (Širc et al., 2012). Jejich vnitřní architektura s relativně velkým povrchem, vysokým poměrem povrchu k objemu, makroporozitou a dalšími vlastnostmi je předurčuje také jako slibné systémy distribuce léčiv pro různé terapeutické látky (Hobzová et al., 2019).

Morfologie má klíčové postavení v potenciálních aplikacích nanovláken, zejména na biomedicínském poli. Parametry, jako jsou průměr vlákna, specifický povrch a průměr pórů ovlivňují funkci nanovláken a tím i jejich využití například

pro kultivaci buněk v tkáňovém inženýrství nebo pro sorpci/desorpci léčiv. Byly aplikovány různé metody použitelné pro charakterizaci nanovláken. Patří mezi ně snímací elektronová mikroskopie, rtuťová porozimetrie a BET měření povrchové plochy (Širc et al., 2012).

### 2.3.1 Výroba nanovláken

Byly vyvinuty různé techniky výroby a zpracování nanovláken. Nejrozšířenější je elektrostatické zvlákňování založené na aplikaci elektrostatického pole o vysokém napětí na polymerní roztok (Pereao et al., 2019).

Tato metoda umožňuje výrobu kontinuálních polymerních nanovláken a dále poskytuje příležitosti k ovlivňování parametrů jako jsou specifický povrch, průměr nanovláken, plošná hmotnost a porozita vrstvy nanovláken, resp. hustota nanovláken.

Nanovláknenné nosiče antibiotik (Katti et al., 2004), analgetik (Tseng et al., 2015) nebo protinádorových léků, jako je PTX (Xie et al., 2006), cisplatinu (Aggarwal et al., 2017) nebo kamptotheciny (Amna et al., 2013), byly vyrobeny metodou jehlového zvlákňování. Tato technika poskytuje potřebnou kontrolu procesních parametrů, a tím výsledné struktury. Je však silně omezena svou výrobní kapacitou, která umožňuje přípravu nanovláken pro laboratorní použití nebo výzkumné účely, ale ne pro široké použití v medicínské oblasti (Širc et al., 2012).

V České republice byla vyvinuta technologie bezjehlového elektrostatického zvlákňování Nanospider<sup>TM</sup> (Jirsák et al., 2009), která neobsahuje žádné jehly nebo trysky. Nanovláknena jsou vytvářena z povrchu kapaliny vlivem elektrostatického pole o vysoké intenzitě. Tato metoda zajišťuje vysokou výrobní kapacitu, stabilitu a velice snadnou údržbu v porovnání s ostatními metodami založenými na použití jehel či trysek. S náležitou kontrolou parametrů procesu výroby, jako jsou koncentrace polymeru v roztoku, síla elektrického pole, „tip-to-collector“ vzdálenost elektrod nebo teplota, je možné připravit nanovláknena o průměru desítek nanometrů až desítek mikrometrů z různých polymerů. Při přípravě nanovláken s inkorporovanými farmaceuticky aktivními látkami, jako systémů pro distribuci léčiv, je rozhodující výběr

rozpouštědla, které musí poskytovat dostatečnou rozpustnost jak pro polymer, tak pro léčivo pro zajištění homogenní distribuce léčiva v nanovláknenné matici (Širc et al., 2012).

## 2.4 Lokální aplikace léčiv pomocí nanovláken

Použití nanovláken jako systémů pro lokální distribuci léčiv má několik výhod:

- zvýšení lokální koncentrace léčiva na místě potřeby s celkovou nižší dávkou
- prodloužení doby působení v místě potřeby s nižší toxicitou pro orgány
- relativně vysoký obsah léčiva v nanovláknenném materiálu
- relativně velký povrch nanovláken, který může usnadnit uvolňování hydrofobních léčiv
- vysoce porézní struktura zajišťující transport léčiva
- variabilita geometrie, měkkost a flexibilita v kontaktu s tkání
- biokompatibilita a rozložitelnost *in vivo* (Aggarwal et al., 2017).

Uvolňování léčiva z nanovláknenných materiálů je komplexním procesem ovlivňovaným mnoha faktory. V případě, že je léčivo homogenně rozloženo v polymerní matici, existují 3 hlavní fáze uvolňování. V první fázi se léčivo uvolňuje z povrchu nanovláken. Ve druhé fázi léčivo zabudované do polymerní matrice difunduje z matrice na povrch a následně do okolí. Ve třetí fázi se léčivo uvolňuje vlivem rozkladu nebo degradace samotných nanovláken (Poláková et al., 2019). První dva mechanismy uvolňování převládají u hydrofilních léčiv, která jsou dobře rozpustná ve vodném okolí. Degradace polymerní matrice hraje důležitou roli především při dlouhodobém uvolňování léčiv hydrofobního charakteru, jejichž rozpustnost ve vodném prostředí je limitována. Uvolňování málo rozpustných hydrofobních léčiv lze optimalizovat přidáním amfifilních molekul, jako je např. PEG. Tyto molekuly mohou jednak slabě interagovat s molekulami léčiva a tím přispívat k jejich transportu do vodného prostředí, dále se při jejich vymývání zvyšuje povrch nanovláknenného nosiče a tím i styčná plocha mezi polymerní maticí a okolním prostředím (Hobzová et al., 2019).

Dalším způsobem, jak ovlivnit uvolňování inkorporovaného léčiva, je přidání cyklodextrinů. Cyklodextriny mohou tvořit vysoce specifické komplexy

hydrofobních inkluzí s různými, ve vodě špatně rozpustnými molekulami, které jsou poté uloženy v dutině cyklodextrinu, zatímco vnější povrch komplexu zůstává hydrofilní (Palmieri et al., 2020, Kayaci et al., 2013).

Experimenty s uvolňováním léčiv z nanovláken se obvykle provádějí v homogenním kapalném prostředí. Často se používá čistá voda, nebo fosfátový pufr, jelikož jsou jednoduchými médii vhodnými pro popis fyzikálně-chemických parametrů, jako jsou interakce léčiva a polymeru, rozpouštění léčiva nebo jeho transport či difúze v polymerní matici. Tyto podmínky uvolňování jsou však výrazně odlišné od podmínek *in vivo*, zejména pro hydrofobní léčiva (Poláková et al., 2019, Hampejsová et al., 2019).

Hydrogely mohou vykazovat podobné mechanické vlastnosti, obsah vody a transportní vlastnosti jako biologické tkáně. V předešlých studiích bylo ověřeno, že hydrogely na bázi HEMA lépe simulují *in vivo* podmínky, a lze je použít jako fyzikální modely pro pevné nádory nebo při studování uvolňování léčiv a biomolekul (Hampejsová et al., 2019).

Kyselina mléčná (LA) je nejběžněji se vyskytující hydroxykarboxylová, opticky aktivní kyselina. Tato chirální molekula existuje jako dva enantiomery, kyselina L- a D-mléčná. Polymer polylaktid (PLA) je založen na monomerech kyseliny mléčné získaných fermentací cukrů, například řepného cukru nebo třtinového cukru (SpecialChem, 2020).

PLA se nejčastěji vyrábí polymerizací otevírající kruh cyklického dimeru kyseliny D- a/nebo L-mléčné, čímž se získá semikrystalický poly(D-laktid) (PDLA) a poly(L-laktid) (PLLA) nebo amorfní poly(D, L-laktid) (PDLLA). PLA je biokompatibilní s lidským tělem a má nízkou imunogenicitu. Navíc je hlavní polymerní řetězec enzymaticky odbouratelný. Konečným produktem této biodegradace je monomer kyseliny mléčné, který vstupuje do Krebsova cyklu a je metabolizován na oxid uhličitý a vodu. PLA je proto široce používán v biomedicíně a pro farmaceutické aplikace, jako jsou biologicky odbouratelné tělesné implantáty a chirurgické stehy nebo nosiče léčiv (Poláková et al., 2019).

## 2.5 Paklitaxel

PTX je rostlinný alkaloid ze skupiny taxanů a protinádorový přípravek účinný při léčbě řady druhů rakoviny, jako je rakovina vaječníků nebo rakovina

prsu. Vzhledem ke svému přímému protirakovinnému účinku v důsledku inhibice mitózy má také antiangiogenní účinky (Bocci et al., 2013).

PTX byl objeven v 70. letech 20. století botanikem Arthurem Barclayem po analýze vzorků kůry z tisu západoamerického, *Taxus brevifolia*. Vysoká poptávka po taxolu však vedla k velkému nedostatku *T. brevifolia*, protože odstraněním kůry dojde k uhynutí stromu. Tis západoamerický byl proto zařazen na seznam ohrožených druhů. Mnoho laboratoří se pokoušelo o vývin kompletní syntézy PTX, ale kvůli komplexitě této molekuly byly pokusy úspěšné až v roce 1994. Nakonec bylo vyvinuto několik metod pro syntézu PTX, přičemž všechny vyžadují zhruba 40 reakčních kroků (Weaver, 2014).

Jako hydrofobní léčivo je PTX podáván především intravenózně ve formě nevodného solvátu, Cremophor EL, který může způsobit srážení ve vodném prostředí těla, alergické reakce nebo další závažné vedlejší účinky. Jeho lokální aplikace přes polymerní nosiče, jako jsou nanovlákná, micely, hydrogely nebo nanočástice má potenciál ke zvýšení koncentrace léčiva a prodloužení jeho účinku v cílovém místě, a tím ke snížení počtu závažných vedlejších účinků způsobených intravenózním podáním (Hampejsová et al., 2019).

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiály

#### 3.1.1 Chemikálie

- paklitaxel, 99,5 % (LC Laboratories, USA)
- methanol, HiPerSolv CHROMANORM, HPLC – GRADIENT GRADE (VWR Chemicals, Francie)
- acetonitril, HiPerSolv CHROMANORM, HPLC – SUPER GRADIENT (VWR Chemicals, Francie)
- voda, HiPerSolv CHROMANORM, HPLC (VWR Chemicals, Francie)
- destilovaná voda
- fosfátový pufr, p.a., tablety (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Tween 80, Ph. Eur. (Carl Roth, Německo)
- hydrogen uhličitán sodný,  $\text{NaHCO}_3$ , p.a. (Chemapol, Česká republika)
- 2-hydroxyethylmethakrylát, 98 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kyselina methakrylová, 98 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- 2-hydroxy-2-methylpropiofenon, 97 % (Darocur 1173) (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- ethylenglykoldimethakrylát, 98 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- dimethylsulfoxid, 99,9 % (Lach-Ner, Česká republika)
- polylaktid (Nature Works, LLC, USA)
- chloroform (PENTA, Česká republika)
- 1,2-dichlorethan (PENTA, Česká republika)
- ethylacetát (PENTA, Česká republika)
- polyethylenglykol (Rapp Polymere GmbH, Germany)

### 3.1.2 PLA nanovlákná

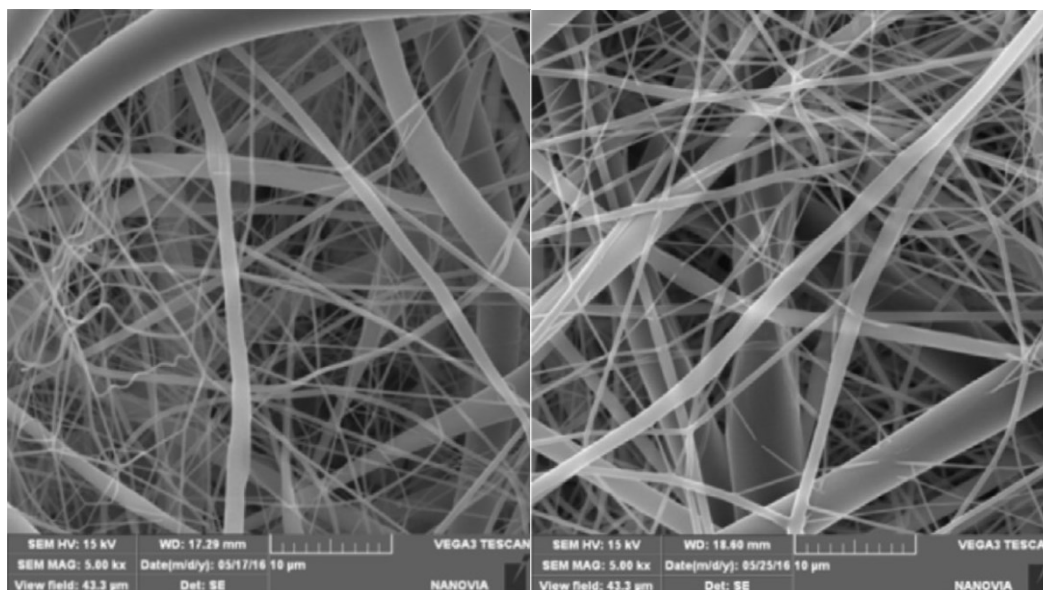
Nanovláknenné materiály testované v rámci této práce byly připraveny ve firmě Nanovia, s.r.o. (Litvínov, Česká Republika) metodou bezjehlového zvlákňování za použití technologie Nanospider™.

PLA polymer (7 hmot. %) ( $M_r = 420,000$  g/mol, koeficient polydisperzity 1,5) byl rozpuštěn v chloroformu (54 hmot. %). Následně byl přidán 1,2-dichlorethan (29 hmot. %) a ethylacetát (10 hmot. %). PEG o molekulové hmotnosti 20 byl přidán do roztoku v koncentraci 15 hmot. % vzhledem k PLA polymeru. PTX byl rozpuštěn v roztoku polymeru v koncentraci 10 hmot. % vzhledem k PLA polymeru. Složení roztoku pro jednotlivé typy nanovláken je uvedeno v tabulce 1. Parametry zvlákňování byly: vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem 22 cm, napětí 20–60 kV, relativní vlhkost 25–30 % a teplota 20 ° C.

Morfologie připravených nanovláken byla zkoumána pomocí SEM (obr. 3). K určení složení nanovláknenných materiálů, tedy ke stanovení poměru PLA / PEG, byla použita  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Specifické povrchy byly vypočítány z izoterm adsorpce / desorpce dusíku podle BET metody. Tepelné vlastnosti nanovláken byly stanoveny pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (Hobzová et al., 2019).

Tabulka 1: Složení roztoku určeného k elektrostatickému zvlákňování pro tři typy nanovláken. Hodnoty obsahu PTX, PEG a CD jsou vztaženy na obsah PLA v roztoku.

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



Obrázek 3.: SEM snímek připravených nanovláken PLA-PTX(10) nalevo, PLA-PTX-PEG(20) napravo. Zvětšení obrázků SEM je 5 000 ×. Zdroj: (Hobzová et al., 2019)

### 3.2 HPLC metoda pro stanovení PTX

Pro stanovení koncentrace PTX byla použita metoda HPLC s UV detekcí. K HPLC-UV analýzám byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Shimadzu UFLC složený z odplyňovače (Shimadzu DGU-20A<sub>5</sub>), vysokotlaké pumpy mobilní fáze (Shimadzu LC-20AD), automatického dávkovače s termostatem (Shimadzu SIL-20A), detektoru s diodovým polem (Shimadzu SPD-M20A), termostatu pro ohřev kolony (Shimadzu CTO-20AC) a modulu pro komunikaci s počítačem (Shimadzu CBM-20A). Pro sběr dat a jejich vyhodnocení byl použit software LC Solution.

Byla použita chromatografická kolona Astentic Express C18 (150 x 3,0 mm, 5 μm) (Sigma-Aldrich, Německo, Darmstadt). Jako mobilní fáze byla použita voda/acetonitril (50/50 v/v) s průtokem 0,5 ml/min. Teplota kolony byla udržována na 35 °C. Objem nástřiku vzorku na kolonu byl 10 μl. Pro stanovení PTX byla nastavena vlnová délka 227 nm. Takto optimalizovaná HPLC metoda poskytla retenční čas 4 min a symetrický tvar píku PTX (Hampejsova et al., 2019).

Pro sestavení kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci PTX byl připraven zásobní roztok PTX o koncentraci 1 mg/ml navážením 10 mg PTX

a jeho rozpuštěním v 10 ml methanolu. Následně byla připravena řada roztoků PTX o koncentraci 0,1; 1; 5 a 10  $\mu\text{g/ml}$  ředěním zásobního roztoku PTX methanolem.

Pro sledování uvolňování PTX z nanovláken do roztoku PBS byla sestrojena kalibrační závislost plochy píku na koncentraci PTX v roztoku PBS. Byl připraven zásobní roztok PTX o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  rozpuštěním 0,01 g PTX ve 300  $\mu\text{l}$  DMSO a následným smícháním s roztokem PBS s 0,5% přídavkem Tween 80. Ředěním tohoto roztoku roztokem PBS s 0,5% přídavkem Tween 80 byla připravena série kalibračních roztoků o koncentracích 0,1; 1; 5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.3 Stanovení celkového množství PTX v PLA nanovláčkách

Pro stanovení celkového množství PTX v PLA nanovláčkách byla použita metoda extrakce PTX do methanolu. Tento experiment byl proveden v temperované třepačce (IKA KS 4000i control) při teplotě 37 °C a při 120 otáčkách za minutu.

Pro každé stanovení bylo z PLA nanovláken vyraženo 5 kruhových terčů o průměru 13 mm. Tyto terče byly zváženy pro určení teoretického množství PTX a následně byly vloženy do 10 ml methanolu. Vzorky byly umístěny do temperované třepačky na 24 hodin. Po 24 hodinách byly roztoky methanolu pětkrát a desetkrát zředěny. Bylo odebíráno vždy 100  $\mu\text{l}$  alikvotu pro ředění 10x a 200  $\mu\text{l}$  alikvotu pro ředění 5x. Následně byly vzorky analyzovány metodou HPLC (popsanou v oddíle 3.2). Celkové množství PTX bylo stanoveno u všech studovaných PLA nanovláčkách v pentaplikátu. Výsledky byly statisticky zpracovány.

### 3.4 Příprava hydrogelů a stanovení stupně botnání v rovnovážném stavu

#### 3.4.1 Příprava pHEMA-MA hydrogelů s různým obsahem MA

Byly připraveny 4 polymerizační směsi o obsahu MA 1, 3, 5 a 10 hmot. % pro porovnání stupně botnání hydrogelu v rovnovážném stavu.

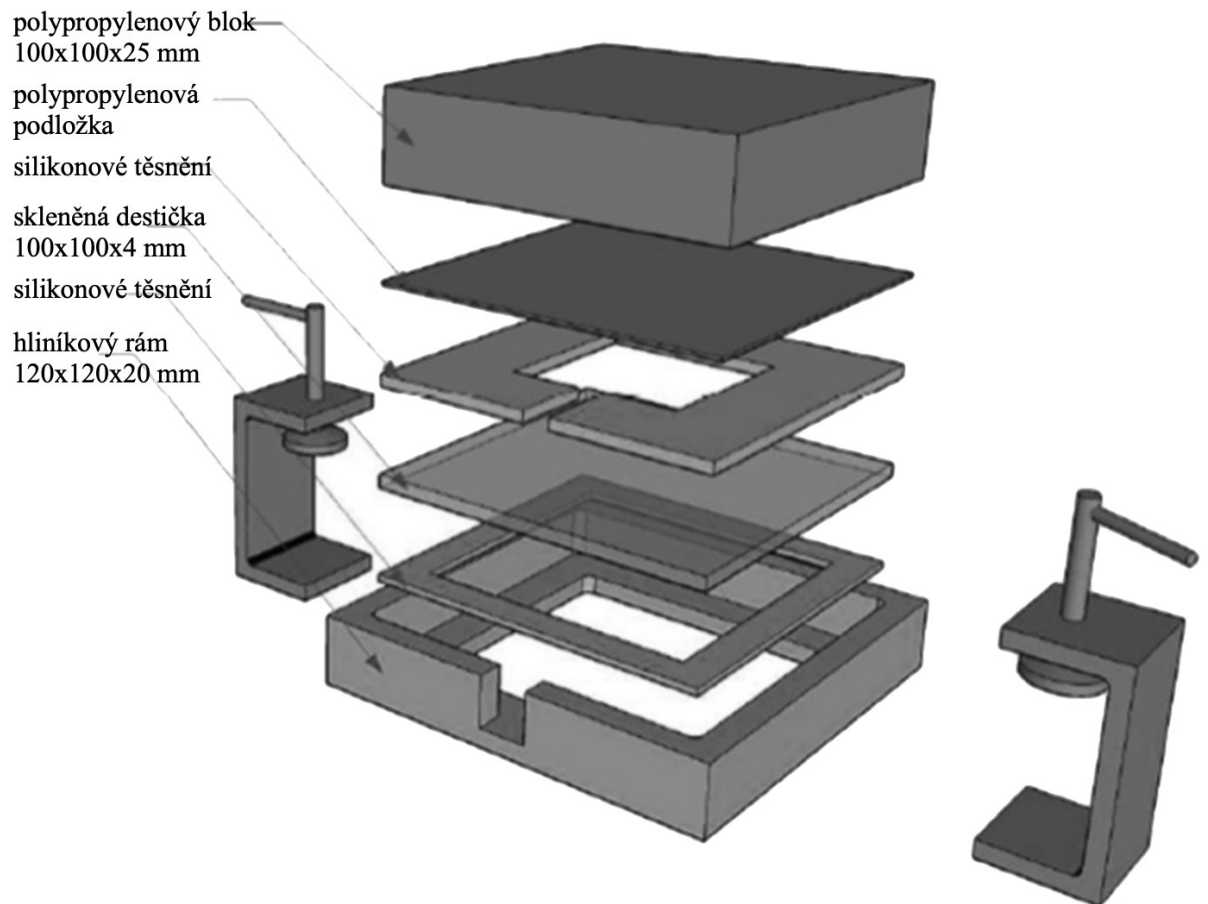
K přípravě pHEMA-MA hydrogelů byla použita radikálová polymerizace s UV iniciací. Polymerizační směsi obsahovaly HEMA/destilovaná voda v poměru 60/40 (m/m), 1, 3, 5 nebo 10 hmot. % MA, 0,5 hmot. % síťovacího činidla EDMA (vzhledem k celkovému množství monomerů HEMA a MA), 0,5 % iniciátoru Darocur (vzhledem k celkovému množství HEMA, MA a EDMA). Polymerizační směsi byly probublávány po dobu 5 minut dusíkem pro odstranění kyslíku, který je inhibítozem radikálové polymerizace. Následně byly tyto polymerizační směsi vpraveny injekční stříkačkou do formy, jejíž schéma je znázorněné na obrázku 4. Tloušťka silikonového těsnění umístěného mezi skleněnou destičkou a polypropylenovou podložkou určovala tloušťku vzniklého hydrogelu. V této práci byla pro přípravu hydrogelů použita tloušťka silikonového těsnění 0,5 mm nebo 1,0 mm. Po naplnění forem byly směsi polymerizovány za použití UV lampy ReptiGlo 8.0 (60 W) po dobu 20 minut. Poté byly vzniklé hydrogely vyjmuty z formy a vloženy do nádoby s destilovanou vodou po dobu 1 týdne k vymytí nízkomolekulárních reziduí po polymeraci a také k dosažení rovnovážného stavu zbotnání.

### 3.4.2 Stanovení stupně botnání pHEMA-MA hydrogelů

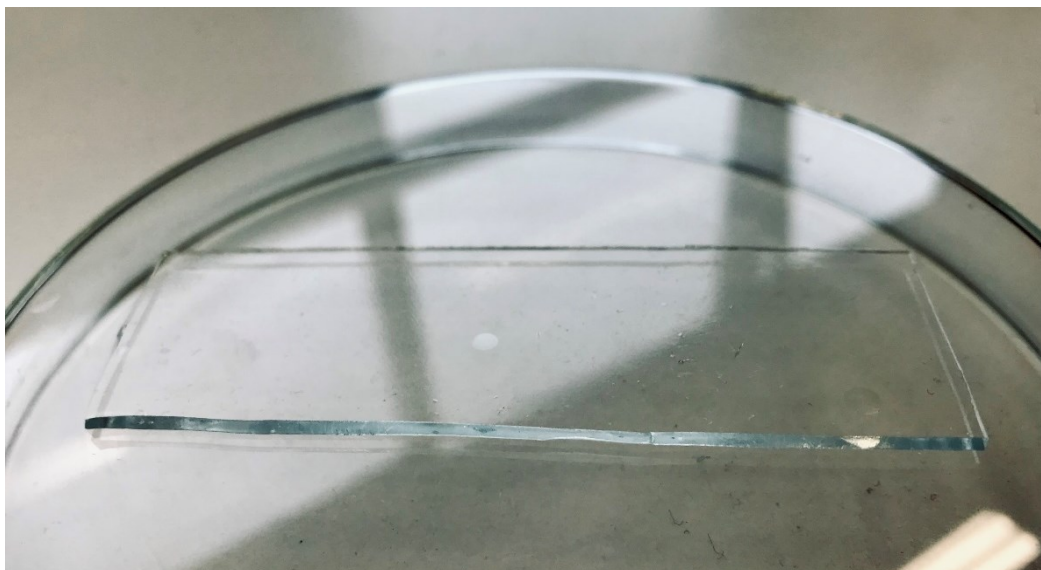
Z každého typu rovnovážně zbotnalého hydrogelu bylo vystřiženo 6 čtverců o rozměrech 20 x 20. Tyto čtverce byly osušeny otřením o vnitřní stranu paže, jelikož tato metoda poskytovala nejreprodukovatelnější výsledky. Hydrogely byly zváženy a ponechány schnout 2 dny na vzduchu. Poté byly vzorky hydrogelů umístěny do vakuové sušárny a sušeny při teplotě 70 °C a tlaku 30 mBar do konstantní hmotnosti. Následně byly vzorky vloženy do 0,5 % roztoku NaHCO<sub>3</sub> pro převedení jednotek MA ve strukturu hydrogelu do disociované sodné formy. Po dosažení rovnovážného zbotnání v NaHCO<sub>3</sub> (za dobu 4 dnů) byly hydrogely osušeny výše uvedeným způsobem, zváženy a následně vloženy do roztoku PBS na dobu 1 týdne. Hydrogely byly vyjmuty z roztoku PBS, osušeny a opět zváženy. Stupeň botnání (SB) hydrogelů v jednotlivých vodných roztocích byl vypočítán podle rovnice

$$SB (\%) = (m_b - m_s) / m_b \times 100$$

kde  $m_b$  je hmotnost rovnovážně zbotnalého hydrogelu a  $m_s$  hmotnost vysušeného hydrogelu. Výsledky byly statisticky zpracovány a hodnota SB je uvedena jako průměrná hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n = 6$ ).



Obrázek 4: Schéma formy pro přípravu hydrogelů



Obrázek 5: Fotografie připraveného pHEMA-MA hydrogelu o obsahu MA 5% po botnání v destilované vodě,  $\text{NaHCO}_3$  a PBS s Tween 80 a po nařezání na proužky

### 3.4.3 Příprava pHEMA-MA hydrogelu pro experiment s uvolňováním PTX

K přípravě hydrogelů pro experiment uvolňování PTX z PLA nanovláken do pHEMA-MA hydrogelů byl vybrán hydrogel s 5% obsahem MA. Hydrogely byly připraveny postupem popsáním v oddíle 3.4.1.

Po vymytí reziduí po polymerizaci v destilované vodě byly hydrogelové fólie ponořeny do 0,5% roztoku  $\text{NaHCO}_3$  k převedení jednotek MA ve strukturu hydrogelu do sodné formy. Po 5 dnech byly fólie přendány do roztoku PBS s 0,5% obsahem Tween 80 na dobu 1 týdne. Fólie byly skalpelem rozřezány na proužky o rozměrech 2,5 x 8 cm (obr. 5) a uchovány v roztoku PBS s Tween 80 po další týden.

### 3.4.4 Příprava pHEMA hydrogelu

V rámci experimentu porovnání sorpce PTX do hydrogelů byl připraven pHEMA hydrogel o tloušťce 0,5 a 1 mm.

Nejprve byla připravena polymerizační směs HEMA/destilovaná voda v poměru 60/40 (m/m) obsahující 0,5 hmot. % síťovacího činidla EDMA

(vzhledem k celkovému množství HEMA), 0,5 % iniciátoru Darocur (vzhledem k celkovému množství HEMA a EDMA). Tato polymerizační směs byla probublávána po dobu 5 minut dusíkem a vpravena injekční stříkačkou do forem znázorněných na obrázku 3.1. Tloušťka těsnění určující tloušťku připraveného hydrogelu byla 0,5 a 1 mm. Směs byla polymerizována za použití UV lampy ReptiGlo 8.0 (60 W) po dobu 30 minut. Připravené hydrogely byly vyjmuty z formy a ponořeny do destilované vody po dobu 1 týdne k vymytí nízkomolekulárních reziduí po polymeraci a k dosažení rovnovážného stavu zbotnání. Následně byly hydrogely přebotnány po dobu 1 týdne v roztoku PBS s 0,5 % obsahem Tweenu 80.

### 3.5 Uvolňování PTX z PLA nanovláken do PBS

Pro studium kinetiky uvolňování PTX z PLA nanovláken do PBS v režimu průběžné výměny pufru bylo z PLA nanovláken vyraženo 5 kruhových terčíků o průměru 13 mm. Tyto terčíky byly zváženy pro určení celkového teoretického množství PTX v nanovlákněch. Terčíky byly vloženy do 5 ml PBS s 0,5 % Tween 80 a umístěny do temperované třepačky (IKA KS 4000i control) při teplotě 37 °C a při 120 ot/min. Po časových intervalech 0,5; 2; 4; 6 a 24 h od ponoření terčíků do roztoku byl z roztoku odebrán 1 ml pro stanovení PTX. Pro stanovení PTX uvolněného z PLA-PTX-PEG(20) nanovláken byl odebraný vzorek roztoku PBS 5x zředěn pro dosažení koncentrace PTX v rozmezí kalibrační křivky. V těchto vzorcích byla stanovena koncentrace PTX metodou HPLC s UV detekcí popsanou v oddílu 3.2. Odebrané množství roztoku bylo po každém intervalu nahrazeno 1 ml čerstvého PBS s 0,5 % Tween 80.

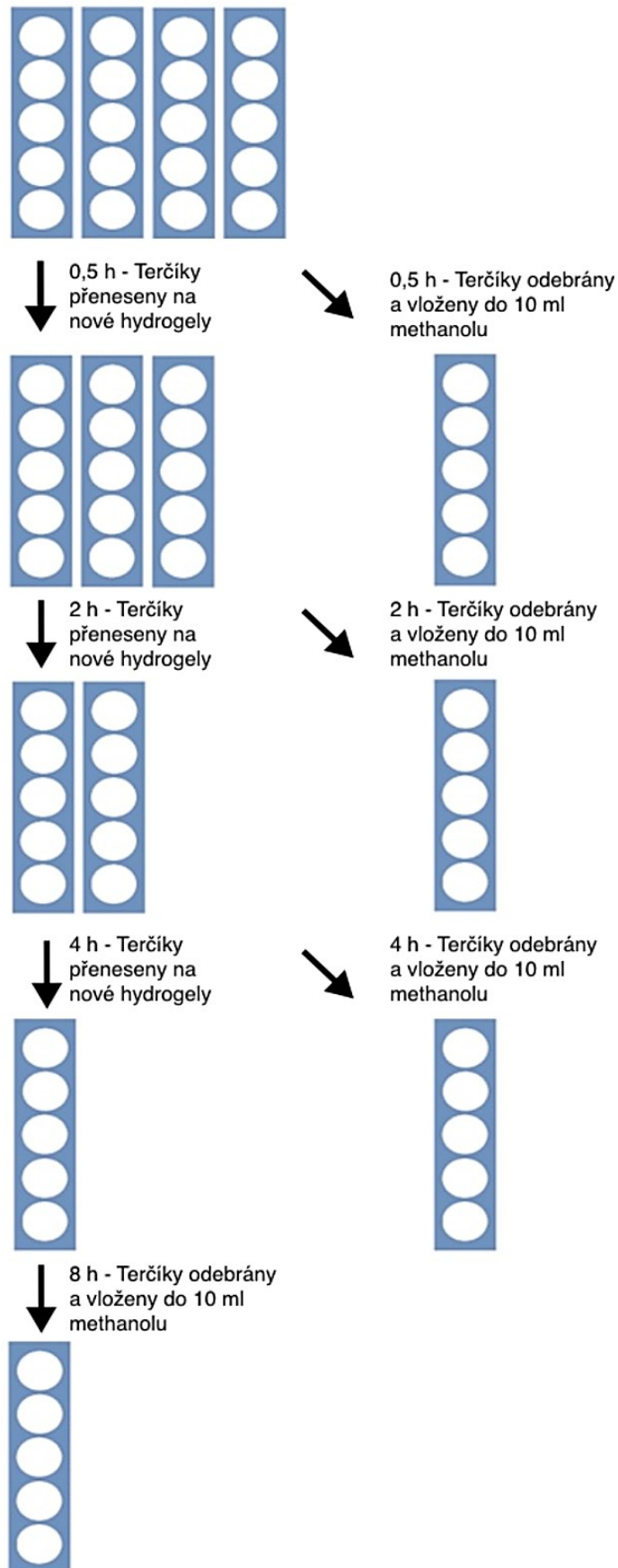
Pro tento experiment byla sledována degradace PTX v roztoku s PBS s 0,5 % Tween 80 o koncentracích 1 a 10 µg /ml PTX za stejných experimentálních podmínek jako pro uvolňování PTX z nanovláken do PBS. Vliv degradace PTX na jeho koncentraci ve vzorcích byl zohledněn při zpracování výsledků.

Experiment byl proveden na všech studovaných PLA nanovlákněch v triplicátu. Výsledky byly statisticky zpracovány.

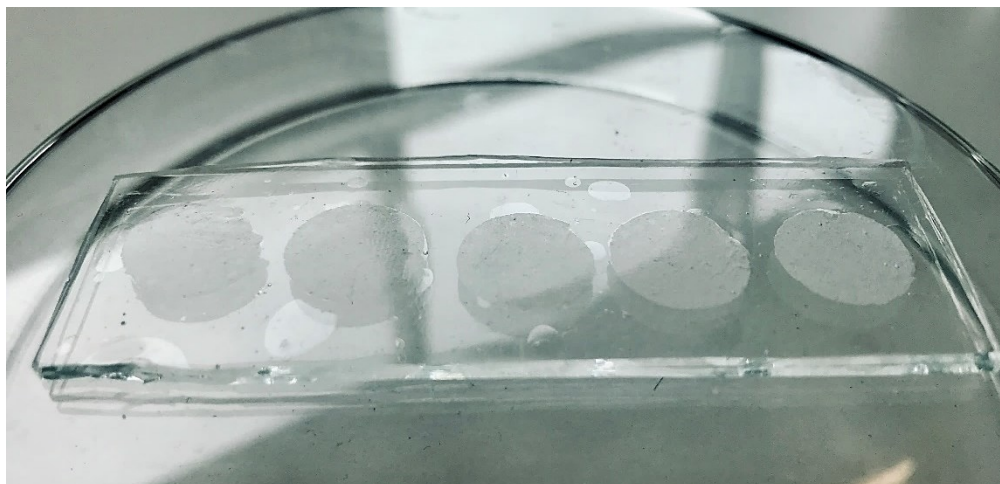
### 3.6 Měření uvolňování PTX z PLA nanovláken do pHEMA-MA hydrogelů

Pro studium uvolňování PTX do hydrogelů byly použity tři typy PLA nanovláken, které obsahovaly 10 hmot. % PTX, druhý vzorek obsahoval ještě 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa a třetí vzorek nanovláken obsahoval navíc 13,3 hmot. % CD.

Ze studovaných PLA nanovláken bylo vyraženo 5 terčíků o průměru 13 mm. Tyto terčíky byly zváženy pro určení celkového teoretického množství PTX v nanovlákních. Z hydrogelových proužků byla odstraněna povrchová voda otřením hydrogelu o vnitřní stranu paže. Mezi každé dva hydrogelové proužky bylo umístěno 5 terčíků nanovláken (obr. 6). Hydrogely s terčíky byly umístěny do plastových pytlíků a do vodní lázně v temperovaném inkubátoru (IKA KS 4000i control) na 37 °C po dobu 0,5; 2; 4 a 8 hodin. Po každém časovém intervalu byly terčíky nanovláken přeneseny na nové hydrogelové proužky. Detailní schéma postupu je zobrazeno na obrázku 7. Pro časový úsek 8 hodin bylo také změřeno kumulativní množství uvolněného PTX, tedy bez výměny hydrogelů. Po uplynutí časových intervalů byly terčíky přeneseny do 10 ml methanolu a umístěny do temperované třepačky (IKA KS 4000i control) na 24 hodin při 120 otáčkách za minutu, aby došlo k extrakci zbylého PTX z nanovláken do methanolu. Po 24 hodinách bylo odebráno 100 a 200 µl alikvotu a roztok byl naředěn 10x a 5x. Následovala analýza roztoků metodou HPLC s UV detekcí popsanou v oddílu 3.2 pro stanovení zbytkového množství PTX v nanovlákních terčících. Pro každý časový úsek byl tento experiment proveden ve 3 opakováních. Bylo vypočteno, jaké množství PTX se z PLA nanovláken uvolnilo do hydrogelů a výsledky byly statisticky zpracovány.



Obrázek 7: Schéma postupu experimentu uvolňování PTX do hydrogelů.



Obrázek 6: Terčíky nanovláken vložené mezi dva pHEMA-MA hydrogelové proužky

### 3.7 Sorpce PTX do pHEMA a pHEMA-MA hydrogelů

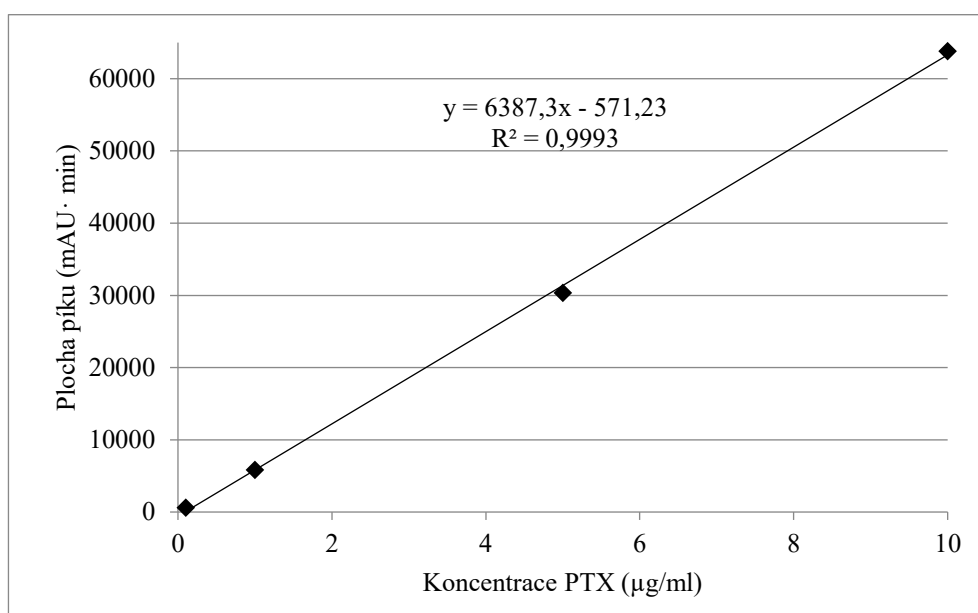
Pro studium kinetiky sorpce PTX do pHEMA a pHEMA-MA hydrogelů o obsahu MA 1, 3, 5 a 10 hmot. % byl z každého typu hydrogelu vyražen terčík o průměru 12,5 mm. Stupeň zbotnění studovaných hydrogelů byl stanoven metodou popsanou v oddíle 3.4.2. Hydrogelový terčík byl zvážen a z jeho povrchu byla odstraněna tekutina otřením terčíku o vnitřní stranu paže. Následně byl terčík vložen do roztoku PTX o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  v PBS s 0,5 % Tween 80. Terčíky v roztoku PTX byly umístěny do temperované třepačky (IKA KS 4000i control) při 37 °C a 120 otáčkách za minutu. Po časových intervalech 0,5; 2; 4; 6 a 24 h bylo z roztoku odebráno 100  $\mu\text{l}$  vzorku. Tento vzorek byl naředěn 100  $\mu\text{l}$  PBS s 0,5 % Tween 80 a následně v něm byla stanovena koncentrace PTX HPLC metodou popsanou v oddílu 3.2. Po 24 hodinách byl terčík osušen a vložen do 3 ml methanolu na dalších 24 hodin. Následně bylo stanoveno množství PTX uvolněné do methanolu.

Byla také sledována degradace PTX v roztoku s PBS s 0,5 % Tween 80 o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  PTX za stejných experimentálních podmínek jako pro sorpci PTX do hydrogelů. Vliv degradace PTX na jeho koncentraci ve vzorcích byl zohledněn při zpracování výsledků. Pro každý hydrogel bylo měření provedeno v triplikátu. Výsledky byly statisticky zpracovány.

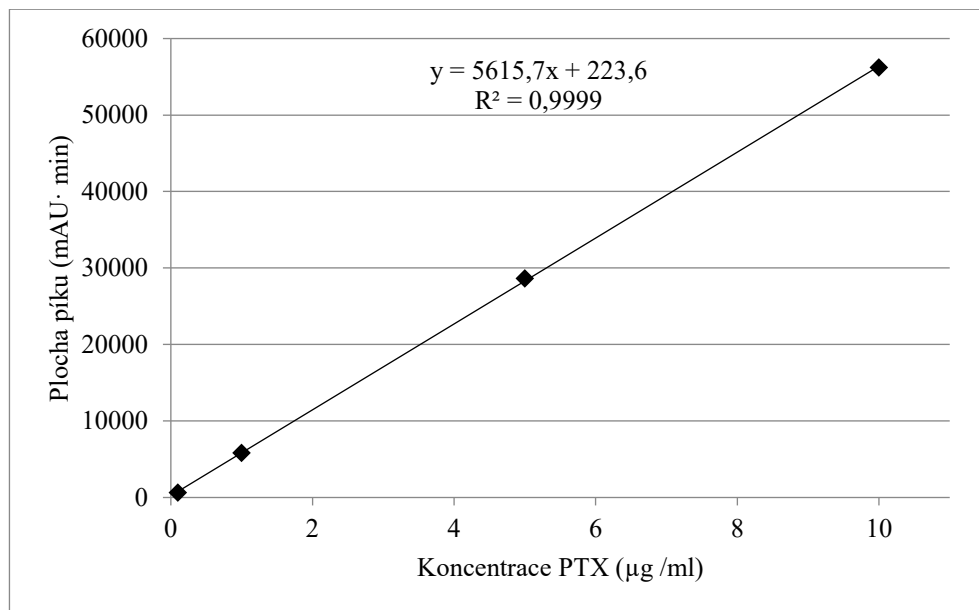
## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Kalibrační křivka v methanolu a PBS

Optimalizovanou HPLC metodou byly stanoveny kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci PTX v roztoku methanolu a v roztoku PBS s 0,5 % Tween 80. Tyto kalibrační závislosti byly změřeny pro 4 koncentrace, a to 0,1; 1; 5; 10  $\mu\text{g/ml}$ . Na obrázku 8 je uveden graf kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci PTX v roztoku methanolu. Na obrázku 9 je uveden graf kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci PTX v roztoku PBS s 0,5 % Tween 80. Obě kalibrační závislosti byly lineární v celém uvedeném rozsahu koncentrací.



Obrázek 8: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci PTX v roztoku methanolu.



Obrázek 9: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci PTX v roztoku PBS s 0,5 % Tween 80.

Pro každou koncentraci roztoku PTX byla plocha píku změřena třikrát. Výsledky byly statisticky zpracovány v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2: Statistické vyhodnocení kalibrační závislosti plochy píků na koncentraci PTX v roztoku methanolu ( $n = 3$ ).

| Koncentrace (µg/ml) | Plocha píku (mAU·min) | $s_r$ | RSD (%) |
|---------------------|-----------------------|-------|---------|
| 0,1                 | 608                   | 44,5  | 7,3     |
| 1                   | 5801                  | 39,2  | 0,7     |
| 5                   | 30322                 | 550   | 1,8     |
| 10                  | 63819                 | 758   | 1,2     |

Tabulka 3: Statistické vyhodnocení kalibrační závislosti plochy píků na koncentraci PTX v roztoku PBS s 0,5 % Tween 80 ( $n = 3$ ).

| Koncentrace (µg/ml) | Plocha píku (mAU·min) | $s_r$ | RSD (%) |
|---------------------|-----------------------|-------|---------|
| 0,1                 | 621                   | 41,2  | 6,6     |
| 1                   | 5838                  | 30,1  | 0,5     |
| 5                   | 28629                 | 65,0  | 0,2     |
| 10                  | 56218                 | 194   | 0,4     |

## 4.2 Stanovení celkového množství PTX v PLA nanovlákních

Množství uvolněného PTX ze studovaných nanovláken do methanolu jsou uvedena v tabulce 4. Tímto experimentem bylo potvrzeno, že nanovlákná neobsahují všechny PTX, který byl přidán do polymerační směsi při výrobě nanovláken. Nejspíše tedy došlo k degradaci PTX ve struktuře nanovláken. Nižší procento PTX v nanovlákních mohlo být také ovlivněno procesem zvláknování, kdy poměr jednotlivých složek ve vyrobených vlákních nebyl úplně totožný se poměrem ve zvláknované směsi. Celková množství PTX ve studovaných nanovlákních, stanovená v tomto experimentu, byla použita pro výpočet teoretického množství PTX obsaženého v nanovlákních terčích v následujících experimentech.

Pro každá PLA nanovlákná bylo měření provedeno pětkrát, výsledky byly statisticky zpracovány.

Tabulka 4: Stanovené množství PTX v PLA nanovlákních ( $n = 5$ ).

| Typ nanovláken       | Teoretické množství PTX v nanovlákních (%) | Skutečné množství PTX v nanovlákních (%) | $s_r$ | RSD (%) |
|----------------------|--|--|-------|---------|
| PLA-PTX              | 10   | 8,44                                     | 0,24  | 2,8     |
| PLA-PTX-PEG (20 kDa) | 10   | 8,54                                     | 0,24  | 2,9     |
| PLA-PTX-CD           | 10   | 7,98                                     | 0,08  | 1,0     |

## 4.3 Stanovení stupně botnění pHEMA-MA hydrogelů

Pro každý hydrogel o určitém obsahu MA byl vypočítán stupeň botnění z hmotnosti hydrogelu po jeho usušení do konstantní hmotnosti ve vakuové sušičce a z hmotnosti hydrogelu v jeho rovnovážně zbotnalém stavu v destilované vodě, v roztoku  $\text{NaHCO}_3$  a PBS.

Množství MA v hydrogelu ovlivňuje stupeň botnění. Pokud je MA v nedisociované formě, platí, že botnavost s rostoucím množstvím MA nepatrně klesá. Po převedení karboxylových funkčních skupin do sodné formy roztokem  $\text{NaHCO}_3$  se výrazně zvyšuje stupeň botnění hydrogelu a platí, že čím větší množství MA hydrogel obsahuje, tím více botná.

Pro experimenty uvolňování PTX z PLA nanovláken do hydrogelů byl jako nejvhodnější vybrán hydrogel s obsahem MA 5 % obsahující ve zbotnalém stavu v PBS 76,0 % vodné složky, jelikož celkový obsah vody v lidském těle se pohybuje okolo 60 %. Tkáně jako jsou svaly, srdce, mozek, plíce, ledviny nebo kůže obsahují 70-85 % vody (Medical News Today, 2020).

Tabulka 5: Stupeň botnání v destilované vodě, v 0,5 % NaHCO<sub>3</sub> a v roztoku PBS pro jednotlivé HEMA-MA hydrogely ( $n = 6$ ).

| Typ hydrogelu | SB – H <sub>2</sub> O (%) | $s_r$ | SB – NaHCO <sub>3</sub> (%) | $s_r$ | SB – PBS (%) | $s_r$ |
|---------------|---------------------------|-------|-----------------------------|-------|--------------|-------|
| HEMA-MA 1 %   | 40,0                      | 0,3   | 52,1                        | 0,2   | 48,6         | 0,0   |
| HEMA-MA 3 %   | 39,0                      | 0,2   | 73,3                        | 0,2   | 67,0         | 0,2   |
| HEMA-MA 5 %   | 37,7                      | 0,1   | 81,7                        | 0,1   | 76,0         | 0,1   |
| HEMA-MA 10 %  | 35,6                      | 0,2   | 88,4                        | 0,1   | 84,5         | 0,1   |

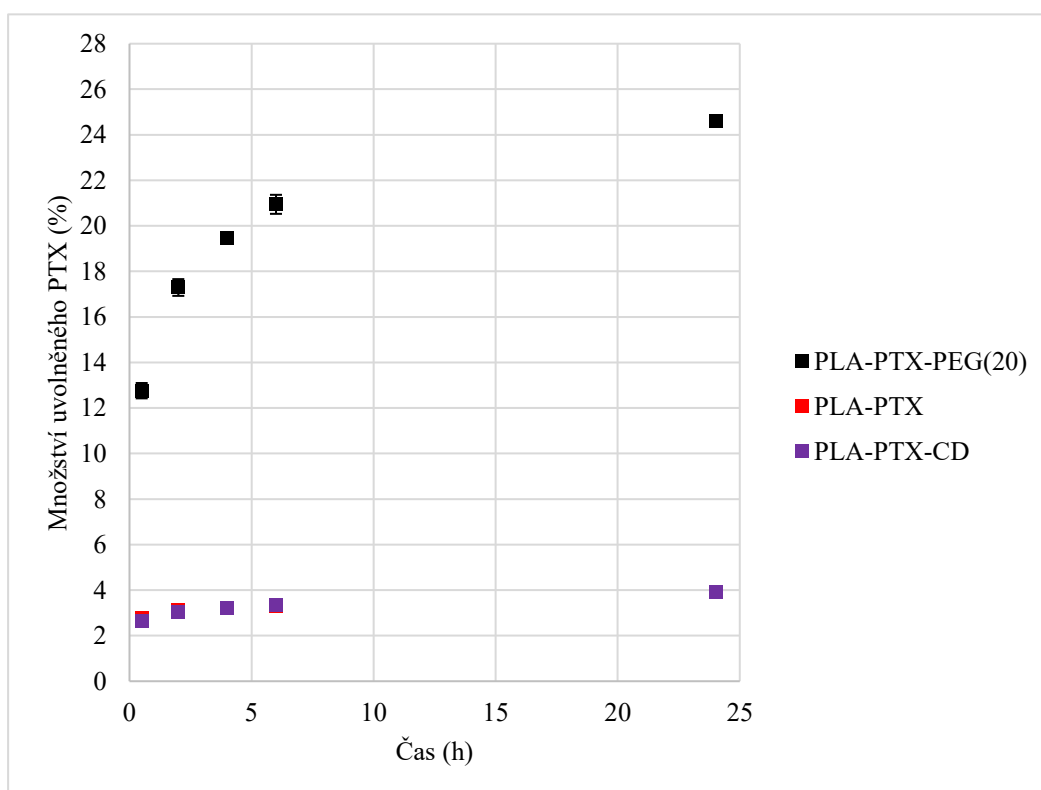
#### 4.4 Uvolňování PTX z PLA nanovláken do PBS

Byla studována kinetika uvolňování PTX z PLA nanovláken do PBS s 0,5 % Tween 80 za průběžné výměny pufru. PBS jako médium pro uvolňování hydrofobního PTX bylo použito pro srovnání s uvolňováním PTX do pHEMA-MA hydrogelů. V tomto experimentu bylo potvrzeno, že do hydrofilního média, jako je PBS, se uvolnilo výrazně méně PTX než do hydrogelů.

Na obrázku 10 je znázorněn graf, který porovnává množství uvolněného PTX ze tří typů nanovláken do PBS s 0,5 % Tween 80. Je patrné, že z nanovláken obsahujících PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa se uvolnilo výrazně více PTX než ze zbylých 2 typů nanovláken. Zároveň došlo u tohoto typu nanovláken k prodloužení doby uvolňování PTX. Rychlost uvolňování PTX z PLA-PTX-PEG byla také po celou dobu experimentu několikanásobně vyšší, než u ostatních typů studovaných nanovláken. Při uvolňování PTX z PLA-PTX-CD a PLA-PTX nanovláken došlo po 24 hodinách k uvolnění necelých 4 % inkorporovaného PTX. Pokud se srovná rychlost uvolňování PTX z PLA-PTX-CD, tak se na počátku experimentu uvolňovalo o více než 4000 ng/h PTX více, než v případě PLA nanovláken bez obsahu CD.

Tabulka 6: Porovnání rychlosti uvolňování PTX z nanovláken do PBS s 0,5 % Tween 80 pro PLA-PTX-PEG nanovláčka (obsahující 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa), PLA-PTX nanovláčka (obsahující 10 hmot. % PTX) a PLA-PTX-CD nanovláčka (obsahující 10 hmot. % PTX a 13,3 hmot. % CD).

| Doba uvolňování | Rychlost uvolňování PTX (ng/h) |                 |            |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|------------|
|                 | PLA-PTX                        | PLA-PTX-PEG(20) | PLA-PTX-CD |
| 0-0,5           | 10847                          | 128164          | 14967      |
| 0,5-2           | 410                            | 15172           | 768        |
| 2-4             | 114                            | 5391            | 239        |
| 4-6             | 70                             | 3784            | 209        |
| 6-24            | 64                             | 1019            | 86         |



Obrázek 10: Graf závislosti množství uvolněného PTX z nanovláček do PBS s 0,5 % Tween 80 na čase pro PLA-PTX-PEG nanovláčka (obsahující 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa), PLA-PTX nanovláčka (obsahující 10 hmot. % PTX) a PLA-PTX-CD nanovláčka (obsahující 10 hmot. % PTX a 13,3 hmot. % CD). Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ( $n = 3$ ).

## 4.5 Měření uvolňování PTX z PLA nanovláken do pHEMA-MA hydrogelů

V tomto experimentu byla studována kinetika uvolňování PTX z PLA nanovláken do hydrogelů na bázi pHEMA-MA s obsahem kyseliny methakrylové 5 hmot. % a síťovacího činidla EDMA 0,5 hmot. %.

Důvodem pro použití hydrogelů jako prostředí pro uvolňování PTX byla snaha přiblížit podmínky uvolňování léčiva reálnému prostředí organismu. V předchozích experimentech uvolňování PTX z PLA nanovláken byl jako prostředí často používán roztok PBS. V tomto prostředí však dochází k nežádoucí konvekci vodné fáze v okolí nosiče léčiva.

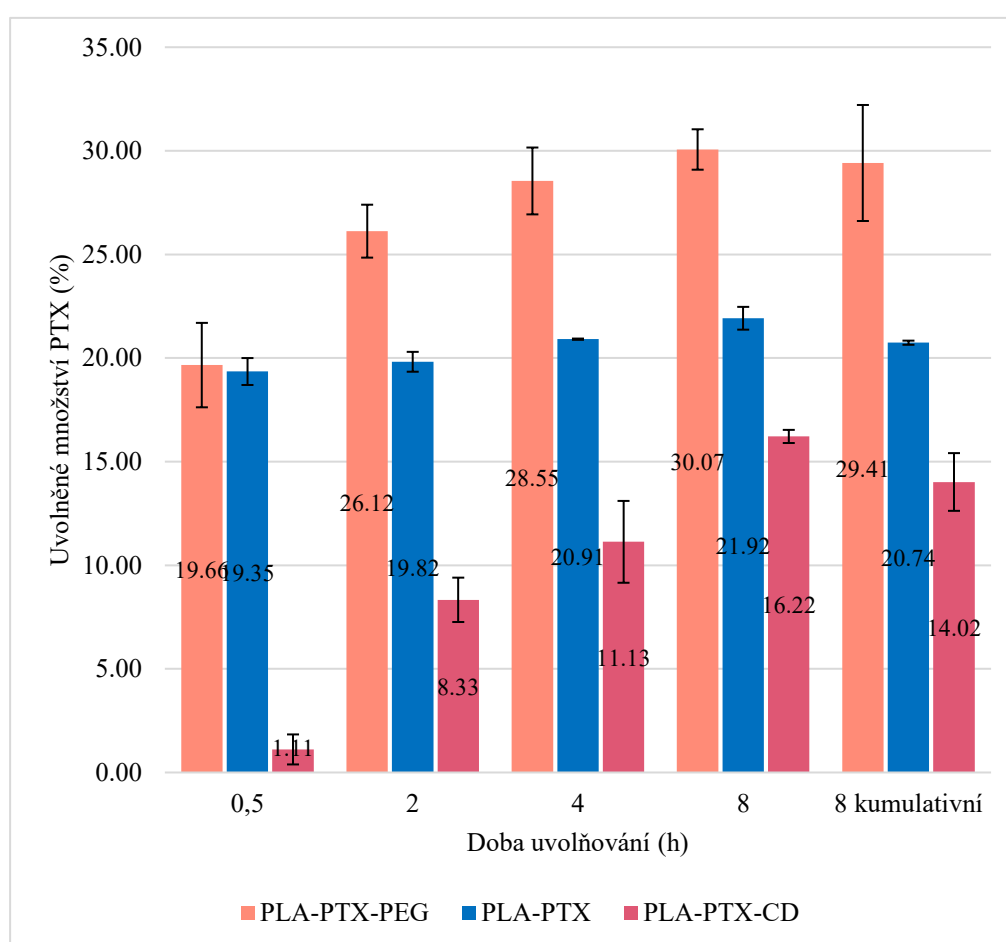
Na obrázku 11 je znázorněn graf, který porovnává množství PTX uvolněného ze třech typů nanovláken do hydrogelů. Je patrné, že z PLA-PTX nanovláken neobsahující PEG došlo během půl hodiny k uvolnění relativně velkého množství PTX. V dalších hodinách se pak uvolnilo už jen nepatrné množství dalšího PTX. V případě nanovláken obsahujících PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa došlo k počátečnímu rychlému uvolnění PTX během půl hodiny. Množství PTX uvolněného do hydrogelu se však v následujících hodinách zvyšovalo, až dosáhlo uvolnění přibližně 30 hmot. % z celkového množství inkorporovaného PTX. U nanovláken bez obsahu PEG toto množství činilo pouze přibližně 22 hmot. %. Je tedy zřejmé, že přítomnost PEG výrazně zvýšila množství PTX uvolněného ze studovaných nanovláken. Došlo také k prodloužení doby uvolňování léčiva v porovnání s nanovláknými obsahujícími pouze PTX.

Rychlé uvolnění PTX v počátcích experimentu u obou druhů vláken je pravděpodobně způsobeno uvolněním PTX z povrchu nanovláčenného nosiče. Amfifilní PEG je ve vodě rozpustný polymer schopný interagovat i s molekulami PTX a tím umožnit jejich transport do vodného prostředí. Při jeho vymytí dále dochází ke zvětšení povrchu PLA nosiče léčiva (Hobzova et al., 2019). Tímto způsobem PEG zvyšuje uvolňování hydrofobních léčiv jako je PTX.

V případě PLA-PTX-CD nanovláken se z počátku uvolňovalo jen velmi malé množství PTX, které se v průběhu následujících hodin zřetelně zvyšovalo. Nicméně, po 8 hodinách uvolněné množství PTX však dosáhlo pouze 16,22 % z celkového množství PTX, které nanovláčka obsahovala. U tohoto typu

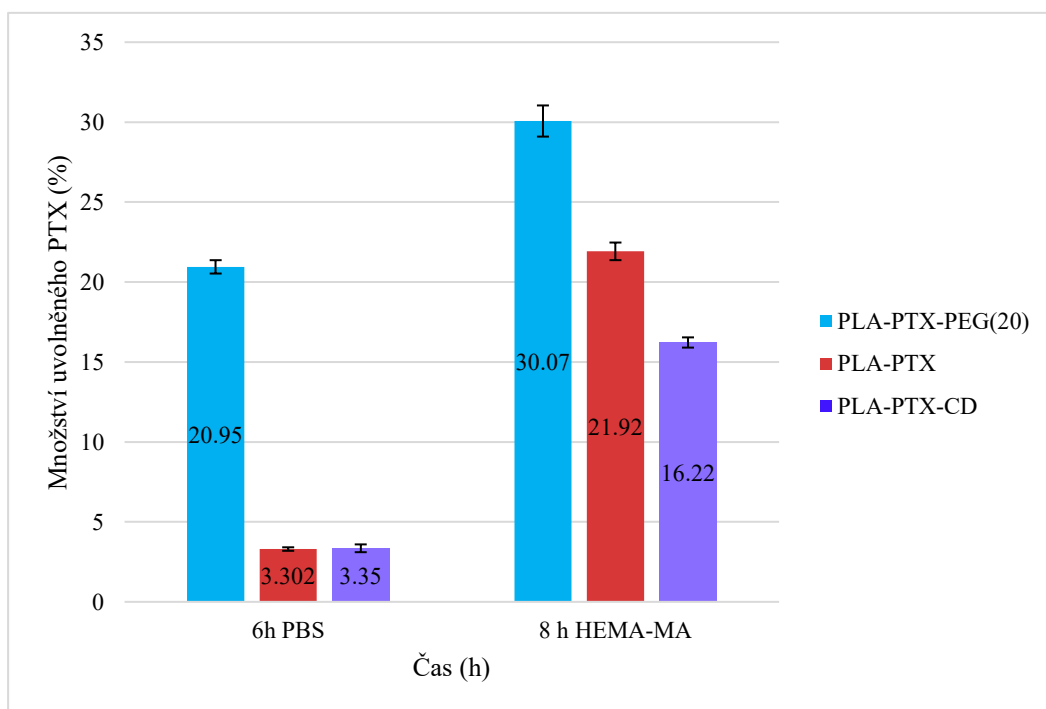
nanovláken by bylo vhodné prodloužit čas experimentu, jelikož je možné, že by v následujících hodinách uvolněné množství PTX stále narůstalo.

Rozdíl mezi množstvím uvolněného PTX v módu s postupnou výměnou hydrogelů a v kumulativním módu nebyl pro PLA-PTX-PEG nanovláčka statisticky významný, dá se konstatovat, že koncentrační gradient nehraje u tohoto systému zásadní roli. Pro PLA-PTX a PLA-PTX-CD nanovláčka se nepatrně více PTX uvolnilo v režimu průběžného vyměňování hydrogelů, nicméně se nejednalo o statisticky významný rozdíl. Lze tedy konstatovat, že ani po 8 h nedošlo k nasycení hydrogelových vzorků léčivem.



Obrázek 11: Porovnání uvolněného množství PTX z PLA-PTX-PEG nanovláken (obsahujících 10 hmot. % PTX a 15 hmot. % PEG o molekulové hmotnosti 20 kDa), PLA-PTX nanovláken (obsahujících 10 hmot. % PTX) a PLA-PTX-CD nanovláken (obsahujících 10 hmot. % PTX a 13,3 hmot. % CD) do HEMA-MA hydrogelů s postupnou výměnou hydrogelů a v kumulativním módu. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ( $n = 3$ ).

Množství uvolněného PTX z nanovláken do pHEMA-MA hydrogelů o obsahu MA 5 % bylo porovnáno s množstvím PTX uvolněného do PBS s 0,5 % Tween 80. Dle grafického znázornění na obrázku 12 došlo po 8 hodinách v případě PLA-PTX-PEG(20) nanovláken k uvolnění o 9,12 procentního bodu více PTX do pHEMA-MA oproti PBS. V případě PLA-PTX a PLA-PTX-CD nanovláken byl tento rozdíl ještě výraznější. Z PLA-PTX nanovláken se do pHEMA-MA uvolnilo o 18,6 procentního bodu více PTX než do PBS. V případě PLA-PTX-CD nanovláken tento rozdíl činil 12,9 procentního bodu.



Obrázek 12: Porovnání množství uvolněného PTX po 6 a 8 hodinách z nanovláken.

## 4.6 Sorpce PTX do pHEMA a pHEMA-MA hydrogelů

Pro studium hydrogelů jako možných nosičů léčiv pro lokální aplikace, tak pro vysvětlení rozdílů v uvolňování léčiv do roztoků a do hydrogelů simulujících *in vivo* prostředí, byla sledována jejich sorpční kapacita. V tabulce 7 jsou uvedeny hodnoty sorpčních kapacit studovaných hydrogelů včetně následného uvolněného množství PTX do methanolu. Na obrázku 13 jsou znázorněné profily sorpce PTX do hydrogelů v čase.

Z výsledků experimentu vyplývá, že nejvyšší sorpční kapacitou disponoval pHEMA hydrogel o obsahu MA 1 %. Naopak nejnižší sorpční kapacitu vykazoval pHEMA hydrogel o obsahu MA 10 %. Je patrné, že s obsahem MA v hydrogelu jeho sorpční kapacita pro hydrofobní PTX výrazně klesá. Tato skutečnost koreluje s již zmíněným faktem, že po převedení jednotek MA v pHEMA-MA hydrogelu do sodné formy dochází ke značnému nárůstu stupně botnání. Platí, že čím větší množství MA hydrogel obsahuje, tím více botná, výsledný hydrogel v rovnovážně zbotnaném stavu je tedy více hydrofilní s nižší afinitou vůči hydrofobnímu léčivu

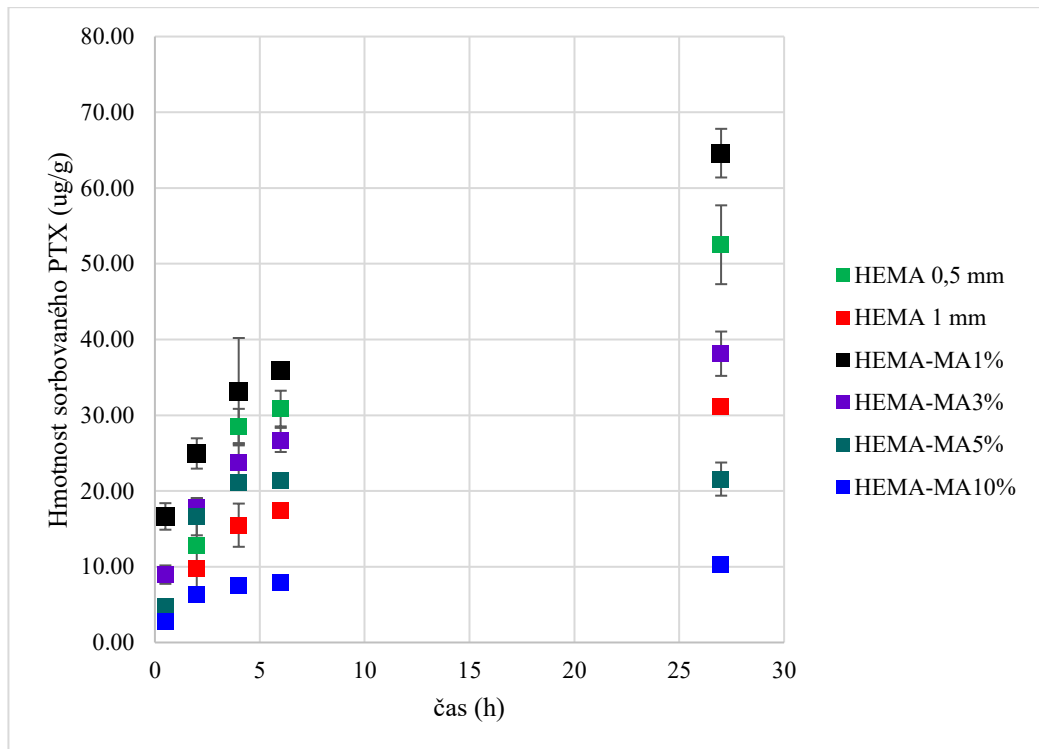
Dále bylo zjištěno, že tenčí pHEMA hydrogelové fólie, při jehož přípravě bylo použito těsnění o tloušťce 0,5 mm vykazoval vyšší sorpční kapacitu vztaženou na hmotnost hydrogelu, než pHEMA hydrogel při jehož přípravě bylo použito těsnění o tloušťce 1 mm. Dá se konstatovat, že terčíky připravené ve formě s 1mm těsněním mají při přibližně stejném povrchu dvounásobnou hmotnost, tedy poloviční poměr povrchu a hmotnosti oproti terčikům připraveným ve formách s poloviční tloušťkou těsnění. Hmotnosti sorbovaného PTX vztaženého na hmotnost rovnovážně zbotnaného hydrogelu jsou u tlustších terčiků také přibližně poloviční (viz tab. 5). Z toho se dá usuzovat, že zásadní podíl na sorpci PTX má povrch nosiče, v porovnání s jeho inkorporací do celého objemu hydrogelu.

Při následné desorpci PTX z hydrogelů do methanolu se z pHEMA-MA o obsahu MA 5 a 10 hmot. % neuvolnil žádný PTX. Pro pHEMA-MA o obsahu MA 1 a 3 hmot. % se neuvolnilo přibližně 30 – 40  $\mu\text{g/g}$  PTX. Pravděpodobně dochází k částečnému ireverzibilnímu navázání PTX do struktury hydrogelu. Z hydrogelů pHEMA se téměř všechny sorbovaný PTX uvolnil, dá se tedy

konstatovat, že PTX interaguje s karboxylovými funkčními skupinami MA komonomeru.

Tabulka 7: Porovnání sorpční kapacity pHEMA hydrogelů (připravených s těsněním formy 0,5 a 1 mm) a pHEMA-MA hydrogelů o obsahu MA 1, 3, 5 a 10 hmot. % (připravených s těsněním formy 0,5 mm) vztažené na hmotnost hydrogelů rovnovážně zbotnalých v PBS. Porovnání uvolněného množství PTX z hydrogelů do methanolu pro různé typy hydrogelů, hmotnost PTX byla vztažena na hmotnost hydrogelu zbotnalého v PBS ( $n = 3$ ).

| Typ hydrogelu            | Hmotnost sorbovaného PTX vztažená na hmotnost hydrogelu ( $\mu\text{g/g}$ ) | Hmotnost PTX uvolněného z hydrogelu vztažená na hmotnost hydrogelu ( $\mu\text{g/g}$ ) |
|--------------------------|---|--|
| pHEMA 0,5 mm tl.         | $52.5 \pm 5.20$   | $53.0 \pm 0.88$  |
| pHEMA 1 mm tl.           | $31.2 \pm 0.87$   | $27.6 \pm 0.63$  |
| pHEMA-MA 1 % 0.5 mm tl.  | $64.6 \pm 3.21$   | $22.3 \pm 1.28$  |
| pHEMA-MA 3 % 0.5 mm tl.  | $38.1 \pm 2.93$   | $8.11 \pm 1.08$  |
| pHEMA-MA 5 % 0.5 mm tl.  | $21.6 \pm 2.19$   | $0.00 \pm 0.00$  |
| pHEMA-MA 10 % 0.5 mm tl. | $10.2 \pm 0.20$   | $0.00 \pm 0.00$  |



Obrázek 13: Sorbované množství PTX do pHEMA hydrogelů a pHEMA-MA hydrogelů o obsahu MA 1, 3, 5 a 10 % z roztoku PTX o koncentraci 10 µg/ml připraveného v PBS s 0,5 % Tween 80 vztažené na hmotnost hydrogelu zbotnalého v PBS. Chybové úsečky byly sestrojeny pomocí směrodatných odchylek ( $n = 3$ ).

## 5 Závěr

Hydrogely pHEMA-MA byly připraveny a charakterizovány pro studium těchto materiálů jako možného testovacího média pro systémy lokální aplikace protinádorových léčiv. Byl zkoumán vliv přídavku MA do polymerizační směsi na stupeň botnění hydrogelu. Bylo zjištěno, že čím vyšší je obsah sodné formy MA v hydrogelu, tím více hydrogel ve vodném roztoku botná.

PLA nanovláknina byla studována jako nosič hydrofobního protinádorového léčiva, PTX, jehož lokální aplikace by mohla významně omezit vedlejší účinky spojené se systémovou aplikací a při tom zvýšit jeho koncentraci a dobu působení v cílových nádorových tkáních. Dále byl zkoumán vliv přídavku PEG a CD do struktury nanovláken pro optimalizaci uvolňování PTX z nanovláknenných nosičů. Analytickou metodou HPLC s UV detekcí byla sledována kinetika uvolňování PTX z nanovláken do hydrogelů a do PBS. Bylo prokázáno, že z nanovláken se do pHEMA-MA uvolnilo výrazně více léčiva než do PBS. Při experimentech uvolňování PTX z nanovláken do hydrogelů i do PBS bylo potvrzeno, že přídavek PEG do struktury nanovláken výrazně zvyšuje množství uvolněného PTX a zároveň také prodlužuje dobu, po kterou se léčivo uvolňuje. V experimentu s nanovlákninami obsahujícími CD bylo patrné počáteční rychlejší uvolňování PTX do PBS oproti nanovlákninám obsahujícím pouze PTX. Celkově se však do PBS z obou typů nanovláken uvolnilo srovnatelné množství léčiva. Do hydrogelů se z nanovláken obsahujících CD uvolnilo z počátku velmi malé množství PTX, které se však během následujících hodin znatelně zvyšovalo. Celkem ale množství uvolněného PTX nedosáhlo množství PTX uvolněného z ostatních typů nanovláken.

Za použití metody HPLC s UV detekcí byla studována také sorpce a desorpce PTX do hydrogelů pHEMA a pHEMA-MA o různém obsahu MA. Bylo zjištěno, že největší sorpční kapacitu vykazoval pHEMA-MA hydrogel o obsahu MA 1 % a že s rostoucím obsahem MA v hydrogelu sorpční kapacita pro hydrofobní PTX výrazně klesá. Z výsledků experimentu se dá také usuzovat, že zásadní podíl na sorpci PTX má povrch nosiče. Při desorpci PTX z pHEMA-MA nedošlo k uvolnění velké části PTX na rozdíl od hydrogelů pHEMA. Dá se tedy konstatovat, že PTX interaguje s karboxylovými funkčními skupinami MA a dochází tak k částečnému ireverzibilnímu navázání PTX do struktury hydrogelu.

## 6 Literatura

T. AMNA, N. A. M. BARAKAT, M. S. HASSAN, M. S. KHIL, H. Y. KIM, Camptothecin loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone)nanofibers via one-step electrospinning and their cytotoxicity impact. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, **431**. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.04.026

U. AGGARWAL, A. K. GOYAL, G. RATH, Development and characterization of the cisplatin loaded nanofibers for the treatment of cervical cancer. *Material Science Engineering: C*, 2017, **75**, 125–132. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.013

S. H. ASWATHY, U. NARENDRAKUMAR A I. MANJUBALA: Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon*, 2020, **6**. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03719

Biogelx, 3D in-vitro tumor models are changing cancer research. *Peptide hydrogel and bioink manufacturer*, Biogelx. <https://www.biogelx.com/3d-in-vitro-tumor-models-are-changing-cancer-research/> (citováno 15. 11. 2020)

G. BOCCI, A. DI PAOLO, R. DANESI. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis*, 2013, **16**. DOI: 10.1007/s10456-013-9334-0

D. BUENGER, F. TOPUZ, J. GROLL. Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science*, 2012, **37**, 1678-1719. DOI: 0.1016/j.progpolymsci.2012.09.001

J. CHEN, L. LI, J. GAO, Biomaterials for local drug delivery in central nervous system, *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, **560**. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.071

F. CROISIER, C. JÉROME. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 2013, **49**, 780-792. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009

N. L. ELSTAD, K. D. FOWERS. OncoGel (ReGel/paclitaxel) — Clinical applications for a novel paclitaxel delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61. DOI: 10.1016/j.addr.2009.04.010

Z. HAMPEJSOVÁ, J. BATĚK, J. ŠIRC, R. HOBZOVÁ, Z. BOSÁKOVÁ, 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**. DOI: 10.1007/s00706-019-02469-5

R. HOBZOVÁ, Z. HAMPEJSOVÁ, T. ČERNÁ, J. HRABETA, K. VENCLÍKOVÁ, J. JEDELSKÁ, U. BAKOWSKY, Z. BOSÁKOVÁ, M. LHOTKA, S. VACULÍN, M. FRANĚK, M. STEINHART, J. KOVÁŘOVÁ, J. MICHÁLEK, J. ŠIRC, 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 & Engineering C*, 2019, **98**. DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.046

S. HOFFMAN, Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**, 3-12. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00239-3

H. HOLBACK, Y. YEO A K. PARK. Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications. *Biomedical Hydrogels*, 2011, **2011**, 3-24. DOI: 10.1533/9780857091383.1.3

US Pat 7585437B2. O. JIRSAK, F. SANETRNIK, D. LUKAS, V. KOTEK, L. MARTINOVA, J. CHALOUPEK: *Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method*. 2009.

D. S. KATTI, K. W. ROBINSON, F. K. KO, C. T. LAURENCIN. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2009, **70B**, 286-296. DOI: 10.1002/jbm.b.30041

F. KAYACI, O.C.O. UMU, T. TEKINAY, T. UYAR. Antibacterial electrospun poly(lactic acid) (PLA) nanofibrous webs incorporating triclosan/cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**. DOI: 10.1021/jf400440b

E. LARRAÑETA, S. STEWART, M. ERVINE, R. AL-KASASBEH, R. F. DONNELLY, Hydrogels for hydrophobic drug delivery. Classification, synthesis and applications. *Journal of Functional Biomaterial*, 2018, **9**. DOI: 10.3390/jfb9010013

J. MICHALEK, M. PRADNY, K. DUSEK, M. DUSKOVA, R. HOBZOVA, J. SIRC: Hydrogels in biology and medicine. New York, Nova Science Publishers, Inc. 2010.

B. MISHRA, M. UPADHYAY, S. K. REDDY ADENA, B. G. VASANT, M. S. MUTHU, Hydrogels: An introduction to a controlled drug delivery device, synthesis and application in drug delivery and tissue engineering. *Austin Journal of Biomedical Engineering*, 2017, **4**.

S. PALMIERI, M. PIERPAOLI, L. RIDERELLI, S. QI, M. L. RUELLO, Preparation and characterization of an electrospun PLA-cyclodextrins composite for simultaneous high-efficiency PM and VOC removal. *Journal of Composites Science*, 2020, **4**. DOI: 10.3390/jcs4020079

N. A. PEPPAS, P. BURES, W. LEOBANDUNG, H. ICHIKAWA. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, **50**, 27-46. DOI: 10.1016/s0939-6411(00)00090-4

O. PEREAO, C. BODE-ALUKO, K. LAATIKAINEN, A. N. NECHAEV, L. F. PETRIK. Morphology, modification and characterisation of electrospun polymer nanofiber adsorbent material used in metal ion removal. *Journal of Polymers and the Environment*, 2019, **27**. DOI: 10.1007/s10924-019-01497-w

L. POLÁKOVÁ, J. ŠIRC, R. HOBZOVÁ, A. COCÂRȚĂ, E. HEŘMÁNKOVÁ, Electrospun nanofibers for local anticancer therapy: Review of in vivo activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, **558**. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.059

E. K. ROWINSKY, R. C. DONEHOWER, Paclitaxel (Taxol). *The New England Journal of Medicine*, 1995, **332**, 1004-1014. DOI: 10.1056/NEJM199504133321507

M. R. SINGH, S. PATEL, D. SINGH. Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering. *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*, Elsevier, 2016, **5**, 231-260. DOI: 10.1016/B978-0-323-42865-1.00009-X

C. SISSONS, *What percentage of the human body is water?* Medical News Today. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/what-percentage-of-the-human-body-is-water#where-in-the-body> (citováno 3. 6. 2021)

J. ŠIRC, R. HOBZOVÁ, N. KOSTINA, M. MUNZAROVA, M. JUKLÍČKOVÁ, M. LHOTKA, Š. KUBINOVÁ, A. ZAJÍCOVÁ, J. MICHÁLEK, Morphological characterization of nanofibers: Methods and application in practice, *Journal of Nanomaterials*, 2012, **2012**. DOI:10.1155/2012/327369

B. V. SLAUGHTER, S. S. KHURSHID, O. Z. FISHER, A. KHADEMHOSEINI, N. A. PEPPAS. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 2009, **21**. DOI: 10.1002/adma.200802106

TRUDIČOVÁ, Monika. Komplexní strukturní charakterizace semi-interpenetrovaných biopolymerních hydrogelů. Brno, 2018. Dostupné z

[https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=170470](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=170470)  
. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická. Ing. Petr Sedláček, Ph.D (citováno 9. 11. 2020)

Y. Y. TSENG, S. J. LIU. Nanofibers used for the delivery of analgesics. *Nanomedicine*, 2015, **10**. DOI: 10.2217/nnm.15.23

F. ULLAH, M. BISYRUL, F. JAVED, Z. AHMAD, H. 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

K. VARAPRASAD, G. M. RAGHAVENDRA, T. JAYARAMUDU, M. M. YALLAPU A R. SADIKU: A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering*, 2017, **79**. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.096

Y. WANG, S. MIRZA, S. WU, J. ZENG, W. SHI, H. BAND, V. BAND, B. DUAN, 3D hydrogel breast cancer models for studying the effects of hypoxia on epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, 2018, **9**. DOI: 10.18632/oncotarget.25891

B. A. WEAVER, How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2014, **25**, 2677-2890. DOI: 10.1091/mbc.e14-04-0916