

# NANOVLÁKENNÉ MEMBRÁNY JAKO NOSIČE LÉČIV

Mgr. Petr Vrbata

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

HRADEC KRÁLOVÉ

2015

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

..... Mgr. Petr Vrbata

## **Poděkování**

Chtěl bych tímto poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné rady, pomoc a vřelý přístup v průběhu mého celého doktorského studia. Dále bych rád poděkoval Mgr. Pavlu Berkovi a všem spolupracovníkům na Katedře farmaceutické technologie, se kterými jsem v průběhu doktorského studia spolupracoval. Chtěl bych také poděkovat Ing. Denise Stránské a společnosti Elmarco, s.r.o. za spolupráci a umožnění přípravy nanovlákných membrán.

Děkuji grantovým agenturám za finanční podporu a možnosti prezentace výsledků práce na mezinárodních konferencích. Práce byla podpořena grantem Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260183 a grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy 530812/2012.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Kandidát: Mgr. Petr Vrbata

Školitel: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Název disertační práce: Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv

Nanovláknenné membrány patří v současnosti mezi intenzivně studované a aplikačně velmi rychle se rozvíjející typy materiálů. Jejich vlákna jsou charakterizována dvěma dimenzemi v řádu desítek až stovek nanometrů. Díky obrovskému měrnému povrchu a dalším výhodným vlastnostem našly využití v řadě technických odvětví a jejich využití v oblasti medicíny a farmacie jako nosičů léčiv, krytí ran či podkladů pro kultivaci buněk je v současnosti velmi aktuálním tématem.

V disertační práci jsou zkoumány nově formulované nanovláknenné membrány s obsahem léčiv vytvořené velkoprodukční technologií elektrospiningu z několika vybraných polymerů různorodých vlastností. Cílem bylo experimentálně prozkoumat a případně doložit možný přínos využití nanovláknenných nosičů léčiv pro vybrané aplikační cesty a lékové formy.

Membrány byly charakterizovány skenovací elektronovou mikroskopií a diferenční skenovací kalorimetrií, jež prokázaly úspěšnou inkorporaci léčiv do struktury pravidelných polymerních nanovláken a potvrdily hypotézu o fixaci léčiva ve struktuře nanovláken v podobě nekystalických, tedy amorfních či molekulárních disperzí léčiva.

Liberace léčiv z nanovláknenných membrán byly testovány s použitím akceptorových médií, které simulovaly základní podmínky pro sublingvální nebo perorální podání. Získané výsledky ukázaly na velmi významné rozdíly v rychlosti liberace léčiv a to především v závislosti na vlastnostech polymeru použitým v nanovlákněch jako nosič léčiva. Membrány připravené z hydrofilních polymerů se prezentovaly velmi rychlým uvolňováním testované substance a byly proto dále zvoleny pro formulaci sublingválního přípravku pro podání sumatriptanu a naproxenu. Obě léčiva byla úspěšně inkorporována do struktury nanovláken, a to jak samostatně, tak i v kombinaci. Vytvořené nanovláknenné

stripy v porovnání s roztoky významně zlepšily *in vitro* permeaci obou těchto léčiv přes sublingvální mukózu prasete.

Za velmi významné z praktického hlediska lze rovněž označit dosažení výrazného zlepšení disoluce ve vodě téměř nerozpustného léčiva diosminu jeho inkorporací do nanovláken. Disoluční studie provedené do pufovaných roztoků simulujících intestinální pH prokázaly násobně vyšší množství rozpuštěného léčiva, než při užití práškovaného nebo mikronizovaného léčiva. Navazující *in vivo* studie provedená na krysách poskytla zlepšené farmakokinetické parametry oproti mikronizovanému přípravku.

Získané výsledky rozšiřují dosavadní poznání o vhodnosti využití nanovláken pro formulaci nosiče pro podání léčiv, jako nového typu sublingválního transmukozálního přípravku, nebo jako součást perorálních lékových forem se zlepšenou disolucí a biodostupností ve vodě špatně rozpustných léčiv.

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical technology

Candidate: Mgr. Petr Vrbata

Supervisor: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Title of Doctoral Thesis: Nanofibrous membranes as drug delivery systems

Nowadays, nanofibrous membranes are very quickly developing systems with proportions in nanometre scale. They are intensively studied and used in many technical disciplines, mostly thanks to their unique properties, among them great surface area to volume as a highlight. Their use in the field of biomedicine and pharmacy as drug delivery carriers, wound dressings and tissue engineering scaffolds is currently a topic of great interest.

The doctoral thesis deals with newly formulated drug loaded nanofibrous membranes made of several selected polymers with diverse properties produced by electrospinning technology for large-scale production. The purpose was an experimental investigation and demonstration of potential benefits from application of nanofibrous membranes to selected application sites and dosage forms.

The prepared membranes were evaluated by scanning electron microscopy and differential scanning calorimetry that proved successful incorporation of the drugs into the structure of the polymeric nanofibers. Moreover the measurements proved that the drugs are fixed inside polymeric fibres in a non-crystalline state, as amorphous or molecular dispersions.

The drug release experiments were conducted using buffered solutions mimicking basic conditions of sublingual or oral administration. The obtained results showed significant differences in the drug release rate, depending the most on the polymer used as a carrier. Membranes made of hydrophilic polymers released drugs very quickly that is why hydrophilic polymers were selected for formulation of membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. Both the drugs were successfully incorporated into the structure of nanofibres separately and in their combination too.

*In vitro* permeation studies using a porcine sublingual mucosa showed improvements in the permeation rate of both of the drugs, when the nanofibrous carrier was used as the donor comparing to drug solutions.

Very important finding from practical point of view was achieved in the dissolution studies of the poorly water-soluble drug diosmin. Incorporation into polymeric nanofibres by electrospinning resulted in a great dissolution improvement. The experiments conducted in buffered solutions, simulating intestinal pH, showed significantly higher levels of the dissolved drug compared to powdered and micronized drug forms. The following *in vivo* bioavailability study performed on rats resulted in improved pharmacokinetic parameters of nanofibrous drug carrier in comparison with commercially available micronized drug dosage form.

The results obtained in the study broaden the knowledge and prove the suitability of nanofibrous membranes for the formulation of drug delivery carriers. The most suitable applications are novel mucosal – sublingual preparation and oral dosage form with improved dissolution of poorly soluble drugs.

# Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	5
Seznam obrázků.....	10
Seznam tabulek.....	13
Seznam zkratk.....	14
1. Úvod.....	15
2. Teoretická část.....	16
2.1 Nanovláknna.....	16
2.1.1 Elektrostatické zvlákňování (Elektrospining).....	17
2.1.2 Využití nanovláken.....	24
2.1.3 Nanovláknna jako nosiče léčiv.....	29
2.2 Sublingvální podání léčiv.....	40
2.2.1 Struktura mukózy dutiny ústní.....	40
2.2.2 Permeabilita orální (sublingvální) mukózy a mechanismy transportu léčiv..	42
2.2.3 Optimální vlastnosti sublingvální lékové formy.....	43
2.2.4 Současné lékové formy pro sublingvální aplikaci.....	44
2.2.5 Mukoadheze.....	45
2.2.6 Akceleranty prostupu orální mukózou.....	46
2.2.7 Testování permeace látek orální mukózou <i>in vitro</i> .....	46
2.3 Studovaná léčiva.....	48
2.3.1 Kofein.....	48
2.3.2 Sumatriptan sukcinát.....	49
2.3.3 Naproxen.....	50
2.3.4 Nabumeton.....	51



2.3.5 Diosmin.....	52
2.4 Disoluce léčiv a biofarmaceutický klasifikační systém .....	53
2.5 Polymery .....	54
2.5.1 Chitosan .....	54
2.5.2 Kyselina polyakrylová .....	55
2.5.3 Polyvinylalkohol.....	55
2.5.4 Poly-ε-kaprolakton.....	56
2.5.5 Kyselina polymléčná.....	56
2.5.6 Hydroxypropylcelulosa.....	57
3. Cíle.....	58
4. Materiály a Metody.....	60
4.1 Materiály .....	60
4.1.1 Látky .....	60
4.1.2 Přístroje a zařízení .....	61
4.2 Metody .....	62
4.2.1 Příprava nanovlákných membrán.....	62
4.2.2 Příprava litých membrán.....	63
4.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie .....	63
4.2.4 Diferenční skenovací kalorimetrie .....	64
4.2.5 Liberační experimenty .....	64
4.2.6 Permeační <i>in vitro</i> experimenty .....	64
4.2.7 Testování perorální <i>in vivo</i> biodostupnosti diosminu .....	66
4.2.8 Stanovení léčiv.....	67
5. Výsledky a diskuze .....	69
5.1 Morfologická charakterizace připravených membrán .....	69
5.2 Diferenční skenovací kalorimetrie nanomembrán .....	71
5.2.1 Nanovlákné membrány s obsahem sumatriptanu a naproxenu.....	71

5.2.2 Nanovláknenné membrány s obsahem diosminu.....	74
5.3 Uvolňování kofeinu z nanovláknenných membrán.....	75
5.3.1 Srovnání uvolňování kofeinu z litých a nanovláknenných membrán.....	78
5.4 Formulace nanomembrány pro sublingvální podání léčiv .....	81
5.4.1 Liberace účinných látek z nanovláknenných membrán.....	82
5.4.2 Simultánní uvolňování léčiv .....	85
5.4.3 <i>In vitro</i> permeace přes sublingvální mukózu.....	86
5.5 Zlepšení disoluce špatně rozpustných léčiv .....	95
5.5.1 Nabumeton.....	95
5.5.2 Diosmin.....	97
6. Závěry .....	104
7. Literatura.....	105
8. Seznam prací.....	144
9. Přílohy.....	146
Příloha číslo 1.....	147
Příloha číslo 2.....	156
Příloha číslo 3.....	163
Příloha číslo 4.....	164

# Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b> Struktura nanovlákné membrány. ....	16
<b>Obrázek 2</b> Základní schéma přístroje na provedení elektrospinningu. ....	19
<b>Obrázek 3</b> Nanospider .....	23
<b>Obrázek 4</b> Struktura orální mukózy. Převzato a upraveno z publikace [284]. ....	41
<b>Obrázek 5</b> Strukturní vzorec kofeinu a jeho základní charakteristiky. ....	48
<b>Obrázek 6</b> Strukturní vzorec sumatriptanu sukcinátu a jeho základní charakteristiky. ....	49
<b>Obrázek 7</b> Strukturní vzorec naproxenu a jeho základní charakteristiky. ....	50
<b>Obrázek 8</b> Strukturní vzorec nabumetonu a jeho základní charakteristiky. ....	51
<b>Obrázek 9</b> Strukturní vzorec diosminu a jeho základní charakteristiky. ....	52
<b>Obrázek 10</b> Permeační cela .....	65
<b>Obrázek 11</b> SEM snímky připravených nanovlákných membrán. A: Chitosan – bez léčiva; B: Chitosan – obsahující SUS (5%); C: Chitosan – obsahující NAP (5%); D: PVA – bez léčiva; E: PVA – obsahující SUS (5%); F: PVA – obsahující NAP (5%). ....	69
<b>Obrázek 12</b> Termografické záznamy: A: SUS (krystalický); B: PVA+SUS 20% (nanovlákná membrána); C: PVA (nanovlákná membrána bez léčiva); D: PVA (prášek). ....	72
<b>Obrázek 13</b> Termografické záznamy: A: Naproxen (krystalický); B: PVA+NAP 30 % (nanovlákná membrána); C: PVA+NAP 5 % (nanovlákná membrána); D: PVA (nanovlákná membrána bez léčiva); E: PVA (prášek). ....	73
<b>Obrázek 14</b> Termografické záznamy: A: Naproxen (krystalický); B: Chitosan + naproxen 5% (nanovlákná membrána); C: Chitosan (nanovlákná membrána bez léčiva); D: Chitosan (prášek). ....	73
<b>Obrázek 15</b> Termografický záznam: A: diosmin (krystalický); B: nanovlákná membrána obsahující 15 % diosminu; C: nanovlákná membrána obsahující 30 % diosminu. ....	74
<b>Obrázek 16</b> Uvolňování kofeinu z nanovlákných membrán připravených z 5 polymerů různých vlastností obsahujících 5% kofeinu na hmotnost membrány. ....	77
<b>Obrázek 17</b> Liberace kofeinu z nanovlákných membrán z PAA, obsahujících 5, 10, 20 a 30 % kofeinu na hmotnost membrány. ....	78
<b>Obrázek 18</b> Srovnání liberace kofeinu z nanovlákné a lité membrány vyrobené z PAA a obsahující 10 % kofeinu na hmotnost membrány. ....	79

<b>Obrázek 19</b> Srovnání liberace kofeinu z nanovlakenné a lité membrány, vyrobené z PVA a obsahující 10 % kofeinu na hmotnost membrány. ....	80
<b>Obrázek 20</b> Srovnání liberace kofeinu z nanovlakenné a lité membrány, vyrobené z PLA a obsahující 5 % kofeinu na hmotnost membrány. ....	81
<b>Obrázek 21</b> Liberace SUS z nanovlákných membrán, připravených z PVA, PAA a CHI. ....	82
<b>Obrázek 22</b> Liberace naproxenu z nanovlákných membrán, připravených ze 4 různých polymerů (PCL, PAA, PVA, CHI) s obsahem 5 % NAP na hmotnost membrány. ....	83
<b>Obrázek 23</b> Srovnání uvolňování SUS z nanovlákných membrán z PVA s různým obsahem léčiva. ....	84
<b>Obrázek 24</b> Srovnání uvolňování NAP z nanovlákných membrán z PVA s různým obsahem léčiva. ....	84
<b>Obrázek 25</b> Simultánní liberace SUS a NAPS z vícevrstvé a jednovrstvé nanovlákné membrány z CHI, obsahující 5 % daných léčiv. ....	85
<b>Obrázek 26</b> Permeace sumatriptanu přes sublingvální membránu <i>in vitro</i> (donor roztoky 1% a 6%). ....	86
<b>Obrázek 27</b> Vliv pH donorového roztoku na permeaci sumatriptanu sublingvální mukózou <i>in vitro</i> . ....	87
<b>Obrázek 28</b> Rozdíl v propustnosti sumatriptanu přes zamraženou (Fro-sol) a čerstvou (Fre-sol) sublingvální membránu <i>in vitro</i> . ....	88
<b>Obrázek 29</b> Srovnání permeace sumatriptanu přes sublingvální membránu <i>in vitro</i> . Donory byly nanovlákná membrána (PVA+ SUS 20%, 2 mg), roztok SUS 6% (30 mg), roztok SUS 1% (5 mg). ....	89
<b>Obrázek 30</b> Porovnání permeace sumatriptanu přes sublingvální membránu <i>in vitro</i> . Donory jsou nanovlákná membrána (PVA+SUS 20%, 2 mg), roztok SUS 6% (30 mg), roztok SUS 1% (5 mg). ....	89
<b>Obrázek 31</b> Srovnání permeovaného množství sumatriptanu přes sublingvální mukózu <i>in vitro</i> s využitím různých donorů léčiva: nanovlákná membrána (PVA+SUS 20%), roztok 1% (5 mg) a 6% (30 mg). ....	90
<b>Obrázek 32</b> Permeace naproxenu přes sublingvální membránu <i>in vitro</i> z roztoků o různé koncentraci látky 1% (5mg v donoru), 2% (10 mg), 3% (16 mg) a 10% (50 mg). ....	92
<b>Obrázek 33</b> Srovnání permeace naproxenu přes sublingvální membránu z roztoku (5 mg v donoru) a nanovlákné membrány (nanovlákná s 5 mg NAP). ....	93

<b>Obrázek 34</b> Srovnání množství naproxenu permeovaného přes sublingvální membránu <i>in vitro</i> . Donory jsou roztoky (1, 2, 3 a 10%) a nanovláčenné membrány (PCL-NAP 30%, 5 mg).....	93
<b>Obrázek 35</b> Srovnání disoluce nabumetonu z krystalické látky, nanovláčenného nosiče léčiva a litého filmu s obsahem léčiva. ....	96
<b>Obrázek 36</b> Vliv síťování na množství uvolněného nabumetonu z nanovláčenných membrán, připravených z PAA s 5 % nabumetonu na hmotnost membrány. ....	97
<b>Obrázek 37</b> SEM snímky připravených nanovláčenných membrán s obsahem: A: 15% diosminu, B: 23% diosminu, C: 30% diosminu.....	98
<b>Obrázek 38</b> Liberace diosminu z nanovláčenných membrán, obsahující různé množství inkorporovaného léčiva.....	99
<b>Obrázek 39</b> Uvolňování diosminu z nanovláčenných membrán a pozorovaný „spring effect“.....	100
<b>Obrázek 40</b> Makroskopicky pozorovatelný rozdíl v rozpouštění diosminu z mikronizované (vlevo) a nanovláčenné formy diosminu (vpravo).....	101
<b>Obrázek 41</b> Rozdíl v míře disoluce diosminu ze tří různých forem látky.....	102
<b>Obrázek 42</b> Plasmatické hladiny diosmetinu po perorálním podání jednotlivé dávky mikronizované X nanovláčenné formy diosminu (3,5 mg) krysám. Graf konstruován s úvodní 15 min prodlevou. ....	103

# Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> Souhrn publikovaných nízkomolekulárních látek inkorporovaných do nanovláknenných nosičů.....	33
<b>Tabulka 2</b> Souhrn vysokomolekulárních aktivních látek inkorporovaných do nanovláknenných membrán. ....	38
<b>Tabulka 3</b> Souhrn buněčných a virových organizmů inkorporovaných do nanovláknenných membrán. ....	40
<b>Tabulka 4</b> Souhrn výhodných a nevýhodných vlastností sublingvální mukózy pro transmukozální podání léčiv. ....	43
<b>Tabulka 5</b> Složení HPLC sestavy Agilent Technologies 1200 .....	62
<b>Tabulka 6</b> Průměry vláken připravených nanovláknenných membrán a jejich směrodatné odchylky (n = 30).....	70
<b>Tabulka 7</b> Hodnoty fluxů sumatriptanu a naproxenu vybraných permeačních experimentů .....	94
<b>Tabulka 8</b> Výsledné farmakokinetické parametry, získané z experimentu <i>in vivo</i> . ....	103

## Seznam zkratek

API.....	aktivní farmaceutická substance
BA.....	biodostupnost
BCS.....	biofarmaceutický klasifikační systém
DSC.....	diferenční skenovací kalorimetrie
ECM.....	extracelulární matrix
ES.....	elektrospining
FDA.....	Úřad pro kontrolu léčiv a potravin pro USA
GIT.....	gastrointestinální trakt
HPC.....	hydroxypropylcelulosa
CHI.....	chitosan
IU.....	mezinárodní jednotka
NAP.....	naproxen
NAPS.....	naproxen sodný
NS.....	Nanospider
NSAID.....	nesteroidní protizánětlivé látky
PAA.....	kyselina polyakrylová
PCL.....	poly-ε-kaprolakton
PEG.....	polyethylenglykol
PEO.....	polyethylenoxid
PLA.....	kyselina polymléčná
PVA.....	polyvinylalkohol
Rpm.....	otáčky za minutu
SEM.....	skenovací elektronová mikroskopie
SUS.....	sumatriptan sukcinát

# 1. Úvod

Podání řady potenciálně velmi účinných léčiv do organismu často naráží na některé nepříhodné vlastnosti molekuly daného léčiva. Jsou jimi nejčastěji špatná rozpustnost, nedostatečná absorpce po perorálním podání, velmi krátký biologický poločas, nebo příliš závažné nežádoucí účinky. Některé z těchto nežádoucích vlastností terapeuticky jinak zajímavých látek mohou být redukovány, případně zcela eliminovány vhodným zpracováním a inkorporováním léčiva do příhodné lékové formy, určené k podání do organismu nejvýhodnější aplikační cestou.

Za možné řešení řady problémů, na které v současnosti naráží podání významného počtu nových účinných látek, jsou považovány nanotechnologie. Jsou proto velmi intenzivně studovanou a rozvíjející se oblastí. Nanotechnologie byly definovány jakožto postupy schopné zpracovat substance (hmotu) na atomové a molekulární úrovni do rozměrů od 1 nm do 100 nm v technických oborech, u biologických soustav, tedy i ve farmacii a medicíně v rozměrech do 1000 nm (tedy vlastně celé koloidní oblasti). Cílem je vytvořit materiály a zařízení s podstatně odlišnými vlastnostmi a funkcemi jejich převodem na útvary s alespoň jedním rozměrem v nanometrické oblasti a kontrolou této jejich velikosti [1]. Zpracováním částic látky do nanorozměrných útvarů dochází k výrazným změnám jejich vlastností a chování.

Již v roce 2004 směřovalo do oblasti vývoje nanotechnologií pro farmaceutické a medicínské využití celosvětově okolo 10 miliard dolarů a to jak z průmyslu, tak z vládních prostředků a toto číslo od té doby neustále narůstá [2]. Mezi roky 2000 až 2008 vzrůstalo každým rokem množství nových patentů, finančních prostředků vynaložených na vývoj, pracovníků v těchto odvětvích a objem trhu zhruba o 25 %. Celosvětový trh s produkty obsahujícími nanotechnologie pak v roce 2009 dosáhl okolo 254 miliard dolarů. A předpokladem pro rok 2020 je, že trh s nanotechnologickými produkty dosáhne celosvětově ke třem biliónům dolarů [1].

Z několika možných typů nanomateriálů zkoumaných a v některých případech již využívaných pro podání léčiv, mezi nimiž jsou např. nanočásticové systémy [3,4], nanokrystaly [5–7], lipozómy [8,9], jsme zaměřili náš výzkum na dosud stále unikátní skupinu nanovláken.

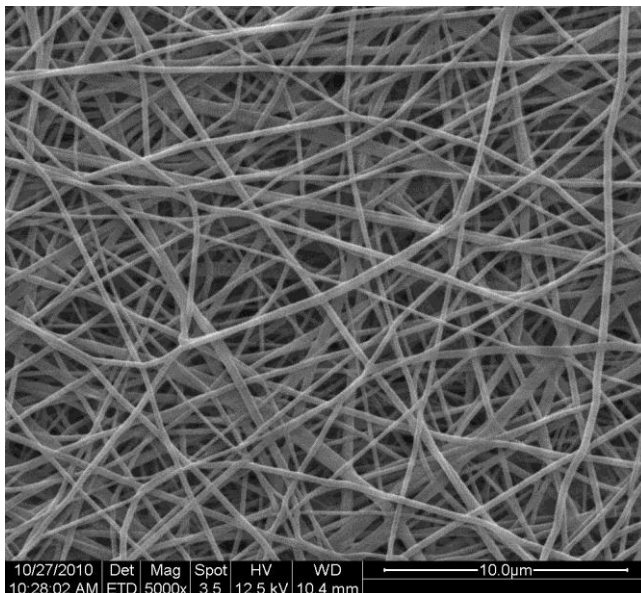


## 2. Teoretická část

### 2.1 Nanovláknna

Nanovláknna jsou vlákna s průměrem řádově od 10 nm do 1 000 nm, nejčastěji pak v rozmezí 200 nm až 800 nm a délkou teoreticky až v kilometrech. Tyto rozměry poskytují nanovláknům jedinečné vlastnosti, z nichž nejvýznamnější, je jejich obrovský povrch ve srovnání s objemem nebo hmotností. Pro příklad 1 g vláken o průměru 10  $\mu\text{m}$  má měrný povrch 0,4  $\text{m}^2/\text{g}$ , zatímco u vláken o průměru 100 nm tento povrch vzrůstá na 40  $\text{m}^2/\text{g}$ . Z toho vyplývá velmi vysoká povrchová energie nanovláknenných soustav [10]. Dále je třeba vyzdvihnout vysokou mechanickou odolnost a vysokou porozitu, ale také podobnost s některými biologickými tkáněmi. Například kolagenní vlákna v organismu mají šířku od 50 nm do 500 nm a struktura nanovláknenných membrán je tak velmi podobná struktuře extracelulární matrix [2].

Nanovláknna se při výrobě shlukují a tvoří útvary – nanovláknenné membrány, což jsou netkané materiály tvořené nejčastěji neuspořádaně orientovanými vlákny. Pro svoje unikátní vlastnosti jsou tyto membrány intenzivně zkoumány v mnoha technických i biologických oborech [2,11,12].



**Obrázek 1** Struktura nanovláknenné membrány.

Nanovláknna mohou být připravena několika způsoby. Jedná se o fázovou separaci, samovolné zvláknění, mezifázovou polymerizaci, syntézu či růst dle předlohy, rychle

spuštěnou polymerizaci, mezifázový přechod pára—kapalina—tuhá látka, nebo hydrotermální syntézu. Nejvšestrannější a proto v současnosti nejvíce studovanou a používanou metodou je elektrostatické zvlákňování [12].

### **2.1.1 Elektrostatické zvlákňování (Elektrospining)**

Elektrospining (ES) je proces využívající elektrostatické síly k tvorbě ultrajemných polymerních vláken. Tato vlákna mohou být tvořena z roztoku či taveniny polymerů a jejich průměr se nejčastěji nachází v rozmezí 100 až 1 000 nm. Byly ale také popsány ES připravená vlákna o průměrech 30 nm či 10  $\mu\text{m}$  [13].

Elektrostatické síly v průběhu ES nahrazují běžnější mechanické síly používané k tvorbě proudu polymeru a snížení velikosti vláken (popř. kapek) [13]. Tyto síly musí být dostatečně velké, aby překonaly povrchové napětí dané kapalinou a mohlo dojít ke vzniku Taylorova kužele, ze kterého pak vychází proud polymeru tvořící následně nanovláknem. ES změnil přípravu nanovláken z finančně a procesně velmi náročné přípravy na relativně nenákladný a dnes již i dobře proveditelný výrobní postup [10,13].

První záznamy o ES pocházejí již z 19. století a první patent byl podán roku 1900. Na rozdíl od elektrostatického sprejování (tzv. electro spraying byl popsán a patentován 1914 autory Zeleny a kol.), které se následně rychle rozvíjelo a brzy našlo i komerční využití a v dnešní době je využíváno v řadě oborů (např. v inkoustových tiskárnách, hmotnostní spektrometrii, vstřikování paliva spalovacích motorů a dalších), výzkum ES a jeho širší využití dlouhou dobu stagnoval [14].

K rozvoji ES přispěl ve 30. letech významným způsobem A. Formhals, když postupně podal na dvacet patentů týkajících se převážně zařízení k jeho provedení. K širšímu využití jím patentovaných přístrojů ale nedošlo, částečně zřejmě i v důsledku započetí druhé světové války [14].

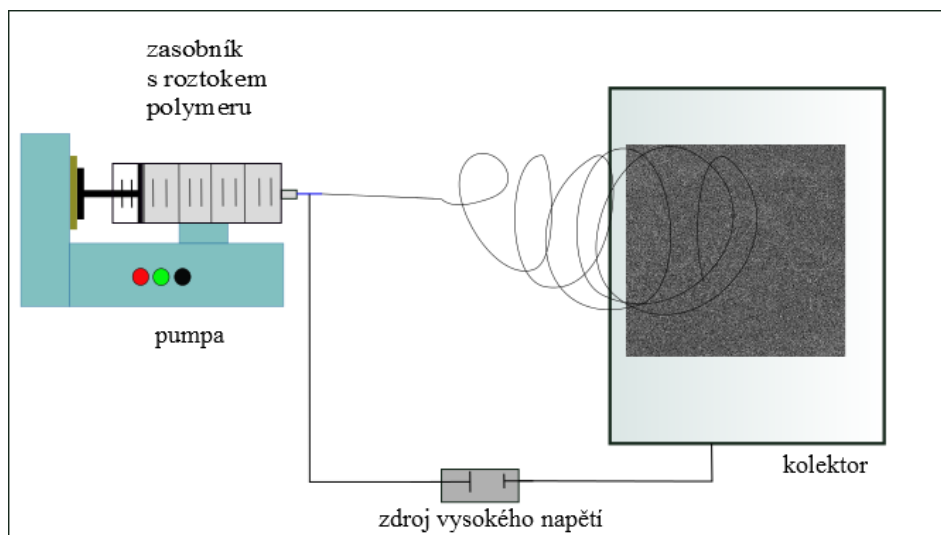
Velmi důležité pro pochopení teoretických principů, a tudíž i provedení ES byly práce G. I. Taylora z 60. let minulého století, ve kterých matematicky vymodeloval tvar kužele, tvořeného kapkou kapalinou ovlivněnou elektrickým polem, známým nyní jako tzv. Taylorův kužel. Z tohoto kužele následně vychází proud polymeru tvořící nanovláknem [14]. Tento krok je označován za klíčový pro průběh a rychlost zvlákňovacího procesu [15].

V raných devadesátých letech minulého století zaměřilo svou pozornost na ES několik vědeckých týmů. Největší rozvoj přinesla skupina kolem prof. Renekera (propagátor pojmu ES), která demonstrovala, že řada organických polymerů může být snadno elektrospiningem přetvořena do nanovláken a popsala řadu parametrů ovlivňujících tento proces [14].

Dalším mezníkem pro širší rozvoj ES byl výsledek práce skupiny O. Jirsáka, jejichž patentovaná řešení, vzniklá Technické univerzitě v Liberci, umožnila výrobu a uvedení na trh unikátního zařízení pro velkoobjemovou výrobu nanovláken, poté komerčně vyráběného firmou Elmarco s.r.o., Liberec pod označením Nanospider™ [16].

V současnosti již bylo popsáno zpracování do nanovláken pomocí ES u většiny lineárních syntetických i přírodních polymerů. Tato metoda je v současnosti velmi široce využitelná a každým rokem narůstá nejen počet publikací a patentů, ale také finálních produktů využívajících polymerních nanovláken připravených ES.

Základní přístroj na provedení ES (**Obrázek 2**) se skládá ze stříkačky = zásobníku naplněného roztokem či taveninou polymeru zakončeného tryskou (jehla či kapilára). Polymerní soustava je ze zásobníku vytlačována pumpou či samovolně vytéká na základě gravitace. Na trysku je připojen zdroj vysokého napětí (obvykle okolo 10 kV, u velkých zařízení 60 až 120 kV), po jehož zapnutí dochází ke vzniku elektrického pole, jež deformuje kapku kapaliny vycházející z trysky. Náboj elektrického pole musí být dostatečně silný, aby překonal povrchové napětí dané kapaliny. Kapka je deformována v kuželovitý útvar (Taylorův kužel), z jehož špičky je tažen proud kapaliny polymeru k opačně nabitému kolektoru. V průběhu letu dochází k odpaření rozpouštědla a vytvoření nanovláken, které se pak náhodně ukládá na opačně nabitým kolektoru, často pro snadnější kolekci nanovlákných produktů překrytém textilií či alobalem [17].



**Obrázek 2** Základní schéma přístroje na provedení elektrospinningu.

Hlavními faktory, které určují proveditelnost ES, jsou zejména vlastnosti roztoku: vodivost a typ použitého polymeru – jeho molekulová hmotnost a koncentrace, ty mají zásadní vliv na viskozitu a povrchové napětí roztoku [18]. U ionogenních polymerů také poloha izoelektrického bodu a aktuální pH soustavy.

Doshi a kol. (1995) stanovili ideální viskozitu roztoku pro ES v rozmezí 800 cP až 4000 cP (mPas). Při hodnotách pod 800 cP nedochází k dostatečnému proplétání řetězců polymeru a vlákna nejsou tvořena, případně je proud polymeru nestabilní a je přerušován. Při hodnotách nad 4000 cP je již velmi obtížné překonat povrchové napětí roztoku prakticky aplikovatelným elektrickým napětím [18,19].

Dalšími důležitými faktory pro provedení ES jsou hydrostatický tlak v trysce, elektrický potenciál na špičce trysky, ale také teplota, vlhkost a proudění vzduchu v komoře přístroje [20].

Vlastnosti výsledných nanovláken, především se jedná o průměr vláken a homogenitu, lze ovlivnit velikostí ukládaného elektrického napětí, vzdáleností kolektoru, vlastnostmi polymerního roztoku (viskozita, povrchové napětí, vodivost, pH) a teplotou. Nejvíce je průměr vláken ovlivněn viskozitou, to znamená, že pro daný polymer a rozpouštědlo má vliv koncentrace polymeru v roztoku. Čím vyšší je koncentrace roztoku, tím bude vyšší průměr výsledných vláken. Vyšší vodivost roztoku naopak snižuje průměr tvořených vláken. Teplota zde hraje také svou roli, neboť se vzrůstající teplotou klesá viskozita roztoku. Dalším významným parametrem je elektrický proud. Se zvyšujícím se

aplikovaným proudem klesá průměr tvořených vláken. Proud je možno ovlivnit (snížit, navýšit) velikostí aplikovaného napětí a vodivostí roztoku [20,21].

Vzdáleností kolektoru lze ovlivnit průměr vláken v tom směru, že se vzrůstající vzdáleností roste průměr tvořených nanovláken, neboť klesá intenzita elektrického pole. Vzdálenost mezi kolektorem a tryskou však musí být dostatečně velká, aby se rozpouštědlo stihlo v průběhu letu odpařit, jinak dochází ke vzniku slitých spojených vláken podstatně vyšších průměrů [22]. Dalším faktorem ovlivňujícím šířku tvořených vláken je rychlost průtoku polymeru, kterou lze nastavit pouze u systémů majících pumpu tlačící polymerní soustavu systémem. V tomto případě zrychlený průtok vede k nárůstu průměrů tvořených vláken [22].

Typickým defektem vyskytujícím se při neoptimálních podmínkách pro ES je výskyt ztluštělých míst „kuliček“ na nanovlákněch. Nanovlákná pak mají vzhled podobný „korálkům na provázku“. Pro odstranění tohoto defektu a tvorbu homogenních vláken mohou být zvoleny různé postupy. V mnoha případech vede k odstranění tohoto defektu zvýšení koncentrace polymeru, v jiných případech bylo úspěšně využito snížení povrchového napětí roztoku [19].

Z výše uvedeného vyplývá, že pro každý polymer existuje jen určité úzké rozmezí koncentračních hodnot, za kterých je možno za daných podmínek (teplota, vlhkost, elektrické napětí, případně pH) tvořit kontinuální vlákna bez výskytu defektů.

ES je prováděn nejběžněji z roztoku polymeru, což je proces snazší na provedení. Je pouze nutné najít vhodné rozpouštědlo pro daný polymer a ES může probíhat za pokojové teploty bez větších nároků na zařízení. Nevýhodou tohoto procesu je jen velmi obtížná recyklace použitých rozpouštědel, a tudíž i vyšší finanční náročnost pro potenciální výrobu. Problémem je také toxicita některých používaných organických rozpouštědel, jejichž rezidua mohou být zásadním limitujícím faktorem pro případné použití připravených nanovláknenných produktů v biologických systémech [2,23].

Naproti tomu příprava nanovláken ES z taveniny je zcela prosta rozpouštědel, avšak vyžaduje speciálně upravené zařízení. Vlákna zde nevznikají odpařením rozpouštědla, ale ochlazením proudu polymeru v průběhu letu ke kolektoru. Polymer tudíž musí být v zásobníku a trysce zahříván, aby nedošlo k jeho ztuhnutí před tvorbou vláken. Tento proces je tudíž značně náročnější na provedení, obzvláště u polymerů s vysokou teplotou tání, a výsledná vlákna často dosahují větších průměrů a nižší porozity [23–25].

Síťované polymery vysokých molekulových hmotností zatím není možné zvláknit, neboť viskozita jejich soustav s rozpouštědlem je příliš vysoká a povrchové napětí nelze překonat aplikovatelným elektrickým napětím. Rozpustné polymery je proto možné síťovat za pomoci vhodných činidel v průběhu, anebo po vytvoření nanovláken. Toho je možno docílit s využitím fyzikálních (UV záření, teplota) nebo chemických činidel (glutaraldehyd, formaldehyd, k. fosforečná, a další) [26].

#### *2.1.1.1 Modifikace základního uspořádání elektrospiningu*

##### 2.1.1.1.1 Koaxiální a emulzní elektrospining

Koaxiální ES vychází ze základního provedení procesu ES a byl prvně představen v roce 2003 [27]. Při koaxiálním ES nevznikají klasická monolitická vlákna, ale jsou tvořena vlákna složená z jádra a obalu [10].

Nádoba pro zásobní roztok polymeru je tvořena dvěma kompartmenty, z nichž jeden obsahuje roztok tvořící obal a druhý tvořící jádro nanovláken. Tryska, z níž jsou tyto roztoky vytlačovány, je složená a má koncentrické uspořádání s vnitřní a vnější jehlou. Na její špičce je tvořen Taylorův kužel, složený z obou roztoků, a z něj vychází a je tvořeno jedno složené vlákno. Proto je koaxiální ES značně náročnější na provedení než klasický ES z jednoduché trysky [28].

Druhou možností jak vytvořit nanovlákná složená z jádra a obalu je emulzní ES. Zásobní roztok polymeru má strukturu emulze a je tudíž možno použít základní zařízení pro ES s jednoduchou tryskou. Toto provedení však neposkytuje kontinuální koaxiální nanovlákná v celé jejich délce; strukturu jádra a obalu mají vlákna jen přechodně v úsecích, kdy ES probíhal z emulzní kapky. Navíc výsledkem emulzního ES často nejsou koaxiální nanovlákná, ale vlákna s dispergovanou fází včleněnou jako samostatné úseky vláken [28].

Díky své struktuře si koaxiální nanovlákná získala brzy pozornost a oblibu řady výzkumných pracovišť, a to především v biomedicínských oborech. Koaxiální uspořádání umožňuje uschování řady aktivních substancí v jádru vlákna, čímž je zajištěna jejich ochrana před nepříznivými podmínkami v průběhu ES (agresivní a organická rozpouštědla) nebo řízené uvolňování látek z jádra, případně je možno optimalizovat smáčivost povrchu vláken [28]. Toho je využíváno ve velké míře k ukrytí bílkovin

a enzymů uvnitř vláken [29–31] nebo řízenému uvolňování léčiv [32–35] (zamezení okamžitého „burst“ uvolnění).

Uvolňování aktivních látek z jádra je řízeno desorpčním mechanismem a k uvolnění dochází až v přímém kontaktu látky v jádře s vodou, resp. akceptorovou fází. Z tohoto důvodu musí nejprve dojít k rozrušení obalu, aby se voda dostala do jádra nanovlákná a účinná látka mohla být uvolněna. Proto se jako obalový materiál nejčastěji používají degradabilní polymery, případně je možno do nanovláken přidat v průběhu přípravy porogeny (např. polyethylenglykol, polyethylenimin), které se ve vodném prostředí rozpustí a vytvoří v obalu póry, jimiž mohou být substance nacházející se v jádru uvolněny [28,31].

#### 2.1.1.1.2 Vícetryskový elektrospining

Vícetryskový ES je umožněn zařízením se dvěma a více tryskami, ze kterých souběžně vytéká kapalina pro ES a je tudíž tvořeno mnoho nanovláken najednou. Uspořádání umožňuje použití různých polymerů, a tudíž tvorbu kompozitních materiálů. Tato modifikace také značně zvyšuje produktivitu tvorby nanovláken, avšak je značně komplikovanější z hlediska uspořádání trysek, vzhledem ke vzájemnému ovlivňování polymerních proudů působením elektrického pole (odpuzování stejně nabitých proudů) a možnému snížení kvality výsledného produktu [15].

#### 2.1.1.1.3 Elektrospining z volného povrchu kapaliny (beztryskový elektrospining)

Další významnou modifikací procesu ES je úplné vynechání trysky zásobníku polymeru a tvorba Taylorových kuželů – nanovláken, přímo z volného povrchu kapalin. K tomu je potřeba použít dostatečně vodivé kapaliny a proudy polymeru poté vychází přímo z povrchu kapalin. Bylo popsáno několik možných uspořádání zařízení: ponořené (smáčené) koule, válce nebo disky, kuželové dráty, rotující dráty s kuličkami, bubliny procházející kapalinou k jejímu povrchu nebo nanášení roztoku na elektrodu tvořenou drátem [36]. Toto uspořádání umožňuje tvorbu stovek až tisíců proudů polymeru v jednom okamžiku a skrývá zatím nejvyšší potenciál k industriálnímu využití ES. Tohoto principu proto využívají komerčně dostupná zařízení pro průmyslovou výrobu nanovláken (např. Nanospider™) [37].

U těchto zařízení je produkce mnohonásobně vyšší než u klasických tryskových přístrojů, jejichž produkce představuje pouze desetiny až jednotky gramů za hodinu, zatímco průmyslová beztrysková zařízení vyrábí gramy až desítky gramů za minutu, což představuje až několik kilogramů z jednoho zařízení za den [15].



Obrázek 3 Nanospider

#### 2.1.1.1.4 Elektrospining s tvorbou uspořádaných vláken

Základní provedení ES poskytuje vlákna náhodně uložená na kolektoru tvořící netkanou textilií. Modifikací kolektoru nebo specifickým rozložením elektrického pole je možno dosáhnout vysokého stupně uspořádání vytvořených vláken v požadovaném směru a získat tak nanovláknennou membránu složenou z uniaxiálně orientovaných vláken. To je samozřejmě v některých případech výhodné z hlediska mechanických vlastností nanovláknenné soustavy (vysoká mechanická odolnost v daném směru), případně pro směřování proliferace buněk daným směrem ve tkáňovém inženýrství [38,39].



I přes řadu parametrů, které je nezbytné optimalizovat a udržovat, je ES relativně snadný a ekonomicky nenáročný způsob výroby nanomateriálů. V dnešní době dodávají zařízení pro ES např. tyto firmy: Elmarco, NaBond, Kato Tech, Linari Engineering, E-Spin Nanotech, Spraybase® [37].

### **2.1.2 Využití nanovláken**

Nanovláčenné membrány díky svým výhodným vlastnostem našly uplatnění v mnoha různých odvětvích a množství nových využití každým rokem neustále narůstá. V tomto textu bude stručně shrnuto využití v technických odvětvích a podrobněji bude rozebráno užití v medicínských disciplínách.

#### *2.1.2.1 Chemie*

V chemických oborech našly nanovláčenné materiály uplatnění především jako katalyzátory, příp. jako podklady nesoucí katalyzátory reakcí. Takto bylo dosaženo zvýšení účinnosti reakcí a zvýšení jejich výtěžků, a to především díky obrovskému měrnému povrchu nanovláken [12]. Za zmínku stojí především nanovláčenné materiály, nesoucí na svém povrchu enzym lipázu, využívané pro rozklad nejrůznějších typů olejů a výrobu bionafty [40–42]. Mezi další úspěšné aplikace nanovláken patří např. fotokatalýzy, kde se využitím nanovláken obsahujících oxid titaničitý dosáhlo výrazně lepších výsledků [43–46]. Popsány byly ale také hydrolyzy [47] nebo oxidační reakce [48].

#### *2.1.2.2 Filtrační technologie*

Filtrační technologie jsou jednou z nejdůležitějších oblastí využití nanovláken, jejich struktura jakoby byla pro tvorbu filtrů a membrán předurčena. Velmi tenká vlákna, obrovský povrch, porézní struktura umožňují extrémně vysokou účinnost filtrování [12]. I první produkty využívající nanovláčena byly filtry – Petryanovy filtry pro ochranné masky (40. – 50. léta Rusko) [14], čímž značně předběhly svou dobu.

V současnosti jsou komerčně využity nanovláčenné filtry např. ve spalovacích motorech nebo v tvářových maskách (ReSpimask®). Mnoho nových aplikací je dále zkoumáno v souvislosti s filtracemi částic v kapalinách, aerosolech i emulzích. Nanovláčena tvořící

filtrační membránu mohou být čistě polymerní [49] nebo funkcionalizovaná např. antibakteriálně působícími částicemi stříbra [50] či chemickými mikrobicidy [51], které takto mohou prodloužit funkčnost bakteriálních filtrů. Nanovláknny mohou být vytvořeny i afinitní a separační membrány [52].

Ochrana před chemikáliemi a dekontaminace jsou další významnou oblastí filtračních technologií, kde je intenzivně zkoumána možnost využití nanovláken, především pro vojenské užití, jakožto součástí plynových masek a ochranných obleků [53]. Vyvíjeny jsou materiály schopné degradace škodlivin při kontaktu s membránou [54], případně adsorpce a vyvázání chemikálií nebo bakterií na svém povrchu [12,55].

### *2.1.2.3 Textilní technologie*

Cílem využití nanovláken v textilním průmyslu je především zlepšení vlastností používaných materiálů, a to jak přírodních např. bavlny, tak i v současnosti stále častěji využívaných syntetických materiálů. Klasické materiály mohou být potaženy vrstvou nanovláken, čímž vznikne textilie mající jedinečné vlastnosti. Tímto způsobem jsou vyrobeny a komerčně dostupné např. spodní prádlo obsahující antibakteriálně působící nanovláknna se stříbrem nebo lůžkoviny pro alergiky neprostupné pro roztoče a prachové částice (např. nanoSPACE®). Vyvinuté funkční nanovláknenné membrány se vyznačují výbornou větruodolností, propustností par, hydrostatickou odolností a v těchto parametrech předčí i široce užívaný GoreTex®. Další zkoumané inovativní materiály přináší např. možnosti ochrany před UV zářením [56], nehořlavost [57], schopnost měnit barvy [58] a řadu dalších unikátních vlastností [12].

### *2.1.2.4 Chemické senzory*

Nanovláknenné materiály mají ideální vlastnosti pro formulaci chemických senzorů, resp. detektorů. Jejich obrovský měrný povrch umožňuje velmi rychlou interakci mezi senzorem a analyzovanou látkou, a tudíž i nezbytnou rychlou odezvu na přítomnost analytu [12].

Úspěšně byly odzkoušeny senzory tvořené nanovláknny k detekci nebezpečných plyných látek, konkrétně se jednalo o chlorovodík [59], čpavek [60], oxid uhelnatý [61,62], dále také výbušnin (dinitrotoluen) [63] nebo alkoholů [64]. Tyto senzory umožňují velmi

rychlou odezvu a/nebo snížení detekčního limitu těchto látek oproti stávajícím detekčním metodám.

Kvalitní chemický senzor by měl mít rychlou odezvu, vysokou selektivitu a senzitivitu, nízký detekční limit, snadnou regeneraci a dobrou robustnost. Před využitím nanovlákných senzorů v praxi tudíž stojí ještě dlouhá cesta, avšak již nyní je zcela zřejmá výhodnost využití těchto materiálů [12].

#### *2.1.2.5 Elektronika*

Rychlý a neustálý pokrok v elektronice směřuje k miniaturizaci veškerých elektronických zařízení, a tudíž i jejich součástí. Nanovlákná jsou proto v tomto odvětví další možnou cestou. V tomto oboru jsou intenzivně zkoumána především jako 1D nanostruktury – nanovlákná a nanokabely sloužící například jako anorganické polovodiče [65,66].

#### *2.1.2.6 Fotovoltaika a uchování energie*

Obrovský povrch a vysoká porozita nanovláken je výhodou vlastností i pro tvorbu jednotek určených k zachycení volné energie ze slunečního záření a její přeměně na elektrický proud. Povrch nanovláken musí být za tímto účelem opatřen oxidy kovů (nejčastěji  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$ ). Takto upravená nanovlákná mohou být použita k tvorbě solárních buněk, jejichž účinnost transformace solární energie na elektrickou dosahuje okolo 10 procent [12,67,68].

Výhodné vlastnosti nanovláken je možno také využít ke zlepšení vlastností Li-Ion baterií. Mohou zde sloužit jakožto anody [69,70], katody [71] i separační membrány (např. Nafisep™) [72],

#### *2.1.2.7 Kosmetika*

Kosmetické přípravky na bázi nanovláken se zaměřily především na plet'ové masky. Několik z těchto výrobků je již komerčně dostupných, mezi nimi např. NanoMasque™, Biocellulose™, Botolift™ a další. Tyto membránové masky jsou nejčastěji vyrobeny z přírodních polymerů jako kolagen, deriváty celulózy, chitosan, hyaluronan a často nesou vitamíny (A, C, E) [73,74] a jiné v kosmetice využívané substance [12].

### 2.1.2.8 Tkáňové inženýrství

Regenerace buněk tkání a kultivace celých nových orgánů z buněk pacienta těla vlastních je v současnosti jedním z nejvýznamnějších úkolů medicínských oborů. Selhání, případně nevratné poškození tkání nebo celých orgánů je velmi závažným a neustále aktuálním problémem. Možnosti léčby spočívají v případě defektu tkání u chirurgické nápravy nebo vložení umělých náhrad (klouby, chlopně, cévy), v případě orgánů v transplantaci, a to buď zdravého štěpu, nebo kompletního orgánu od zdravých dárců. Zde však existuje vysoké riziko odmítnutí cizího štěpu či orgánu, navíc počet zdravých orgánů od dárců nedostačuje počtu čekajících příjemců [75,76].

Nanovláknenné membrány se svou strukturou velmi blízkou extracelulární matrix mohou být nejvhodnějším substrátem pro kultivaci a přenos buněk, ať již kmenových nebo buněk specifických tkání. Jejich vhodná struktura usnadňuje přichycení, migraci a proliferaci buněk napodobujíc přirozenou strukturu ECM a umožňují tak tvorbu trojrozměrných struktur tkání [10,12].

Důležitými vlastnostmi pro formulaci substrátů ke kultivaci buněk je jejich biokompatibilita a vhodná biodegradabilita. Postupná biodegradace materiálu z nanovláken umožní tvorbu vlastní ECM buněk a zajistí, že proliferujícím buňkám nebude bráněno v růstu intaktní strukturou nanovláken. Esenciální je také indukce vaskularizace, bez níž by implantát nebyl schopen v organismu přežít [2,12]. Porozita materiálu, které lze u nanovláknenné struktury snadno docílit, je pro infiltraci a migraci buněk materiálem zcela nezbytná [77].

Nanovláknenné struktury jsou proto v centru zájmu tkáňového inženýrství a pro kultivaci buněk tkání již bylo úspěšně otestováno mnoho polymerních materiálů. Jednalo se o přírodní polymery jak na bázi proteinové struktury, jako jsou kolagen [78–81], elastin [82–84], fibrinogen [85–87], protein hedvábí [88–91], tak polysacharidové struktury, mezi nimiž vynikají alginát [92–94], chitosan [95–97] a hyaluronan [98,99]. Ze syntetických polymerů byly nejlepší výsledky dosaženy s PCL [100,101], PLA [102–104], případně s jejich kopolymerů nebo směsmi více polymerů [78,105–108].

Nanovláknenné buněčné substráty mohou být využity pro růst a regeneraci špatně rostoucích buněk kostí, kde jsou s výhodou přidávány hydroxyapatit či růstové faktory [79,94–96] nebo také k neustále aktuální regeneraci tkáně kloubů a chrupavek [109–112].

Velmi častým zdravotním problémem jsou defekty kardiovaskulárního systému, proto je regenerace nebo kompletní rekonstrukce tkání cév [78,81,88,101,108], chlopní nebo i srdeční tkáně [113–117] zasažené infarktem myokardu intenzivně studovanou oblastí.

Specifickým případem z hlediska kultivace jsou buňky nervové tkáně. Tyto buňky pozbývají schopnosti se dělit a i jejich regenerace po poškození je většinou pouze částečná a velmi komplikovaná. Nanovláknenné struktury jsou převážně formulovány pro léčbu defektů periferního nervového systému, často se jedná o uspořádaná nanovláknna [39,118], za účelem směřovat růst a podporovat regenerující se buňky. Vhodné se také ukázalo užití systémů obsahujících růstové faktory a jiné substance usnadňující regeneraci těchto buněk [104,119]. Možností vytvoření nových nervových buněk je kultivace buněk kmenových a jejich pozdější diferenciaci v nervovou tkáň [120].

Dalšími tkáněmi, jejichž regenerace a růst byly podpořeny s využitím nanovláknenných materiálů jsou jaterní buňky [121,122], jejichž kultivací je možno vytvořit autogenní jaterní štěp, či podpořit vysoké regenerační funkce jater. Dále byly zkoumány buňky močového traktu [85,123] nezbytné pro regeneraci po jeho částečné resekcii, buňky svalové tkáně [124], měkkých tkání [125,126] či značně specifické tkáně oka [127–129].

Pro kultivaci buněk v experimentálním měřítku jsou již dnes komerčně dostupné připravené destičky s nanovláknenným materiálem a lze je objednat např. od společnosti Electrospinning Company Ltd. Kultivace tělu vlastních tkání je zatím hudbou budoucnosti, ale je zřejmé, že nanovláknenné struktury budou jedním z významných nástrojů, na který se bude hrát.

#### *2.1.2.9 Krytí ran*

Už od dávných časů bylo k úspěšnému hojení ran využíváno nejvhodnějších dostupných materiálů. Ty měly zamezit zanícení rány a urychlit její hojení. Ideální vlastnosti materiálů určených pro krytí ran jsou mechanická a antibakteriální ochrana rány, schopnost absorbovat exsudáty a zápach bez prosakování na povrch krytí, termální izolační vlastnosti, prodyšnost, snadná odstranitelnost bez poškození regenerující se tkáně a samozřejmě musí být netoxické, nealergenní a sterilní [130].

Nanovláknenné materiály jsou velmi příhodné pro formulaci krytí ran, jak z hlediska jejich struktury – obrovský měrný povrch a tloušťka vláken velmi podobná organismu vlastním, tak i velmi širokého výběru biokompatibilních polymerů, které lze ES zvláknit [2,130].

Nanovlákná jsou schopna pojmout velké množství exsudátu (jsou schopny absorbovat až 213% vlastní hmotnosti), mají výbornou prodyšnost, dokáží urychlit hemostázu, zlepšují migraci a proliferaci buněk a mohou být snadno funkcionalizovány aktivními substancemi či růstovými faktory [12,130]. Nanovláknenná krytí ran jsou nejčastěji připravována z tělu vlastních polymerů, jako jsou kolagen [131,132], želatina [133,134], hyaluronan [99,135,136], případně jejich kombinací [137–139] a mnoho studií prokázalo, že tyto materiály vykazují výrazně lepší výsledky než v současnosti dostupná krytí. Ze syntetických polymerů se uplatnily především nanovláknenné materiály vyrobené z polyuretanu [140,141], k. polymléčné [142,143], a to především díky výborné prodyšnosti, mechanickým a antiadhezivním vlastnostem. S výhodou jsou pak kombinovány syntetické a přírodní, tělu vlastní, polymery [144–146].

Různá zranění a různá stadia hojení rány vyžadují specifické typy krytí. Pro léčbu akutních zanícených ran je možno připravit nanovláknenné krytí uvolňující do rány antibiotika [143,147,148] nebo desinfekční látky [149], případně látky nesoucí na svém povrchu antimikrobiálně působící částice stříbra [50,133,150,151]. Pro urychlení hojení ran nebo na špatně se hojící rány (např. při diabetu) byly připraveny krytí obsahující růstové faktory [152] nebo vitamíny a rostlinné extrakty s prokázaným účinkem na hojení ran [74,153–158]. Velmi slibné experimentální výsledky vedly k dalšímu rozvoji využití nanovláknenných struktur pro formulaci krytí ran a několik z nich se již nachází v různých stádiích klinických studií a v nedaleké budoucnosti by se mohly objevit na trhu a být využity k léčbě [12,159–162].

### **2.1.3 Nanovlákná jako nosiče léčiv**

Obrovský měrný povrch nanovláken může být s výhodou využit pro podání léčiv, ke zprostředkování velmi rychlého a rozsáhlejšího kontaktu účinné látky s disolučním médiem či přímo absorpční plochou. Léčiva v této podobě mohou být inkorporována do lékových forem a jako jejich součást zlepšovat vlastnosti konkrétních formulací či přípravků.

První práce tykající se využití nanovláken jako nosičů léčiv byly publikovány začátkem tohoto tisíciletí, tedy krátce po renesanci ES v 90. letech. Mezi prvními vyšla v roce 2002 práce od autorů Kenawy a kol. zabývající se inkorporací a uvolňováním antibiotika tetracyklinu [163].

Do dnešního dne se podařilo velké množství léčivých i řady jiných substancí úspěšně nanést ES do nanovlákných nosičů a poté z nich uvolnit bez porušení struktury těchto látek a ztráty jejich aktivity. Nízkomolekulární látky brzy doplnily úspěšné experimenty s vysokomolekulárními substancemi, ať už se jednalo o proteiny či DNA. V neposlední době byly ES úspěšně a neporušeně zaneseny do nanovláken také živé buněčné či virové organismy, které si i po ES a uvolnění z nanovláken udržely svou životaschopnost. **Tabulky číslo 1 až 3** shrnují substance a organismy inkorporované do nanovláken, o kterých byly dosud publikovány odborné práce.

#### *2.1.3.1 Mechanismy uvolňování látek z nanovláken*

Způsob uvolňování látek z nanovláken byl studován několika vědeckými skupinami. Nejprůhodněji popsali uvolňování látek z nanovláken Srikar. a kol., když podle experimentů s barvivy uvolňujícími se z ve vodě nerozpustných nanovláken a již dříve publikovaných výsledků odvodili, že toto uvolňování je primárně řízeno desorpcí látek z povrchu nanovláken a pórů nacházejících se v nanovlákněch. Tyto póry jsou otevřeny na povrchu vláken a přístupné pro akceptorové médium. Takto lze vysvětlit, proč v řadě případů není dosaženo úplného uvolnění léčiva, neboť částice látky nacházející se uvnitř polymerní matrix se nedostanou do kontaktu s absorpčním médiem a nemohou být proto dostupné pro uvolnění. Pouze látka (léčivo) nacházející se v povrchových vrstvách a pórech může být uvolněna [164]. Další uvažovaný primární způsob uvolňování, difúze v pevné fázi, popř. difúze zbotnalým polymerním tělesem, nedokázal vysvětlit mnohokrát pozorovanou neúplnou liberaci látek z nanovláken a teorie navržená Srikarem mnohem lépe odpovídá experimentálním pozorováním. Difúze látky disolučním médiem hraje velmi důležitou roli pro zachování koncentračního gradientu, avšak není u těchto systémů primárním mechanismem uvolňování z polymerního nosiče.

V případě polymerů rozpustných v disolučním médiu jsou nanovlákná díky svému obrovskému povrchu velmi rychle rozpuštěna a látka, kterou nesou je okamžitě a v plném rozsahu uvolněna. Takové nanovlákné nosiče jsou proto obzvláště výhodné pro dosažení velmi rychlého uvolňování léčiva v řádu desítek sekund až minut.

U degradabilních, ve vodě nerozpustných polymerů dochází k postupnému odbourávání povrchových vrstev, následovaném pomalým uvolňováním – desorpcí inkorporované substance v řádu týdnů až měsíců. Tato postupná degradace a uvolňování může být

urychlena např. přidavkem enzymů (proteináza K u PLLA nanovláken) do vláken či akceptorového média [165,166].

### *2.1.3.2 Faktory ovlivňující uvolňování látek z nanovláken*

Důležitou roli v rychlosti liberace z nanovláken hraje smáčivost nanovláken, která je závislá na polymeru, ze kterého byla utvořena a jeho interakci s akceptorovým, nejčastěji vodným prostředím. Hydrofobní polymery zde působí jako retardéry sorpce vody na povrch nanovláken a do jejich pórů a liberace léčiva z nich je proto výrazně pomalejší. Tvorba nanovláknenných nosičů léčiv, složených z více nanovláknenných vrstev z různých polymerních materiálů připravených sekvenčně pak může být cestou k přípravě nosiče s optimálním průběhem uvolňování látky nastavitelným individuálně pro většinu aktivních látek [167,168].

Jako velmi významný faktor se také ukázala kompatibilita léčiva s roztokem polymeru. Látka špatně rozpustná, nerozpuštěná v roztoku polymeru pro ES je ve velké míře v průběhu ES ukládána na povrchu vláken, což vede následně k jejímu rychlému uvolnění z nanovláken, zatímco látka kompatibilní a dobře rozpustná v tomto roztoku je homogenně rozptýlena v nanovláknecích a k jejímu uvolnění dochází postupně při degradaci těchto vláken [166]. V případě nanovláken dobře rozpustných ve vodě je tento vliv samozřejmě zanedbatelný vzhledem k rychlosti jejich rozpouštění. Využití rozpustných látek tvořících po kontaktu s disolučním médiem v nanovláknecích póry a kanálky, kterými následně dochází k uvolnění API inkorporované v nanovláknecích, je nejčastější pro koaxiální vlákna, ale s výhodou může být tento princip využit i u nerozpustných monolitických nanovláken.

Volbou polymeru rozpustného pouze při specifickém pH může být dosaženo uvolňování léčiva za specifických podmínek např. v tlustém střevě [169,170] nebo po alkalizaci vaginálního pH spermatem [171].

Přípravky založené na nanovláknenných membránách již byly úspěšně otestovány a popsány pro použití jako dermální i transdermální přípravky a transmukozální formy pro sublingvální nebo vaginální podání. Řada vědeckých prací se také zabývá různorodými perorálními lékovými přípravky, ať už se jednalo o velmi rychle rozpustné orodisperzní filmy, přípravky se zvýšenou rozpustností léčiva, či uvolňující léčivo za specifických podmínek (pH, enzymy), ale také přípravky typu implantátů nebo přípravky



určené pro injekční podání (viz **Tabulka 1**). Nanovlákná vrstva byla také úspěšně použita k řízení rychlosti uvolňování léčiva, a to jak z jiné nanovlákné membrány [172], krystalické látky [173], tak i hydrogelu [174] nebo tablety [175].

Zajímavou možností pro podání více léčiv či modifikaci liberace představují nanočástice zabudované do nanovláken. Vzniká takto systém „nano-in-nano“, u kterého se naskýtá možnost využít předností obou těchto forem. Současně však stoupá náročnost přípravy, resp. výroby takového systému. Vlastnosti systému na tomto principu zkoumali Wang a kol. pro barvivo rhodamin B a naproxen [176] a také Beck-Broichsitter a kol. pro kumarin 6 [177].

### *2.1.3.3 Fyzikální stav látek inkorporovaných do nanovláken*

V kontextu uvolňování léčiv byl mnoha vědeckými týmy zkoumán i fyzikálně-energetický stav léčiv nacházejících se po ES v nanovláknách. V řadě studií bylo prokázáno, že léčivo nanosené ES do vláken se zde nenachází v krystalické podobě, ale je v amorfním stavu (popř. ve stavu molekulární disperze) [178–184]. Mnoho studií prokázalo s využitím měření DSC a X-ray krystalografie, že nanovlákná připravená ES z roztoků neobsahují krystalickou fázi daných léčiv. Toho je pravděpodobně dosaženo velmi rychlým odpařením rozpouštědla v průběhu procesu ES a fixací molekulární disperze léčiva mezi vzájemně propletenými řetězci polymeru. Látky v tomto energetickém stavu jsou v prostředí kapalně disperzní fáze nestabilní a je proto spojován se zvýšenou rozpustností léčiva. Výsledky výše zmíněných publikací potvrzují, že rozpustnost mnoha léčiv byla tímto způsobem úspěšně navýšena. V kombinaci s obrovským povrchem mají nanovlákné soustavy velké předpoklady zvyšovat a zrychlovat rozpouštění jinak špatně rozpustných substancí.

Tento objev je obzvláště významný vzhledem k tomu, že v současnosti je většina vyvíjených substancí, ale také již zavedených léčiv hydrofobních, a tudíž velmi špatně rozpustných ve vodném prostředí lidského těla [185,186].

**Tabulka 1** Souhrn publikovaných nízkomolekulárních látek inkorporovaných do nanovlákných nosičů.

<b>Látka</b>	<b>Nosný polymer</b>	<b>Poznámky</b>	<b>Citace</b>
Aceklofenak	zein/Eudragit® S	perorální léková forma pro duální podání léčiv	[187]
Acetaminofen	PVP (K90)	zlepšení rozpustnosti	[180]
Acetazolamid	PCL	testování liberace	[188]
Acyklovir	PAN	transdermální, topické podání	[189]
Acyklovir	PEO, PLLA	vaginální podání	[190]
Azido-deoxythimidin	PEO, PLLA	vaginální podání, anti-HIV	[190]
Allylisothiokyanát	PLA, sójová bílkovina	obalový materiál	[191]
Amfotericin B	PCL, PLA	nespecifikováno	[192]
Amoxicilin	PCL	krytí ran, implantát	[193]
Amoxicilin	CA-PVP – koaxiální	transdermální nebo perorální podání	[194]
Bupivakain	PLGA	chirurgické šití	[195]
Cefoxitin	PLGA, PEG-b-PLA	krytí ran	[196]
Ciprofloxacín	PVA/PVAc	krytí ran	[197]
Ciprofloxacín	PU, dextran	krytí ran	[198]
Cyklosporin A	PLA	krytí ran – lokální léčba	[199]
Dexamethazon	PCL	kultivace kost. tkání	[200]
Dexamethazon	PVA-med	krytí ran, lokální léčba	[201]
Dichloroctová k.	PLA	implantát, léčba cervikálního karcinomu	[202]
Diklofenak	PVA	transdermální membrána	[203]
Diklofenak	Eudragit® L	targeting tlusté střevo	[169]
Diosmin	HPC-PVA-PEO	zvýšení rozpustnosti	[204]
Donepezil	PVA	rychlerozpustný perorální přípravek	[205]
Doxorubicin	PLLA	zkoumání vlivů na liberaci	[166]

<b>Látka</b>	<b>Nosný polymer</b>	<b>Poznámky</b>	<b>Citace</b>
Doxorubicin	PEG-PLLA – koaxiální	ES z emulze	[206]
Doxorubicin	PEG-PLA	implantát	[207]
Erytromycin	HPMCP	targeting střevo	[170]
Extrakt Centella Asiatica	CA	krytí ran	[153]
Extrakt Garcinia Magnostana	CHI, PVA	krytí ran	[155]
Extrakt Měsíčku lékařského	větvený polyglycerol	krytí ran	[157]
Extrakt heřmánku lékařského	PCL-PS	krytí ran	[208]
Extrakt (více rostlin)	PCL	krytí ran	[156]
Fenbufen	PLGA/želatina	zkoumání vlivů na liberaci	[209]
Gentamycin	PLGA, kolagen	vícevrstvé krytí ran	[147]
Gentamycin	PCL – koaxiální	dlouhodobé uvolňování	[210]
Gentamycin	PVA, kryto PU	nespecifikováno	[172]
Haloperidol	PVA	sublingvální, perorální podání	[211]
Helicid	PVP (K60)	sublingvální podání	[179]
Hydroxykamfotecin	PELA (PEG 10%)		[212]
Chlorhexidin	CA, PEO	antibakteriální krytí ran	[149]
Chlortetracyklin	PCL, PLA	nespecifikováno	[192]
Ibuprofen	CA	nespecifikováno	[213]
Ibuprofen	PVP (K30)	rychlerozpustný přípravek	[214]
Ibuprofen	PLGA	krytí ran	[215]
Ibuprofen	PLLA	implantát	[216]
Ibuprofen	PLLA nanočástice	dlouhodobé uvolňování	[217]
Indometacin	PVA	transdermální membrána	[203]
Indometacin	CA	nespecifikováno	[213]
Indometacin	metakrylátové kopolymery	test liberace	[218]

<b>Látka</b>	<b>Nosný polymer</b>	<b>Poznámky</b>	<b>Citace</b>
Irinotekan/ ethyl-hydroxykamfotecin	PCL, PGC-C18	dlouhodobé uvolňování	[219]
Itrakonazol	PU	amorfní stav, zvýšená rozpustnost	[181]
Karvedilol	Eudragit® E	rychlerozpustný perorální přípravek – zvýšená rozpustnost	[183]
Ketanserin	PU	amorfní stav, liberace	[181]
Keton z maliníku	PVA, želatina	nespecifikováno	[220]
Ketoprofen	PCL, PU	test liberace	[221]
Ketoprofen	PVA	nespecifikováno	[222]
Ketoprofen	CA – koaxiální	test liberace	[32]
Ketoprofen	PVP (K30), EC	vrstvená membrána, dvoufázové uvolňování	[168]
Ketoprofen	PVP (K60), Zein – koaxiální	dvoufázové uvolňování	[223]
Ketoprofen	zein – koaxiální	lineární uvolňování	[33]
Klaritromycin	PLLA	nespecifikováno	[224]
Kofein	PVA	rychlerozpustný perorální přípravek	[225]
Kurkumin	CA	topické, transdermální podání	[226]
Kurkumin	PCL	krytí ran	[158]
K. ferulová	PVP	sublingvální podání	[227]
K. fusidová	PLGA	krytí ran	[228]
K. retinová	PLGA	implantát	[229]
K. retinová	PVA	pleťová maska	[73]
Lidokain	PLLA	krytí ran	[143]
Lidokain	PLGA, kolagen	vícevrstvé krytí ran	[147]
Maraviroc	PEO, PLLA	vaginální podání, anti-HIV	[190]
Mebeverin	PVP (K60), Eudragit® L	různorodé podání (orální, bukalní, rektální)	[230]

<b>Látka</b>	<b>Nosný polymer</b>	<b>Poznámky</b>	<b>Citace</b>
Metronidazol	PCL	lokální (zánět periodontu)	[231]
Metronidazol	PLA	lokální (zánět periodontu)	[232]
Mupirocin	PLLA	krytí ran	[143]
Nabumeton	PEO	testování liberace a množství léčiva ve vláknech	[182]
Naproxen	PVA	transdermální membrána	[203]
Naproxen	CA	nespecifikováno	[213]
Naproxen	CA	transdermální podání, proléčivo	[233]
Naproxen	PCL	kombinace s nanočásticemi	[176]
Naproxen	PVA, PAA, CHI, PCL	sublingvální podání	[234]
Naproxen	PCL	komplex s $\beta$ -cyklodextrinem	[235]
Nystatin	želatina	orální film	[236]
Paklitaxel	PLLA	zkoumání vlivů na liberaci	[166]
Paklitaxel	PEG-PLA	implantát	[207]
Paklitaxel	CHI, adsorbováno	implantát (pooperační chemoterapie)	[237]
Paklitaxel	PCL	součást stentu	[238]
Pantoprazol	zein/Eudragit® S	perorální léková forma pro duální podání léčiv	[187]
Paracetamol	PDLLA	nespecifikováno	[239]
Paracetamol	PELA, PBE, PBELA	acidolabilní nosič, implantát	[240]
Paracetamol	blokový kopolymer PLA+POE <sub>D</sub>	acidolabilní nosič	[241]
Polyfenoly zeleného čaje	PCL	uvolňování modifikováno nanotrubičkami uhlíku	[242]
Resveratrol	PCL – koaxiální	dlouhodobé uvolňování	[210]
Riboflavin	PVA	rychlerozpustný perorální přípravek	[225]
Rifampicin	PLLA	vliv léčiva na tvorbu vláken	[243]
Salicylát	PVA	transdermální podání	[203]

<b>Látka</b>	<b>Nosný polymer</b>	<b>Poznámky</b>	<b>Citace</b>
Salicylát	PVA	vliv síťování membrán na uvolňování léčiva	[244]
Shikonin	CA, PLA, PLGA	krytí ran	[154]
Simvastatin	PCL	regenerace kostí	[245]
Spironolakton	Soluplus®	zvýšení rozpustnosti	[184]
Spironolakton	PVP	rychlerozpustný perorální přípravek s lepší rozpustností	[246]
Sulindak	CA	nespecifikováno	[213]
Sumatriptan	PVA, PAA, chitosan	sublingvální membrána	[234]
Titanocen dichlorid	PLLA	implantát	[247]
Tenofovir	CAP	vaginální podání, pH sensitivní	[171]
Tetracyklin	PLA, PEVA	nespecifikováno	[163]
Tetracyklin	PCL, PLA	nespecifikováno	[192]
Tetracyklin	PLLA – koaxiální	krytí ran	[248]
Tetracyklin	PLLA, PLLA koaxiální, uspořádaná vlákna	antibakteriální chirurgické šití	[249]
Tetracyklin	PEG-PLA	krytí ran, ES emulze	[250]
Tetracyklin	PCL-PLA	krytí ran	[251]
Tetracyklin	PCL, PEVA	vícevrstevné krytí ran	[252]
Tetracyklin	PLGA – koaxiální		[35]
Tetracyklin	PLGA/halloysit	krytí ran	[148]
Timolol	PCL	testování liberace	[188]
Vankomycin	PLGA, kolagen	vícevrstevné krytí ran	[147]
Vitamín A	CA	dermální, transdermální podání	[74]
Vitamín B12	PCL	transdermální membrána	[253]
Vitamín C	PVA	pleťová maska	[73]
Vitamín E	CA	dermální, transdermální podání	[74]

Látka	Nosný polymer	Poznámky	Citace
Zlaté nanočástice	PVA	pleťová maska	[73]

Vysvětlivky: PVP – polyvinylpyrrolidon, CA – acetát celulózy, PEVA – polyethylen-ko-vinylacetát, PAN – polyakrylonitril, PEG – polyethylenglykol, CAP – celulóza acetát ftalát, PU – polyuretan, PS – polystyren, EC – etylcelulóza, PLGA – k. polymléčná-ko-glykolová, PLLA – k. poly-L-mléčná,

**Tabulka 2** Souhrn vysokomolekulárních aktivních látek inkorporovaných do nanovláknenných membrán.

Látka	Nosný polymer	Poznámky	Citace
Albumin (BSA)	PCL, dextran	koaxiální	[254]
Albumin (BSA)	poly (PEG/PPG/PCL uretan)	termosenzitivní – uvolňování při 37 °C	[255]
Albumin (BSA)	PVP, PLLA, mikročástice CHI		[256]
Albumin	PEG-PCL kopolymer		[257]
Biotin	PLA		[258]
Celulóza	PAN		[259]
Cytochrom C	PLLA	ES z emulze	[29]
Heparin	PCL	implantát, léčba cév	[260]
Inzulín	PVA, alginát	sublingvální podání	[261]
Lipáza	PAN, celulóza	příprava adsorpcí, hydrolýza olejů, výroba biopaliv	[40,41,262–267]
Lysozym	PCL, PEO	krytí ran, PRB	[268]
Lysozym	CHI, PVA	hojení, krytí ran	[269]
Lysozym	PLA	ES z emulze	[270]
Nervový růst. faktor/ albumin	PLLACL	kultivace buněk	[271]

<b>Látka</b>	<b>Nosný polymer</b>	<b>Poznámky</b>	<b>Citace</b>
$\beta$ -nervový růst. Faktor/ albumin	PLLACL	ES z emulze, TES	[272]
Nervový růst. Faktor/ laminin	PLA	regenerace nervové tkáně	[104]
pDNA	PCL- ko-PEG	vázána až po ES	[273]
pDNA	polyethylenimin- hyaluronát-PCL		[274]
pDNA	PELA, porogeny PEI	ES z emulze	[31]
pDNA	PELA	dlouhodobé uvolňování, regenerace cév	[275]
Peroxidáza	PCL, PVA – koaxiální	lipozómy zabudovány ve vláknech	[276]
Proteináza K	PELA	ES z emulze	[165,277]

Vysvětlivky: PEI – polyetylenimin, pDNA – plasmidová DNA, PAN – polyakrylonitril, PLLACL – k. mléčná-ko-kaprolakton



**Tabulka 3** Souhrn buněčných a virových organizmů inkorporovaných do nanovláknenných membrán.

<b>Substance</b>	<b>Nosný polymer</b>	<b>Poznámky</b>	<b>Citace</b>
Bakteriofág	PVA	testování viability	[278]
Bakteriofág	alginát	obalový materiál	[279]
Bifidobacterium animalis	PVA	testování viability	[280]
E. coli	PVA	testování viability	[278]
Lactobacillus acidophilus	PVA	vaginální přípravek	[281]
Staphylococcus albus	PVA	testování viability	[278]
Živé buňky	polydimethylsiloxan	testování viability	[282]

## 2.2 Sublingvální podání léčiv

Sublingvální aplikace léčiv může být využita k léčbě lokálních onemocnění, nebo jako cesta k systémovému podání léčiv, která se dnes řadí mezi transmukozální podání v dutině ústní. Díky výhodným vlastnostem je transmukozální aplikace přes sliznice v dutině ústní v posledních letech středem zájmu mnoha vědeckých týmů. V řadě případů totiž představuje potenciálně výhodnější alternativu perorálního nebo injekčního podání.

Mukóza v dutině ústní, vhodná pro transmukozální podání léčiv se rozlišuje na již zmíněnou sublingvální membránu, která se nachází na spodní straně jazyka a dolní části dutiny ústní pod jazykem, na mukózu bukální na spodní straně tváří, horního a dolního rtu, a případně ještě mukózu gingivální (pouze pro léčbu lokální) [283].

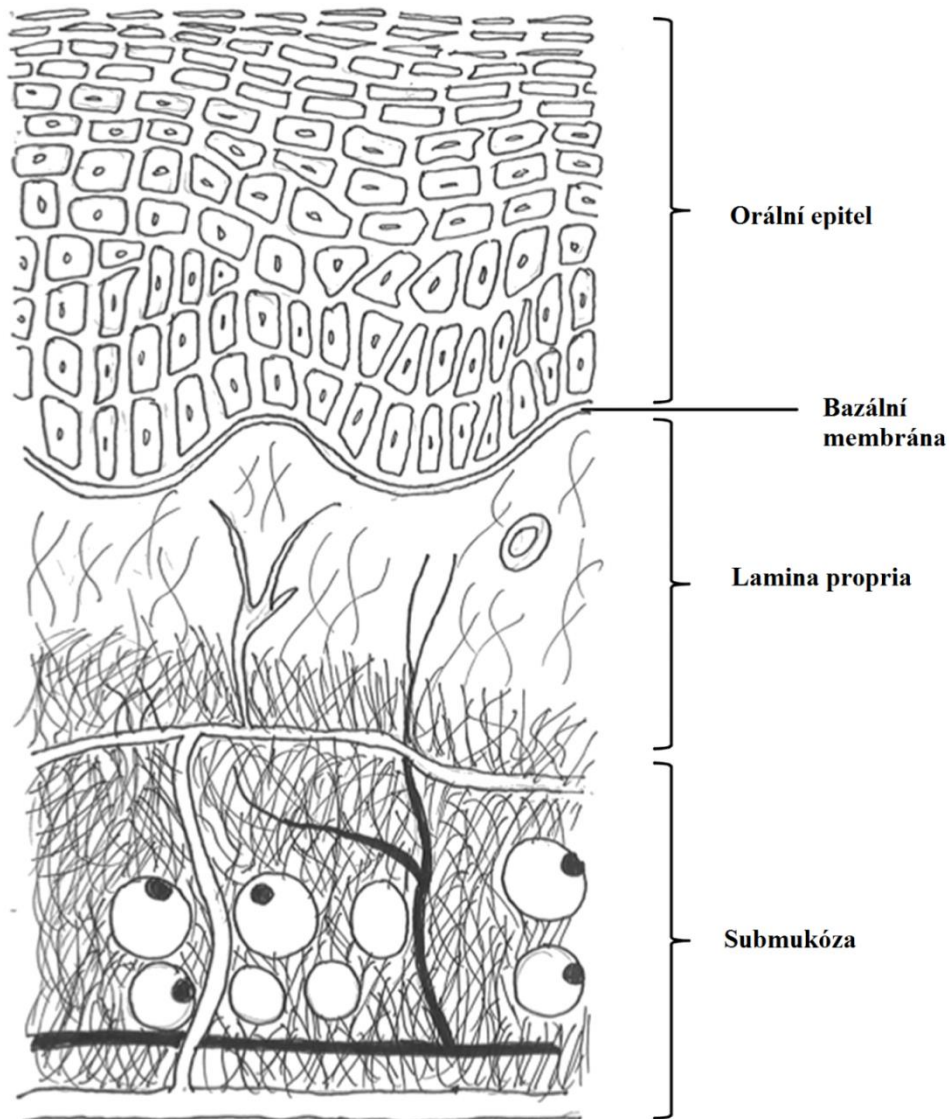
### 2.2.1 Struktura mukózy dutiny ústní

Mukóza dutiny ústní se skládá (**Obrázek 4**):

- ústní epitel – tvořen vrstevnatým dlaždicovým epitelem; sublingvální a část bukální oblasti není keratinizovaná; je oddělen od lamina propria bazální

membránou, ve které se nacházejí buňky schopné dělení, jež se následně diferencují a tvoří epitelální buňky

- lamina propria – pojivové tkáň, kolagenní vlákna, krevní a lymfatické kapiláry
- submukóza – spodní část lamina propria s obsahem kapilár a inervací



**Obrázek 4** Struktura orální mukózy. Převzato a upraveno z publikace [284].

Sublingvální mukóza představuje plochu okolo 26 cm<sup>2</sup>, což z celkové plochy dutiny ústní (± 200 cm<sup>2</sup>) představuje zhruba osminu. Z mukóz ústní dutiny je sublingvální mukóza nejtenčí (100 µm – 200 µm), není keratinizovaná a její kompletní obnova trvá přibližně dvacet dní [285]. Je také velmi dobře prokrvená; krevní zásobení spodní části dutiny ústní

zajišťuje arteria carotis externa a krevní průtok sublingvální částí činí asi 0,97 ml/min/cm<sup>2</sup> [283].

Povrch epitelu dutiny ústní je neustále pokryt a smáčen slinami. Slinné žlázy nacházející se v dutině ústní (sublingvální, submandibulární, příušní) vytváří v průběhu dne 0,5–2 litry slin. Ty zajišťují v dutině ústní relativně stabilní prostředí s pH okolo 6,8 (pufrovací schopnost slin) a obsahují různé množství enzymů a hlenu. Hlen je viskoelastický hydrogel tvořený vodou a glykoproteinem mucinem (1% – 5%), který značnou měrou ovlivňuje mukoadhezivní vlastnosti v dutině ústní [283,285].

Sliny neustále omývají veškeré povrchy dutiny ústní a mohou znamenat významnou překážku pro podání léčiv touto cestou – naředění léčiva, možná degradace léčiva enzymy slin, případně možnost odstranění lékové formy z absorpční plochy [285].

### ***2.2.2 Permeabilita orální (sublingvální) mukózy a mechanismy transportu léčiv***

Mukóza dutiny ústní je primárně bariérou, která má zabránit průniku exogenních látek do těla a úniku tělesných tekutin z těla. Orální mukóza je z hlediska permeability stavěna doprostřed mezi velmi špatně prostupnou pokožku a relativně dobře prostupnou střevní mukózu. Přičemž oblasti bez keratinizace, tedy sublingvální a bukální, jsou lépe propustné, než oblasti keratinizované. Bylo také prokázáno, že permeabilita sublingvální mukózy je vyšší než bukální a gingivální [286–288]. Největší odpor průchodu substancím klade svrchní třetina ústního epitelu (u keratinizovaných i nekeratinizovaných) a průnik touto částí je krokem určujícím rychlost celé permeace [283,285].

Transportní cesty vedoucí přes mukózu se dělí na extracelulární cestu (mezibuněčnými prostory epitelu) a transcelulární cestu (vedoucí přes buňky epitelu).

Extracelulární cesta – tímto způsobem procházejí převážně nízkomolekulární látky rozpustné ve vodě. Jedná se o pasivní transport na základě koncentračního gradientu. Jelikož jsou těsné spoje v orální mukóze přítomny jen velmi vzácně, je tato cesta prioritní pro všechny hydrofilní látky s nízkou molekulovou hmotností. Na druhou stranu jsou však intercelulární prostory částečně vyplněny lipidy vyloučenými z granul pokrývajících membránu, čímž je částečně vytvořena bariéra pro molekulární difúzi hydrofilních látek, ale na druhou stranu i cestu pro difúzi lipofilních substancí [283,289]. Velikost pórů membrány se pokusili prozkoumat Goswani a kol., kdy s využitím polyetylenglykolů

různých molekulových hmotností zkoumali jejich prostup orálními mukózami. Výsledky ukázaly, že sublingvální mukóza obsahuje póry dosahující až k 53 Å, tedy 5,4 nm (pro příklad inzulin má  $r_i=28,6$  Å, tedy 2,86 nm) [290].

Transcelulární cesta – pro tuto cestu jsou možné tři různé transportní mechanismy, a to:

- pasivní difúze – vhodné pro nízkomolekulární látky s vhodným rozdělovacím koeficientem (dostatečně lipofilní látky)
- přenos zprostředkovaný přenašečem – tento transport je velmi málo popsán pro dutinu ústní (některé sacharidy, aminokyseliny, vitamíny a substance jim podobné)
- endocytóza – tento transport je též velmi málo popsán pro dutinu ústní

Dominantní transportní mechanismus mukózou dutiny ústní představuje pasivní difúze, ať už se jedná o transcelulární, nebo extracelulární cestu [283,287,291].

**Tabulka 4** Souhrn výhodných a nevýhodných vlastností sublingvální mukózy pro transmukozální podání léčiv.

Výhody	Nevýhody
velmi tenká mukóza (100-200 $\mu\text{m}$ )	relativně malá absorpční plocha
výborné krevní zásobení	neustále omýváno slinami
dobře přístupná	pouze vysoce účinná léčiva
dobrá compliance	finanční náročnost
rychlý nástup účinku	mechanické namáhání
vynechání first-pass metabolismu	riziko spolknutí
optimální pH	
nízká metabolická aktivita	
nízká variabilita	

### 2.2.3 Optimální vlastnosti sublingvální lékové formy

Při formulaci lékové formy určené pro podání léčiva sublingvální transmukozální cestou je třeba vzít v úvahu řadu faktorů. Tento přípravek musí být dobře přijímán pacienty, nesmí proto být nepříjemné chuti a rušit při mluvení a příjmu potravy. Velmi důležitá je snadná aplikovatelnost a možnost snadného odstranění v případě výskytu nežádoucích účinků [287].

Sublingvální podání je velmi výhodné pro léčiva mající vysoký first-pass efekt (vysoký podíl léčiva metabolizován již při prvním průchodu játry) a látky nestabilní v kyselém prostředí žaludku anebo degradované trávicími enzymy (bílkoviny, pH senzitivní látky). Vhodná je tato aplikační cesta také u stavů, které vyžadují rychlý nástup účinku léčiva, jako jsou např. angina pectoris (glycerol trinitrát), migréna (rizatriptan) nebo silné bolesti (fentanyl). Sublingvální podání je navíc velmi vhodnou alternativou perorálního podání u pacientů majících problémy s polykáním – malé děti, staří lidé, pacienti trpící nevolností, zvracením a jinými poruchami příjmu potravy [285,287,292,293].

Velmi důležitou oblastí, kde v současnosti vzrůstá význam sublingválního podání je vakcinace. Tato aplikační cesta se může stát vhodnou alternativou invazivního a často špatně přijímaného injekčního podání [287,294]. Sublingvální imunizace přitom indukuje jak systémové, extra-mukozální imunitní odpovědi, tak i mukozální reakce organismu, zatímco parenterální vakcíny vyvolávají pouze systémové odpovědi organismu. Mukozální imunizace je pro včasnou imunitní reakci velmi významná, neboť většina patogenů či alergenů vstupuje do organismu právě přes mukozální epitely [295].

Bylo prokázáno, že sublingvální podání je efektivní při imunoterapii alergické rinitidy a konjunktivitidy [296,297] a je proto doporučováno světovou zdravotnickou organizací (WHO). Vznik imunitní odpovědi byl popsán např. u sublingvální imunizace papilomaviry [298,299]. Užití je ale také možné k imunoterapii alergických reakcí na některé potraviny či u dermatitid [300,301].

#### ***2.2.4 Současné lékové formy pro sublingvální aplikaci***

Sublingvální tablety – jedná se o rychlo rozpustné tablety, které se rozpustí ve slinách v dutině ústní. Čas, po který jsou léčiva dostupná pro mukozální absorpci nepřesahuje 30 minut a velká část je spolknuta dále do GIT, což ovšem může způsobovat vysokou variabilitu absorpce. Výhodou je možnost využití celé sublingvální absorpční plochy. V současné době se k léčbě používají např. tablety s nitroglycerinem (jsou k dispozici již od padesátých let), fentanylem nebo ondansetronem [287].

Delšího kontaktu s absorpční plochou v dutině ústní je možno docílit vytvořením mukoadhezivních tablet. Využití adhezivních polymerů pro formulaci tablet, a tím prodloužení doby kontaktu, bylo zkoumáno např. u zolmitriptanu, kde užití polymeru chitosanu vedlo ke zvýšení BA [302]. Další přípravky na bázi mukoadhezivních tablet

jsou určeny převážně pro bukalní podání, kde nedochází k tak vysokému namáhání materiálu jako u sublingvální mukózy. Z těchto přípravků jsou to např. Fentora™, Ativan®, Striant™, Lauriad® [287].

Orální spreje – roztoky podávané rozprašováním do dutiny ústní jsou používány především pro rychlé podání trinitrátu glycerolu k prevenci a léčbě anginy pectoris. V současnosti jsou chráněny patentem nové přípravky pod názvem RapidMist™, jakožto sprejové lékové formy obsahující akceleranty permeace pro látky větší molekulové hmotnosti, jako např. insulin (Oral-lyn™) [287]. Další aktuálně dostupné přípravky ve formě spreje určené převážně na bukalní mukózu jsou MedRo™, Sativex™, Novamist™ [285].

Náplasti – jedná se o rozpustné systémy určené k podání léčiv do dutiny ústní nebo nerozpustné systémy určené k systémovému transmukozálnímu podání.

Lamely a stripy – jedná se o tenké, rychlerozpustné polymerní filmy. Maximální množství léčiva je většinou omezeno na 20 mg a v místě aplikace se velmi rychle rozpustí (do 30 s). Z toho důvodu se využívají k léčbě onemocnění, která vyžadují rychlý nástup účinku léčiva např. migrény, proti zvracení nebo pro mírnění bolesti. Proti migréně lze podat Maxalt Wafers® (rizatriptan) nebo pro bukalní podání byl testován strip se sumatriptanem [303], pro mírnění bolesti existuje Suboxone® (buprenorfin) [287], proti nevolnosti pak Zuplenz® (ondansetron).

Roztoky, gely, pasty – jsou určeny pouze k léčbě lokálních onemocnění dutiny ústní a nebudou zde rozváděny.

### **2.2.5 Mukoadheze**

Pro zajištění dostatečně dlouhého kontaktu lékové formy a potažmo léčiva s absorpční plochou dutiny ústní je často nezbytné využití mukoadhezivních systémů. Mukoadheze je složitý proces, jehož teoriemi a detaily není účelné se zde zabývat.

Nejrozšířenější skupinou mukoadhezivních látek využívaných pro přípravky určené k podání do dutiny ústní jsou hydrofilní makromolekuly obsahující velké množství skupin schopných tvořit vodíkové můstky (tzv. mokrá adheziva, aktivována zvlhčením) [285]. Ideální mukoadhezivum musí být netoxické, biodegradabilní, nevyvolávat imunitní reakci a být schopné pevné a rychlé adheze k podkladu. Rozdělíme-li polymery na

ionogenní (anionické, kationické) a neionogenní, pak ty ionogenní dosahují silnější adheze k podkladu a anionické jsou z nich nejvíce využívány, díky velmi nízké toxicitě a imunogenezi. Typickým příkladem jsou kyselina polyakrylová a její deriváty mající výborné adhezivní vlastnosti díky silným vazbám na mucin. Z kationických polymerů jsou nejvíce zkoumány a využívány chitosan a jeho obměny, které taktéž vykazují výborné adhezivní vlastnosti [285].

### **2.2.6 Akceleranty prostupu orální mukózou**

Některé nízkomolekulární látky procházejí orální mukózou snadno, avšak většina substancí proniká touto bariérou jen velmi pozvolna nebo nepronikají vůbec. Proteiny a jiné výše molekulární látky nelze podat perorální cestou, kvůli degradaci v nepříznivých podmínkách v GIT a bylo by proto velmi výhodné podat tyto látky orální mukozální cestou. Ke zvýšení a urychlení permeace jinak špatně absorbovatelných látek může pomoci využití akceleračních látek permeace orální mukózou [291].

Ideální akcelerační látka musí být bezpečná, netoxická, nealergizující, chemicky a farmakologicky inertní a neměl by měnit permeabilitu mukózy natrvalo [291].

Permeace léčiv přes orální mukózu může být navýšena několika mechanismy: zvýšením difuzivity tkáně, zvýšením koncentrace léčiva na povrchu mukózy a zlepšením permeačních vlastností léčiva. Nejběžnějším přístupem, jak zlepšit propustnost orální (sublingvální) mukózy, je zvýšit extracelulární transport zvýšením fluidity mezibuněčných lipidů [287].

Ke zlepšení permeace látek orální mukózou jsou využívány látky ze skupin: surfaktanty (benzalkonium chlorid, dodecylsulfát sodný), soli žlučových kyselin (choláty, deoxycholáty sodné), mastné kyseliny (olejová, laurová, kaproová), chelatační sloučeniny (EDTA, citronan sodný, polyakryláty), chitosan a jeho deriváty, cyklodextriny ( $\alpha, \beta, \gamma$ -cyklodextrin), fosfolipidy (lecitin, didekanoylfosfatidilcholin) a nezařazené látky (metanol, etanol, sulfoxidy, močovina) [291,304].

### **2.2.7 Testování permeace látek orální mukózou *in vitro***

Nejčastěji využívané metody testování permeace léčiv orální mukózou *in vitro* spočívají v izolaci mukozálních tkání a jejich uchycení do permeačních komůrek. Mezi nejvíce

používanými jsou vertikální Franzovy difúzní cely nebo horizontální Ussingovy komory. K testování je využíváno zvířecích sublingválních nebo bukalních tkání a nejčastěji se jedná o mukózy prasat, z důvodu jejich vysoké podobnosti k lidským tkáním, relativně snadné dostupnosti a nízké finanční náročnosti [291].

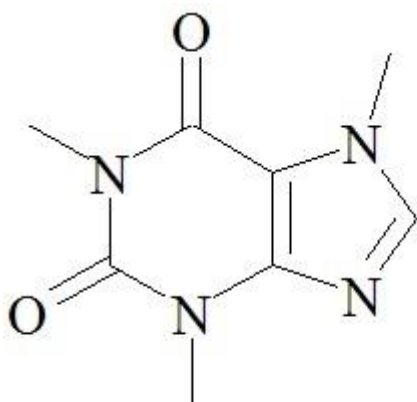
Výhody testování *in vitro* spočívají v možnosti provedení experimentů za dobře definovatelných podmínek k vyčíslení hodnot fluxů látek přes použitou mukózu. Z nevýhod je limitující především omezená plocha testování, možnost poškození tkáně, nízká možnost automatizace a náročnost preparace. Navíc je odebraná tkáň umístěna do umělého prostředí, takže její viabilita a funkčnost je taktéž otázkou [291].

Z výše uvedeného vyplývá, že orální mukozální podání má velké množství výhodných vlastností pro podání některých léčiv. Terapeutická paleta se proto neustále rozrůstá o nové přípravky pro podání touto cestou. Nanovláknenné membrány jsou ideálním nanomateriálem právě pro tuto aplikační cestu. Díky velké materiálové variabilitě nanovláken mohou být jejich použitím aplikovány jak nízkomolekulární léčiva jako např. triptany k léčbě migrény, tak i vysokomolekulární látky typu proteinů (např. inzulin). Velmi široký výběr použitelných polymerů umožňuje nanovláknenný nosič snadno obdařit mukoadhezivními vlastnostmi, navíc nízká hmotnost, vysoká flexibilita a odolnost jsou pro formulaci lékové formy určené k aplikaci na orální, zvláště pak sublingvální, mukózu ideálními vlastnostmi.



## 2.3 Studovaná léčiva

### 2.3.1 Kofein



**Mw = 194,2 g/mol**  
**log P = -0,07**  
**pKa = 10,4**  
**Tt = 238 °C**

**Obrázek 5** Strukturální vzorec kofeinu a jeho základní charakteristiky.

Sumární vzorec: **C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>**

Kofein je velmi široce používanou substancí především pro svůj stimulační účinek na CNS. Jedná se o alkaloid ze skupiny trimethylxantinů nacházející se ve více než 60 druzích rostlin. Je přijímán převážně ve formě nápojů (káva, čaj, kola, energetické nápoje), ale také v potravinách (např. čokoláda). V kombinaci s jinými látkami je dostupný v tabletách proti únavě a jeho kombinace jsou také s výhodou užívány k tlumení bolesti, kde byl prokázán jeho potenceční účinek (např. s paracetamolem nebo některými NSAID) [305,306].

Účinky kofeinu jsou primárně přičítány blokaci adenosinových receptorů A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub>. Po perorálním podání je rychle vstřebáván a maximálních koncentrací dosahuje během 30 minut až dvou hodin. Díky dobré rozpustnosti ve vodě i nepolárních rozpouštědlech snadno proniká buněčnými membránami a jeho BA dosahuje až 100 %. Vazba na plazmatické proteiny je relativně nízká, činí pouze 10 % až 35 % [305].

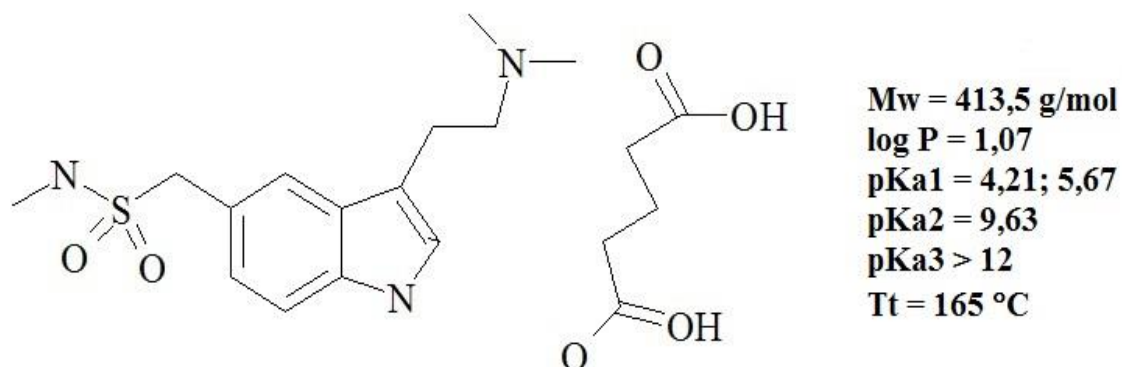
V 80. letech byl prokázán zesilující účinek kofeinu k mírnění bolesti v kombinaci s acetaminofenem nebo k. acetylsalicylovou. Současné studie ukazují, že kombinace s kofeinem jsou účinné k mírnění bolesti hlavy, avšak v pooperačních a poúrazových bolestech je jeho adjuvantní účinek minimální [306].

Rychlé podání vyšších dávek kofeinu bylo popsáno jako účinné pro úlevu od bolesti hlavy, zde má pravděpodobně nejvyšší význam vazokonstrikční účinek kofeinu [306].

Každodenní užívání kofeinu je někdy naopak spojováno s rozvojem chronických bolestí hlavy a migrény.

Pro výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti je kofein často využíván jako modelové léčivo pro testování permeace pokožkou a jinými mukozálními membránami.

### 2.3.2 Sumatriptan sukcinát



**Obrázek 6** Strukturní vzorec sumatriptanu sukcinátu a jeho základní charakteristiky.

Sumární vzorec: **C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S**

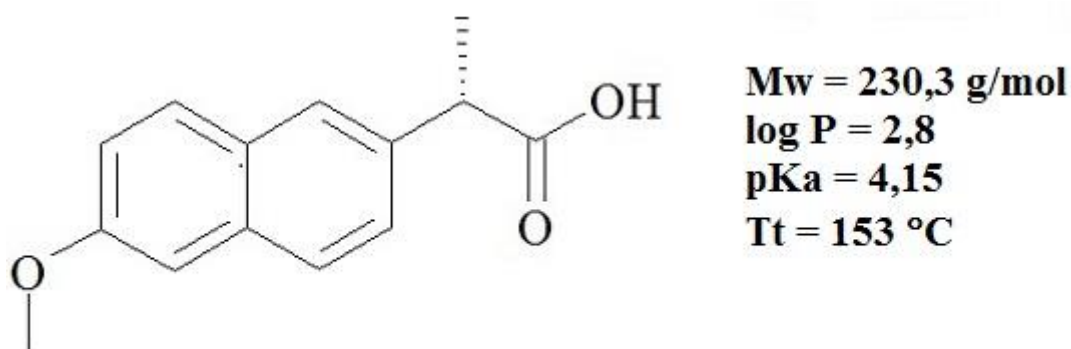
Sumatriptan je nejstarší a stále nejvíce používanou molekulou ze skupiny triptanů. Jedná se o agonistu 5-HT<sub>1B,D</sub> receptorů účinných při léčbě migrény. Účinek triptanů nezahrnuje pouze léčbu bolestí hlavy, ale působí i na ostatní symptomy migrény [307,308].

Migréna je chronická, opakující se nemoc mozku postihující okolo 12 % západní populace. Projevuje se jako jednostranné bolesti hlavy, často doprovázené dalšími symptomy. Jsou mezi nimi nejčastěji nevolnost až zvracení, citlivost na světlo a zvuky. Doba trvání ataku migrény je obvykle v rozmezí čtyř hodin až třech dnů [307]. Zhruba v 15 % případů jsou migrenózní bolesti hlavy provázeny aurou, což je přechodná neurologická porucha charakteristická visuálními a senzorickými symptomy. Migréna má velmi silný dopad na nemocného a postihuje kvalitu jeho života a schopnost pracovat [309,310].

Sumatriptan je využíván k léčbě středně silných a těžkých migrenózních bolestí hlavy (s aurou i bez ní). V současné době je vyráběn ve formě tablet (klasické i rychlo rozpustné) s obsahem 50 mg a 100 mg sumatriptanu a ve formě subkutánních injekcí (4 mg a 6 mg). V těchto lékových formách je v podobě lépe rozpustné soli sukcinátu. Vyráběn je také

ve formě nosního spreje (10 mg a 20 mg), zde se jedná o samotnou bázi sumatriptanu [303,311]. Biologická dostupnost po perorálním podání dosahuje pouhých 14% (převážně kvůli vysokému first-pass metabolismu) a po nasálním podání 16%. Injekční podání i přes svůj rychlý nástup účinku a vysokou BA je špatně přijímáno, proto jsou neustále zkoumány další možné aplikační cesty pro tuto substanci např. bukální [303], transdermální [312–314] či rektální [315,316]. Prozkoumání možnosti sublingvální aplikace této látky je z těchto důvodů velmi aktuálním tématem.

### 2.3.3 Naproxen



**Obrázek 7** Strukturální vzorec naproxenu a jeho základní charakteristiky.

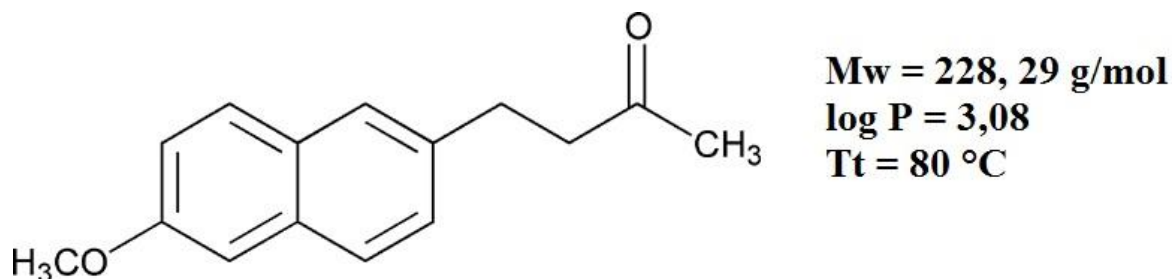
Sumární vzorec: **C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>**

Naproxen, popř. jeho sodná sůl, patří do skupiny nesteroidních protizánětlivých látek (NSAID) používaných ke snížení příznaků zánětu, bolesti a teploty. Kyselá forma je užívána pro topické podání nejčastěji ve formě gelu, zatímco pro perorální podání se používá sodná sůl, která je lépe rozpustná ve vodě a její BA dosahuje po perorálním podání 95%. Naproxen je užíván k léčbě artritidy, zánětu šlach a středně silných až silných bolestí (menstruačních bolestí, bolestí zubů a migrenózních bolestí) [308]. Nevýhodou perorálního podání léčiva jsou nežádoucí účinky na žaludek, kde může způsobovat dyspepsii, krvácení až vředy [317].

Naproxen je také podáván v kombinaci se sumatriptanem (Treximet®), což přináší lepší účinek při potlačování příznaků migrény, než podání jednotlivých léčiv samostatně [308,317]. Tato kombinace pomáhá i některým pacientům, kterým monoterapie sumatriptanem nepomáhala. Výsledky studií ukázaly, že je účinná nejen u klasických příznaků migrény, ale i netradičních příznaků, jako jsou bolest až tuhnutí šíje a bolest

utin. Navíc je u této kombinace nižší výskyt recidivy migrény, pravděpodobně díky delšímu poločasu naproxenu [308,317,318].

### 2.3.4 Nabumeton



**Obrázek 8** Strukturní vzorec nabumetonu a jeho základní charakteristiky

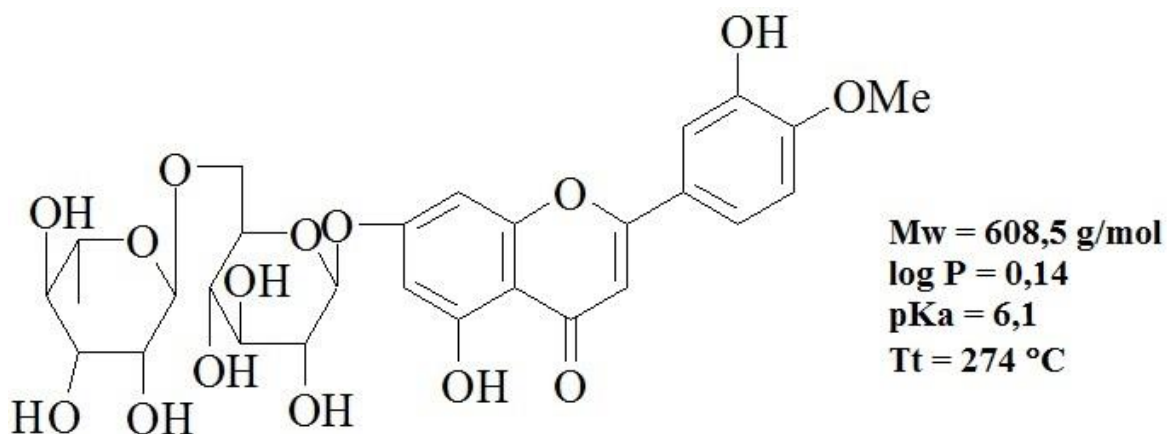
Sumární vzorec: **C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>**

Nabumeton je nekyselý proléčivo patřící do skupiny NSAID používané k léčbě zánětů či artritidy. Je absorbován primárně v duodenu, avšak jeho plasmatické hladiny jsou příliš nízké, než aby mohly být detekovány. To je způsobeno téměř kompletní biotransformací na aktivní metabolit 6-methoxy-2-naflyloctovou kyselinu a další metabolity při průchodu játry [319].

Jedná se o látku téměř nerozpustnou ve vodě. Špatná rozpustnost a následná snížená rychlost absorpce jsou důvodem pomalého nástupu účinku této látky [182].

Snížení velikosti částic léčiva a zvýšení jeho rozpustnosti, jež by mohlo vést ke zvýšení míry a rychlosti absorpce již bylo provedeno a popsáno několika metodami, mezi nimiž byl i ES [182,320,321].

### 2.3.5 Diosmin



**Obrázek 9** Strukturní vzorec diosminu a jeho základní charakteristiky.

Sumární vzorec: **C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>**

Diosmin je v přírodě se nacházející glykosid patřící do skupiny flavonoidů. Je možno ho izolovat z řady rostlin, ale komerčně se získává dehydrogenací z flavonoidu hesperidinu, který je získáván z kůry citrusových plodů. K léčebným účelům byl poprvé využit roku 1969 a dodnes je hojně využíván k léčbě žilních onemocnění (chronické žilní insuficience, otoků, hemoroidální nemoci, varixů). Nejčastěji je podáván v kombinaci s hesperidinem jako mikronizovaná flavonoidní frakce. Diosmin působí také protizánětlivě, antimutageně a vychytává volné radikály [322].

Farmakokinetika diosminu zahrnuje metabolizaci na aglykon diosmetin bakteriemi ve střevě. Diosmetin je následně dobře absorbován a distribuován do těla. Diosmin, jakožto téměř ve vodě nerozpustná látka, nebyl detekován v plasmě a pravděpodobně neprochází přes gastrointestinální bariéru [322,323]. Bylo prokázáno, že mikronizace zvyšuje míru absorpce diosminu, resp. diosmetinu [324] a v současnosti se v komerčně dostupných přípravcích vyskytuje převážně v mikronizované podobě.

Velmi špatně rozpustná látka diosmin je proto ideální modelovou molekulou pro studium možností zvýšení disoluce využitím nanovláčkových nosičů, neboť zlepšení disoluce pravděpodobně povede i ke zvýšené absorpci léčiva po perorálním podání.

## 2.4 Disoluce léčiv a biofarmaceutický klasifikační systém

Disoluce léčiva z lékové formy *in vivo* je jedním z kritických parametrů jeho absorpce a klinického účinku léčiva. Disoluční testy jsou proto velmi významným nástrojem predikce absorpce, určování bioekvivalence a kontroly kvality léčivých přípravků [325].

Za počátek disolučních studií lze považovat práce Noyese a Whitneyho, kteří uskutečnili a popsali první disoluční testy, kdy za konstantní teploty a míchání sledovali rozpustnost dvou slabě rozpustných látek. Jejich práci později rozšířili Brunner a Tolloczko, kteří prokázali, že rychlost rozpouštění je závislá na velikosti a struktuře povrchu, rychlosti míchání a teplotě [326].

V 50. letech minulého století Edwards a brzy po něm Nelson prvně popsali závislost vzniku plasmatických hladin léčiva na rozpustnosti léčiva z lékové formy po perorálním podání [326]. Následovala řada experimentů potvrzující závislost mezi *in vitro* disolucí léčiva a následnou BA po perorálním podání. Ty vedly v 60. letech k uznání vlivu formulace lékové formy na rychlost nástupu účinku a dobu jeho trvání a k definování pojmu biodostupnost, jakožto podíl léčiva dosahující systémové cirkulace. Od 70. let se proto staly disoluční zkoušky součástí lékopisných testů a významným parametrem kontroly kvality. Tyto poznatky také vedly k vývoji prvních lékových forem s postupným uvolňováním léčiv [326].

V 90. letech pak vznikly dvě klíčové práce týkající se absorpce léčiva po perorálním podání. První popsala tři základní parametry – disoluce, absorpce a velikost dávky – určující rozsah absorpce po perorálním podání. Z této práce byl vyvozen biofarmaceutický klasifikační systém (BCS), který vytvořil koncem minulého století (1995) Amidon a kol., když rozdělili léčiva do čtyř základních skupin v závislosti na jejich rozpustnosti a průchodnosti intestinální membránou. První skupinu tvoří léčiva s vysokou rozpustností a průchodností, druhou léčiva špatně rozpustná, ale dobře procházející intestinální membránou, třetí skupinu pak vysoce rozpustná a špatně absorbovatelná a poslední čtvrtou skupinu špatně rozpustná a také špatně absorbovatelná léčiva [326,327]. Následné doporučení vydané FDA z roku 2000 poskytuje regulační přínos pro dobře absorbovatelná léčiva v rychle rozpustných tuhých lékových formách.

V nedávné době vyšla publikace navrhuující rozšíření BCS, a to rozdělením druhé a čtvrté skupiny na podskupiny a, b, c (a-kyselé, b-zásadité, c-neutrální látky), v závislosti na vlastnostech těchto léčiv [325].

BCS tak slouží jako velmi účelná pomůcka pro predikci a odvozování absorpce léčiva ve střevě následující po perorálním podání na základě výsledků *in vitro* disolučních experimentů.

Rychlost disoluce je přímo závislá na rozpustnosti léčiva v daném prostředí a na velikosti povrchu látky v kontaktu s rozpouštědlem (médiem). Ten je primárně závislý na velikosti částic látky; čím menší jsou částice, tím větší je jejich efektivní povrch [325,326]. Soustavy s nanorozměrnými částmi mají proto vysoký předpoklad zvyšovat rychlost disoluce látek.

## 2.5 Polymery

### 2.5.1 Chitosan

Chitin je po celulóze druhým v přírodě nejčastěji se vyskytujícím polymerem. Je tvořen 1,4-N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminem a nejčastěji se získává ze schránek mořských korýšů. Deacetylací za drsných podmínek se z něj vyrábí chitosan. Jakmile stupeň deacetylace dosáhne přibližně 50%, stane se rozpustným v roztocích kyselin a nazývá se chitosan.

Chitosan se skládá z jednotek 1,4- $\beta$ -D-glukosaminu a jeho pKa je 6,5. Běžně komerčně dostupný obsahuje okolo 80 %  $\beta$ -D-glukosaminu a 20 % N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminu (existují ale i z 90 % až 95 % deacetylované chitosany). Chitosan je běžně rozpustný v roztocích organických kyselin při pH pod 6. Vlastnosti těchto roztoků jsou do velké míry závislé na molekulové hmotnosti, stupni deacetylace a rozmístění acetylových skupin na hlavním řetězci. Chitosan má řadu velmi výhodných vlastností. Je biodegradabilní, biokompatibilní, vykazuje i výborné bioadhezivní a antimikrobiální vlastnosti, dále pak urychluje hojení ran a je schopen vázat těžké kovy [327,328].

Elektrostatické zvláknění chitosanu je značně obtížné v důsledku jeho silného kladného náboje v roztocích kyselin způsobeného velkým množstvím aminoskupin v jeho struktuře. Tento jeho přirozený kladný náboj značně zvyšuje povrchové napětí a viskozitu roztoku, a tím ztěžuje ES. Vlákenné struktury byly úspěšně připraveny až ES z roztoku chitosanu v koncentrované k. octové [327], případně s využitím nebezpečné a toxické k. trifluorooctové [329]. Další možností, jak připravit nanovlákna z tohoto polymeru, je přidáním jiného, dobře zvláknitelného polymeru a tvorba kompozitních nanovláken [330,331].

### **2.5.2 Kyselina polyakrylová**

Jde o syntetický polyelektrolyt s výbornými adhezivními vlastnostmi. Její příprava probíhá polymerací k. akrylové v ethylacetátu.

Ve farmacii jsou spíše využívány její síťované vysokomolekulární analogy karbomera (síťováno allyl sukózou nebo allylethery pentaerythritolu) nebo polykarbofil (síťováno divinyl glykolem). Karbomera jsou běžně užívána jako emulgátor, gelotvorná látka, pojivo tablet nebo k tvorbě systémů s modifikovaným uvolňováním. Oba tyto deriváty také vykazují výborné bioadhezivní vlastnosti [332].

ES tohoto polymeru je prováděn nejčastěji z vodných roztoků, u kterých bylo dosaženo lepší homogenity výsledných nanovláken přidáním solí, např. chloridu sodného. Dalšími možnostmi přípravy nanovláken je provádět zvláknění z roztoku dimethylformamidu [333,334] nebo ze směsi vody s etanolem [335]. Takto připravená nanovlákná jsou velmi rychle rozpustná ve vodě. Pro zamezení rozpustnosti je nutné síťování řetězců polymeru, čehož bylo dosaženo například přidávkem  $\beta$ -cyklodextrinu a jeho vynesení do nanovláken s následným zahříváním na 140 °C po dobu 20 min [333].

### **2.5.3 Polyvinylalkohol**

Polyvinylalkohol je ve vodě rozpustný syntetický polymer. Vykazuje dobrou biokompatibilitu a také dobré adhezivní vlastnosti. Běžně komerčně dostupný je o molekulové hmotnosti 20 000–200 000 g/mol v podobě bílého až krémového granulovaného prášku. Vyráběn je hydrolýzou z polyvinylacetátu a výsledný polymer může obsahovat určité množství karboxylových skupin, což má pak vliv i na jeho vlastnosti (plně hydrolyzovaný  $T_m=228$  °C, částečně hydrolyzovaný  $T_m=180-190$  °C) [332]. Ve farmacii je převážně užíván v topických přípravcích (stabilizátor emulzí, součást transdermálních náplastí) nebo jako viskozifiant v očních přípravcích [332]. PVA je polymer velmi dobře rozpustný ve vodě a ES je z jeho vodných roztoků úspěšně prováděn. Na druhou stranu takto vzniklá vlákna jsou rychle rozpustná ve vodě. K potlačení této rozpustnosti se využívá síťování řetězců polymerů. Velké množství vícefunkčních látek schopných reagovat s hydroxylovými skupinami mohou být užity jako činidla k síťování. Za tímto účelem jsou nejčastěji využívány glyoxal, k. fosforečná nebo maleinová [336,337].



#### **2.5.4 Poly- $\epsilon$ -kaprolakton**

Je syntetický, termoplastický, semikrystalický (69 %), alifatický polyester s nízkou teplotou tání (58–60°C) i nízkou teplotou skelného přechodu ( $T_g = -72$  °C). Přípravuje se katalytickou polymerizací s otevřením kruhu  $\epsilon$ -kaprolaktonu při 170 °C. Další důležité vlastnosti, kterými se vyznačuje, je elasticita, biodegradabilita, biokompatibilita a disponuje také výbornými mechanickými vlastnostmi [332]. Díky tomu je používán při výrobě chirurgických nití a vláken, může být použit jako nosič léčiv, podklad pro kultivaci buněk nebo pro formulaci implantátů, které se po uzdravení tkáně v organismu rozloží. Výzkum a využití tohoto polymeru se proto v současné době velmi rozšiřuje [339–342].

ES tohoto nepolárního polymeru je možno provést za použití organických, často toxických, rozpouštědel jako jsou chloroform, dimethylformamid, tetrafluoroethylen nebo dichlorethan. Možností vyhnout se těmto rozpouštědlům je použití směsi relativně bezpečných organických kyselin, octové a mravenčí, které navíc umožňují tvorbu homogenních vláken nízkých průměrů [342]. Zcela vyloučit rozpouštědla umožňuje ES z taveniny díky nízké teplotě tání tohoto polymeru [23].

#### **2.5.5 Kyselina polyléčná**

Tato kyselina je jedním z nejslibnějších syntetických biodegradabilních polymerů. Syntéza PLA zahrnuje zpracování a katalytickou polymerizaci monomeru. Kyselina mléčná je jednoduchá molekula s jedním chirálním centrem. Z toho vyplývá, že se vykytuje ve dvou enantiomerech, tedy L- a D-mléčná kyselina. Je produkována v savcích svalech v průběhu glykogenolýzy a je zapojena i do Krebsova cyklu. Dá se snadno připravit fermentací melasy, bramborového škrobu nebo dextrózy z kukuřice [343].

Mezi další vlastnosti tohoto hydrofobního, biodegradabilního polymeru (degradace na k. mléčnou běžně přítomnou v organismu) jsou biokompatibilita, dobré mechanické vlastnosti (převážně L forma), široká škála rychlosti degradace a dobrá termická zpracovatelnost [343]. Termické a mechanické vlastnosti jsou do značné míry závislé na molekulové hmotnosti a složení polymeru (D nebo L forma) a je proto možné je syntetizovat na míru [332].

Současné studie se převážně soustřeďují na vývoj nových materiálů k. mléčné vazbou s jinými biodegradabilními polymery, jako jsou například chitosan, PCL a PEO.

Záměrem je vytvořit matrix s nejvýhodnějšími vlastnostmi pro specifické použití, např. implantáty, katetry, cévní štěpy, chirurgické šicí materiály, materiály k nápravě vazů ašlach. V oblasti tkáňového inženýrství tyto biodegradabilní materiály představují vhodné podklady pro regeneraci a rekonstrukci lidských tkání (orgánů) a předpokládá se velký rozvoj v oblasti tohoto polymeru jako bio-materiálu [343].

Tvorba nanovláken z PLA byla popsána z roztoků organický rozpouštědel; nejčastěji se jednalo o chloroform, dichlormetan nebo hexafloropropanol [344–346]. ES je také možný ze směsí více organických rozpouštědel [199].

### **2.5.6 Hydroxypropylcelulosa**

HPC je částečně substituovaný hydroxypropyléter celulosy, který je komerčně dostupný v molekulové hmotnosti 50–1250 tisíc. Výroba probíhá z čištěné celulózy převedením na alkalicelelulosu a její reakcí s propylenoxidem. Je dobře rozpustná ve studené vodě a nízkých alifatických alkoholech a vykazuje dobrou biokompatibilitu. Ve farmacii je hojně využívána v topických a perorálních přípravcích, a to jako emulgátor, stabilizátor, viskozifiant, pojivo nebo součást obalu potahovaných tablet [332]. Stabilizační účinek HPC může být také využit u supersaturovaných roztoků, kde byl demonstrován její efekt na zpomalení precipitace některých látek [347].

HPC je možno ES převést do nanovláken z roztoků bezvodých alkoholů – etanol či propanol [348], a to až v koncentraci 15 %. ES z vodných roztoků probíhá často s výskytem defektů na výsledných nanovláčkách a je proto s výhodou přidat dobře zvláknitelný polymer PEO, který umožní tvorbu homogenních, velmi tenkých vláken [349].

### 3. Cíle

Základním cílem práce bylo prozkoumat vlastnosti nově formulovaných nanovlákných membrán s obsahem účinných látek se záměrem ověřit jejich teoretické předpoklady pro zlepšování parametrů rozpustnosti a liberace léčiv, pro zlepšování permeace léčiv přes biologickou membránu *in vitro* a pro zlepšování perorální biodostupnosti léčiv *in vivo*. Cílem teoretické části bylo shrnout aktualizované informace o elektrospiningu, jeho možných využitích a dosud studovaných kombinacích polymerů a léčivých látek v nanovláknách.

V tomto rámci spočíval první úkol v:

- formulaci nových nanovlákných membrán s navazujícím testováním liberace vybraných léčiv z rozdílných typů farmaceutických polymerů zvlákněných průmyslově využitelnou technologií elektrospiningu. Výběr léčiv byl orientován na nízkomolekulární látky, použitelné k systémovému podání a výběr polymerů byl zaměřen především na tvorbu prakticky použitelných flexibilních nanovlákných nosičů, vykazujících vysokou kapacitou pro inkorporaci zvolených aktivních látek.
- ověření primárních kvalitativních parametrů nanovlákných soustav elektronovou mikroskopií a diferenční skenovací kalorimetrií se zaměřením na homogenitu soustav a fyzikální stav inkorporovaných léčiv.
- realizaci srovnávací liberační studie nanovlákných membrán s litými membránami stejného chemického složení.

Získané dílčí výsledky by měly umožnit realizaci hlavního cíle druhé etapy práce:

- ověření teoreticky výhodných vlastností vybraných nově formulovaných nanovlákných nosičů pro systémové podání léčiv (sumatriptan a naproxen) sublingvální aplikační cestou v *in vitro* permeačních pokusech.

Třetí část práce byla zaměřena na:

- tvorbu nanovlákného nosiče s diosminem, který je perorálně špatně rozpustným léčivem ze 4. skupiny BCS, a jeho následné disoluční testování.
- srovnávací disoluční studii s dostupnými formami diosminu v případě úspěšného řešení rozpustnostních vlastností zmíněného léčiva.

- realizaci pilotního *in vivo* testu perorální biodostupnosti a dále také provedení porovnání základních *in vivo* farmakokinetických parametrů s již zavedeným mikročasticovým přípravkem s obsahem diosminu.

## 4. Materiály a Metody

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Látky

##### 4.1.1.1 Účinné látky

Kofein .....	Kulich Pharma
Nabumeton.....	Sigma-Aldrich
Sumatriptan sukcinát.....	Teva Pharmaceuticals
Naproxen.....	Sigma-Aldrich
Naproxen sodný .....	Sigma-Aldrich
Diosmin.....	Sigma-Aldrich
Diosmetin.....	Abcam Biochemicals

##### 4.1.1.2 Polymery

Polyvinylalkohol (Mw = 40 000 g/mol) .....	Nippon Gohsei
K. polyakrylová (Mw = 450 000 g/mol).....	Scientific Polymer Products
Chitosan (Mw = 60 000–120 000 g/mol).....	Sigma-Aldrich
Poly-ε-kaprolakton (Mw = 100 000 g/mol) .....	Scientific Polymer Products
K. polymléčná (typ 4032D) .....	NatureWorks LLC
Polyethylenoxid (Mw = 400 000 g/mol).....	Scientific Polymer Products
Hydroxypropylcelulosa (Mw = 100 000 g/mol) .....	Acros Organics

##### 4.1.1.3 Rozpouštědla

Methanol pro HPLC.....	Fisher Scientific
Acetonitril pro HPLC.....	Fisher Scientific
Voda pro HPLC .....	FaF UK
Čištěná voda.....	FaF UK

##### 4.1.1.4 Další suroviny

Dihydrogenfosforečnan amonný (čistý, p.a.).....	Lachner
---	---------

Dihydrogenfosforečnan draselný (čistý, p.a.).....	Lachner
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Ph. Eur. 7).....	Kulich Pharma
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Ph. Eur. 7).....	Kulich Pharma
K. fosforečná (84–87 %, p.a.).....	Lachner
K. mravenčí (98 %, p.a.).....	Lachner
K. octová (čistá, p.a.).....	Penta Chem.
Hydroxid sodný (čistý) .....	Penta Chem.
Hydroxid draselný (čistý) .....	Penta Chem.
Amoniak (25–29 %, p.a.).....	Penta Chem.
K. chlorovodíková (35 %, p.a.) .....	Penta Chem.
K. citronová mohohydrát (ČL 2005) .....	Kulich Pharma
Chlorid sodný (čistý) .....	Penta Chem.
Azid sodný (čistý, p.a.) .....	Lachner

Všechny použité suroviny byly farmaceutické kvality nebo vyšší a byly použity v podobě deklarované výrobcem, resp. dodavatelem.

#### **4.1.2 Přístroje a zařízení**

Analytické váhy .....	Pioneer 11.3301 (Ohaus, USA)
Analytické váhy .....	Discovery DV 215CD (Ohaus, USA)
Laboratorní předvážky.....	440-45N (Kern, SRN)
Magnetická míchačka .....	Hei-Standard (Heidolph, SRN)
Ultrazvuková lázeň .....	UC002PC (Tesla, ČR)
Vodní lázeň (termostat) .....	Grant JB5 (Fisher Scientific, VB)
Ponorná magnetická vícemístná míchačka.....	Variomag Telesystem (Fisher Scientific, VB)
Digitální pH metr .....	209 L (Gryf, ČR)
Diferenční skenovací kalorimetr.....	200 F3 MAJA (Netzsch, SRN)
Skenovací elektronový mikroskop.....	NOVA NanoSem 230 (FEI, USA)
Zařízení na ES.....	Nanospider™ NS 1WS500U (Elmarco, ČR)
Kapalinový chromatograf .....	Agilent Tech. 1200 (Agilent, USA)

**Tabulka 5** Složení HPLC sestavy Agilent Technologies 1200

Autosampler	ALS1329A
Degaser	G1379B
Isokratické čerpadlo	Iso pump G1310A
Kolony	Zorbax Eclipse Plus a Zorbax Eclipse XDB C18 oktadecylsilanový sorbent; průměr 4,6 mm, délka 150 mm nebo 250 mm, zrnitost 5 mikronů
Termostat	TCC G1316A
UV/VIS detektor	VWD G1414B

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Příprava nanovlákných membrán

Nanovlákné membrány byly vyrobeny elektrostatickým zvláknováním na zařízení Nanospider (**Obrázek 3**). ES probíhal z předem připravených roztoků polymerů ve vhodném rozpouštědle. K vytvoření povrchu, z něhož docházelo k tvorbě nanovláken, byl v uvedeném zařízení používán buď válec smáčený v roztoku polymeru, nebo struna, na kterou byl roztok nanášen z rezervoáru. Aplikované napětí se pohybovalo v rozmezí 60 kV až 80 kV a vzdálenost kolektoru byla od 10 cm do 20 cm v závislosti na zvláknované polymerní soustavě.

Nanovlákný materiál se ukládal ve formě netkané nanovlákné membrány na nosné textilii, tzv. spunbondu, překrývajícím desku kolektoru. Tento spunbond byl v zařízení tažen určitou rychlostí (15–30 mm/min), přičemž rychlost posunu určuje tloušťku, resp. plošnou hmotnost nanovlákné membrány vznikající ze zvláknovaného materiálu.

#### 4.2.1.1 Složení roztoků pro ES a příprava nanovlákných membrán

**PVA** ve směsi vody a k. fosforečné (99,3:0,7) v koncentraci 11 %;

**PAA** ve vodném roztoku chloridu sodného 0,1 mol/l v koncentraci 6 % s přídavkem  $\beta$ -cyklodextrinu 1,2 %;

**CHI** byl rozpuštěn ve směsi k. octové a vody (2:1) v koncentraci 2,25 %;

**PCL** ve směsi k. octové a mravenčí (2:1) v koncentraci 12 %;

**PLA** ve směsi chloroformu, dichlorethanu a etylacetátu (61:29:10) v koncentraci 7 %.

V případě kompozitních polymerních nanovláken byl roztok připraven z **PVA**, **HPC** a **PEO** v poměru 47,5:45:7,5.

Polymery byly nejprve rozpuštěny jednotlivě v čištěné vodě a následně smíseny v daném poměru. Finální koncentrace polymerů v roztoku byla 10 %.

Účinné látky (SUS, NAP, NAPS, kofein, nabumeton, diosmin) byly přidány do připravených roztoků polymerů, a to v koncentracích 5 % až 40 % počítáno na hmotnost polymerů v roztocích. Tyto soustavy byly míchány, dokud nevznikl homogenní roztok polymeru s léčivem a ten byl následně přelit do zásobníku zařízení NS. Po aplikaci požadovaného elektrického napětí se tvořily nanovlákná, která se ukládala na spunbondu.

Síťování ve vodě rozpustných polymerů (PAA, PVA) bylo uskutečněno zahříváním na 130 °C po dobu 15 min v případě PVA, resp. 140 °C po dobu 20 min v případě PAA. Síťování proběhlo chemickou reakcí, kde činidlem byla k. fosforečná (PVA) nebo  $\beta$ -cyklodextrin (PAA).

#### **4.2.2 Příprava litých membrán**

Lité membrány byly připraveny z roztoků polymerů (PAA, PVA, PLA) ve stejných rozpouštědlech a o stejných koncentracích použitých při přípravě nanovláknenných membrán. Po kompletním rozpuštění polymeru v rozpouštědle byl za stálého míchání na magnetické míchačce přidán kofein (popř. nabumeton) v koncentraci 5 % nebo 10 % (počítáno na hmotnost polymeru). Jakmile byla tato směs homogenní, byla rozprostřena na antiadhezivní hliníkovou folii a ponechána do kompletního odpaření rozpouštědla. Hotový polymerní film byl umístěn do exsikátoru, kde byl ponechán do doby experimentu (minimálně 24 hodin).

#### **4.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie**

Z každé z připravených membrán byly z různých míst odebrány vzorky, jež byly podrobeny analýze pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Sledovány byly průměry vláken membrán, dále výskyt případných defektů vláken a krystalů léčiv a celková strukturní homogenita membrán.



Průměry připravených vláken byly vypočteny z 30 naměřených hodnot a uvedené hodnoty jsou průměrné  $\pm$  směrodatná odchylka. Měření byla provedena ve firmě Elmarco s.r.o, Liberec.

#### **4.2.4 Diferenční skenovací kalorimetrie**

Vzorky pro DSC byly umístěny do příslušných kelímků a zváženy s přesností na setiny miligramu. V přístroji byly vzorky zahřívány rychlostí 5 °C/min a to od 20 °C do 200 °C (pro vzorky obsahující sumatriptan, naproxen) a rychlostí 10 °C/min od 20 °C do 300 °C (pro vzorky s diosminem). DSC analýza byla provedena pod ochrannou atmosférou dusíku (průtoková rychlost 40 ml/min).

#### **4.2.5 Liberační experimenty**

Liberační experimenty z nanovláknenných membrán probíhaly za konstantní teploty (36,5 °C  $\pm$  0,5 °C) a kontinuálního míchání disolučního média magnetickými míchadly (délka 10 mm; 200 rpm) na vodní lázni opatřené termostatem a magnetickým mícháním. Vzorky nanovláknenných membrán byly zváženy s přesností na desetinu miligramu a umístěny do uzavíratelné skleněné nádoby o objemu 10 ml, 20 ml případně 250 ml. Na začátku experimentu bylo do nádoby vloženo magnetické míchadlo a byla naplněna požadovaným objemem temperované akceptorové fáze. Poté byla uzavřena a umístěna na vodní lázeň předem vytemperovanou na požadovanou teplotu. Vzorky (0,6 ml) akceptorové fáze byly odebírány ve vhodných, předběžným pokusem určených časových intervalech. Objem fáze odebraný ke stanovení byl zpětně doplněn temperovanou akceptorovou fází. Odebrané vzorky byly před analýzou krátce uchovány při teplotě 4 °C a následně byl stanoven obsah sledovaných substancí s využitím HPLC.

Jako akceptorové fáze byly použity fosfátové pufrý (dle Sørensen) o pH 7,4 a pH 7,8.

Jednotlivá měření byla prováděna minimálně se třemi vzorky a uvedené výsledné hodnoty jsou vypočteny jako průměry  $\pm$  jejich směrodatné odchylky.

#### **4.2.6 Permeační in vitro experimenty**

Pro permeační experimenty byly využity sublingvální membrány získané z jazyků čerstvě poražených prasat. Jazyky byly dodávány z regionálního masokombinátu. Podjazykové

mukózy byly chirurgickým skalpelem jemně zbaveny svalové tkáně a částečně submukózy. Takto připravené sublingvální membrány měly tloušťku cca 0,4 mm. Zpracované membrány byly krátce uloženy ve fyziologickém roztoku s přídavkem azidu sodného (0,02 g/l) a před samotnými permeačními experimenty rozděleny na přibližně čtvercové části velikosti potřebné ke spolehlivé fixaci a ty pak uchyceny mezi donorový a akceptorový oddíl permeační cely. Celková plocha dostupná pro permeace látek činila 2 cm<sup>2</sup>. Membrány, které nebyly ihned využity pro permeační experimenty, byly zamraženy tekutým dusíkem a následně uchovány při teplotě - 18 °C.

Akceptorový kompartment byl naplněn vytemperovanou akceptorovou fází (fosfátový pufr o pH 7,4) a na začátku experimentu byl na membránu vložen donor sledované substance. Jako donor sloužily buď roztoky sledovaných účinných látek, nebo nanovlákněné membrány s inkorporovaným léčivem. Vzorke akceptorové fáze (0,6 ml) byly odebírány ve vhodných, předem vybraných, časových intervalech a odebraný objem doplněn temperovanou akceptorovou fází. Odebrané vzorky byly krátce uchovány za snížené teploty (4 °C) a následně analyzovány na obsah sledovaných substancí s využitím HPLC.



**Obrázek 10** Permeační cely

Donorové roztoky s obsahem SUS byly připraveny v koncentracích 1, 3 a 6 % v citrátovém pufru pH 3,9 nebo fosfátovém pufru (dle Sørensen) pH 7,4 nebo ortofosfátovém pufru pH 12.

Donorové roztoky s obsahem NAPS byly připraveny v koncentracích 1, 2, 3 a 10 % ve fosfátovém pufru (dle Sørensen) pH 7,4.

Jednotlivá měření byla prováděna vždy se čtyřmi vzorky a uvedené výsledné hodnoty jsou vypočteny jako průměry  $\pm$  jejich střední (standardní) chyba průměru.

#### ***4.2.7 Testování perorální in vivo biodostupnosti diosminu***

Tyto experimenty byly uskutečněny na katedře farmakologie a toxikologie FaF UK v Hradci Králové ve spolupráci s prof. PharmDr. Ing. M. Lázníčkem, DrSc. a paní Janou Hoderovou.

Vzorky nanovlákných membrán obsahujících 30 % diosminu a vzorky mikronizovaného prášku byly připraveny tak, aby každý vzorek podaný sondou do žaludku pokusného zvířete obsahoval 3,5 mg diosminu, což odpovídá doporučené denní dávce diosminu pro dospělého člověka (900 mg).

Farmakokinetická studie byla provedena na šesti krysách (hmotnost zvířete  $300 \pm 50$  g, BioTest, Konárovice). Pod pentobarbitalovou anestézií jim byly pomocí kanyly aplikovány do zažívacího traktu vzorky s obsahem diosminu. Krysy byly připoutány k operačnímu stolu a do karotidy jim byla zavedena kanyla pro opakovaný odběr vzorků. Po odebrání vzorku krve (přibližně 0,6 ml) byla kanyla proplachována roztokem heparinu (50 IU). Vzorky byly odebírány ve zvolených intervalech od podání dávek diosminu, umístěny do zkumavek a plasma byla okamžitě oddělena pomocí centrifugy (1 min, 3000 rpm). Vzorky plasmy byly dále použity ke stanovení obsahu diosmetinu.

Uvedené výsledné hodnoty jsou vypočteny jako průměry  $\pm$  střední (standardní) chyba průměru.

## **4.2.8 Stanovení léčiv**

### *4.2.8.1 Kofein*

Mobilní fáze pro stanovení kofeinu byla směsí vody a metanolu v poměru 75:25 (V/V) s přidavkem 2 ml k. mravenčí na litr fáze. Průtoková rychlost byla 1,5 ml/min při délce analýzy 7,5 min. Separace probíhala při teplotě 25 °C na koloně s reverzní fází 150 mm × 4,6 mm. Vlnová délka pro detekci byla nastavena na 273 nm.

### *4.2.8.2 Sumatriptan*

Mobilní fáze byla směsí fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) a acetonitrilu v poměru 84:16 (V/V), pH vzniklé směsi bylo upraveno na hodnotu 3 přidavkem k. fosforečné (0,1 mol/l). Průtoková rychlost systémem byla optimalizována na 1,5 ml/min s délkou analýzy 5 min. Jedná se o metodu, kterou vypracoval Nozal a kol. [350]. Vlnová délka pro detekci substance byla stanovena na 282,7 nm kvůli velkému množství reziduí z kůže interferujících při vlnové délce 227,4 nm [351]. Separace probíhala při teplotě 30 °C na koloně s reverzní fází 250 mm x 4,6 mm.

### *4.2.8.3 Nabumeton*

Mobilní fáze byla směsí vody a acetonitrilu v poměru 55:45 (V/V) s přidavkem k. octové (10 ml/l). Průtoková rychlost byla optimalizována na 1,5 ml/min při délce analýzy 10 min. Separace probíhala při teplotě 30 °C na koloně s reverzní fází 250 mm x 4,6 mm. Vlnová délka pro stanovení byla 225 nm. Metoda byla převzata z publikace [319] a upravena pro podmínky stanovení.

### *4.2.8.4 Naproxen*

Mobilní fáze byla směsí dihydrogenfosforečnanu draselného a acetonitrilu v poměru 55:45 (V/V), pH směsi bylo upraveno na 2,5 přidavkem k. fosforečné (0,1 mol/l). Průtoková rychlost byla nastavena na 1,5 ml/min při délce analýzy 7,5 min. Separace probíhala při teplotě 25 °C na koloně s reverzní fází 150 mm x 4,6 mm. Vlnová délka detekce byla nastavena na 230 nm.

#### 4.2.8.5 Diosmin

Úprava vzorků před stanovením: Vzorky byly po odebrání zfiltrány (mikrobiální filtr 0,22  $\mu\text{m}$ ) a doplněny 0,1 mol/l hydroxidem sodným v poměru 1:1 pro zamezení případné krystalizace v průběhu analýzy.

Mobilní fáze byla směsí vody a metanolu v poměru 51:49. Průtoková rychlost byla nastavena na 1,3 ml/min a délka analýzy byla 7,5 min. Separace probíhala při teplotě 35 °C na koloně s reverzní fází 250 mm x 4,6 mm. Vlnová délka detekce byla nastavena na 270 nm.

#### 4.2.8.6 Diosmetin

Metoda byla převzata z analytické metody zabývající se podobnými flavonoidy [352] a upravena pro danou substanci a podmínky stanovení.

Vzorek plasmy (200  $\mu\text{l}$ ) byl přenesen do zkumavky a k němu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  k. chlorovodíkové (10 mol/l) a 200  $\mu\text{l}$  metanolu. Zkumavka byla uzavřena víčkem a míchána 30 sekund na vortexu. Tato směs byla zahřívána na 90°C po dobu 2 hodin (probíhala hydrolýza), poté byla schlazena na pokojovou teplotu a bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  amoniaku (15 mol/l) k ukončení reakce. Směs byla extrahována 4 ml metanolu, vortexována po dobu 2 min a umístěna do ultrazvukové lázně na dalších 30 min a nakonec centrifugována (3000 rpm) po dalších 20 min. Supernatant (3,5 ml) byl odebrán a odpařen do sucha. Zbytek po odpaření byl opět rozpuštěn ve 400  $\mu\text{l}$  metanolu, vortexován 2 min a následně odstředován (5000 rpm) po dobu 10 min. Takto připravený vzorek byl použit pro stanovení diosmetinu pomocí HPLC.

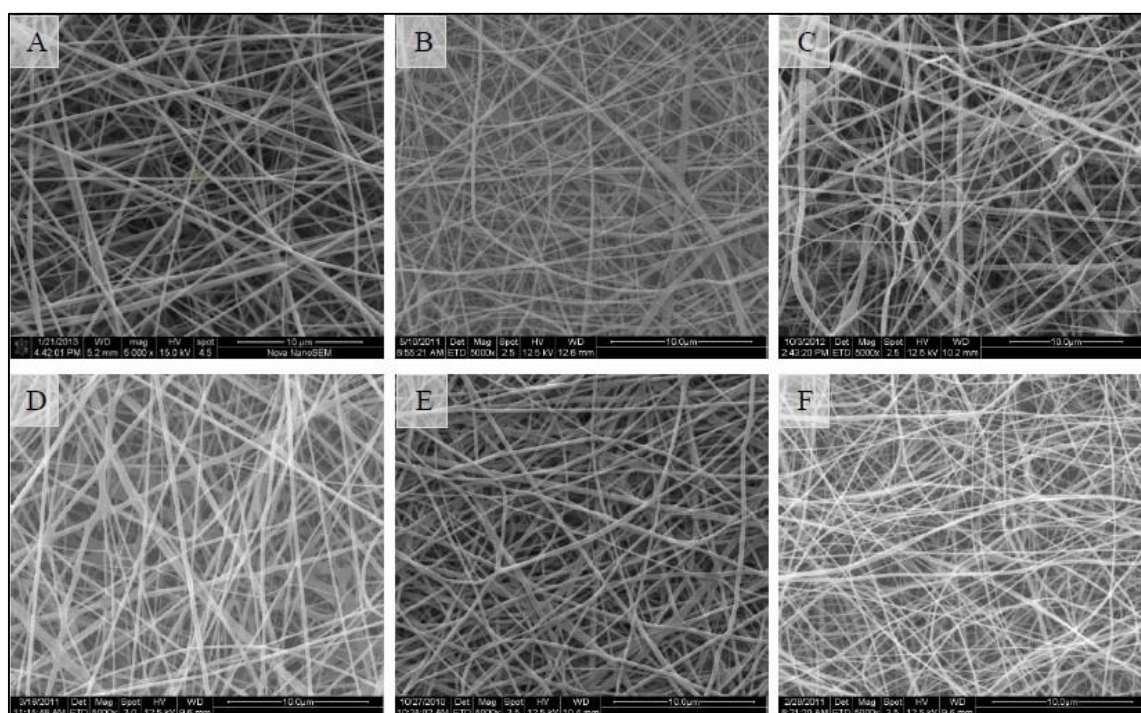
Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a dihydrogenfosforečnanu sodného (0,02 mol/l) v poměru 35:65 (V/V) a pH bylo upraveno na 2,0 přidavkem k. fosforečné. Injektáž vzorku byla 40  $\mu\text{l}$  a délka analýzy byla 7,5 min při průtokové rychlosti 1,5 ml/min. Separace probíhala při teplotě 25 °C na koloně s reverzní fází 150 mm x 4,6 mm. Vlnová délka detekce byla nastavena na 351 nm.

## 5. Výsledky a diskuze

V průběhu formulačních prací na tvorbě nanovláknenných membrán ES byla po optimalizaci parametrů zvláknování připravena sada membrán z různých polymerů s obsahem testovaných účinných látek. Optimalizační postupy zvláknění jednotlivých polymerních soustav byly prováděny pod vedením Ing. Denisy Stránské v laboratoři firmy Elmarco s.r.o., Liberec a nejsou předmětem této práce.

### 5.1 Morfologická charakterizace připravených membrán

V rámci charakterizace těchto membrán byla vždy pomocí SEM posouzena morfologická homogenita vzniklých nanovláken a byly proměřeny šířky nanovláken. Elektronmikroskopické snímky některých z připravených membrán jsou pro ilustraci ukázány na **Obrázku 11**.



**Obrázek 11** SEM snímky připravených nanovláknenných membrán. **A:** Chitosan – bez léčiva; **B:** Chitosan – obsahující SUS (5%); **C:** Chitosan – obsahující NAP (5%); **D:** PVA – bez léčiva; **E:** PVA – obsahující SUS (5%); **F:** PVA – obsahující NAP (5%).

Pravidelný tvar a struktura nanovláken ukazují na úspěšnou inkorporaci diosminu do struktury vláken, bez výskytu krystalů léčiva na povrchu vláken nebo vmezeřených mezi nanovláknými membránami. Z elektronoptického posouzení je právě tato okolnost velmi důležitá, neboť poskytuje první informaci o tom, je-li předpoklad o nanodisperzitě polymerního nosiče a především léčiva oprávněný. V případě, že by se na povrchu nanovláken nacházely částicové útvary charakteru krystalů či shluků léčiva, by bylo zřejmé, že léčivo není v polymerní hmotě nanovláken dispergováno dostatečně homogenním způsobem. Znamenalo by to, že léčivo vykristalizovalo či vyprecipitovalo na povrchu nanovláken, a tudíž se bude rozpouštět analogicky jako léčivo v krystalické formě, nebo jako precipitát. Tato skutečnost by znamenala přinejmenším snížení podílu nanodispergovaného léčiva a z toho vyplývající odlišnou disoluční charakteristiku systému.

Výsledky měření příčných rozměrů nanovláken jsou zaznamenány v **Tabulce 6**. Pro každou nanovláknennou soustavu z polymeru (např. chitosanu, CHI), směsi polymerů (např. hydroxypropylcelulózy, polyvinylalkoholu a polyethylenoxidu, HPC-PVA-PEO), nebo disperze polymeru s účinnou látkou (např. CHI s 10 % nabumetonu) jsou v této tabulce uvedeny průměrné hodnoty příčných rozměrů nanovláken odečtených na 30 různých místech vzorku ( $n = 30$ ).

**Tabulka 6** Průměry vláken připravených nanovláknenných membrán a jejich směrodatné odchylky ( $n = 30$ )

Složení vzorku	Průměr vláken [nm]	Složení vzorku	Průměr vláken [nm]
CHI	97,4 ± 25,2	PVA	155,1 ± 25,7
CHI+nabumeton 10%	87,4 ± 15,3	PVA+nabumeton 5 %	255 ± 76
CHI+SUS 5%+NAPS 5%	152,1 ± 24,4	PVA+NAP 5 %	176,6 ± 42,9
HPC-PVA-PEO	370 ± 34	PVA+SUS 5 %	280 ± 68
PAA+kofein 5 %	305,1 ± 52,3	PVA+SUS 10 %-PVA	128,2 ± 23
PAA+kofein 10 %	284,6 ± 47,7	PVA+SUS20 %	185,2 ± 44,8
PAA+kofein 20 %	289 ± 42,2	PVA+kofein 5 %	155 ± 57,5

Složení vzorku	Průměr vláken [nm]	Složení vzorku	Průměr vláken [nm]
PAA+kofein 30 %	376,9 ± 41,8	PVA+kofein 10 %	185 ± 63
PAA+NAP 5 %	117,5 ± 27,4	PCL+kofein 5 %	155 ± 75
PAA+SUS+NAPS 5 %	291 ± 55,6	PLA+kofein 5 %	450 ± 80
PAA+SUS-PAA+NAPS5%	248,6 ± 42,9		
PAA+SUS+NAPS5%PAA	276,2 ± 56,1		

Elektronmikroskopická měření také ukázala, že všechny připravené membrány, které byly posléze zařazeny do hodnocení, měly průměry nanovláken v rozmezí cca 80 nm až 550 nm, tedy ve výrazně submikrometrické oblasti (**Tabulka 6**). Na všechny zkoumané membrány lze tedy pohlížet jako na nanosoustavy se všemi s tím spojenými atributy.

V žádném ze sledovaných vzorků také nebyly nalezeny krystaly či shluky léčiva ani na povrchu vláken, ani vmezeřených v prostorech mezi nanovláknými. To je důkazem úspěšné a úplné inkorporace léčiv do polymerní struktury nanovláken.

K tomu lze pro zajímavost ještě dodat, že hodnocení případného ovlivňování průměru vláken množstvím v nich inkorporovaného léčiva neposkytlo statisticky jednoznačné výsledky, avšak je možné konstatovat, že ve většině případů s rostoucím podílem léčiva v polymeru rostl i průměr tvořených vláken.

## 5.2 Diferenční skenovací kalorimetrie nanomembrán

### 5.2.1 Nanovláčenné membrány s obsahem sumatriptanu a naproxenu

Fyzikální stav inkorporovaných léčiv i nosných polymerů byl studován využitím termální analýzy vzorků pomocí DSC. Ke srovnání byla provedena analýza krystalických léčiv, nanovláčenných membrán s léčivem i bez nich a práškových či granulovaných polymerů dodaných výrobcem.

Výsledky těchto měření jednoznačně potvrdily nepřítomnost krystalické fáze léčiva inkorporovaného v nanovláčenných membránách. Termogram žádného z měřených

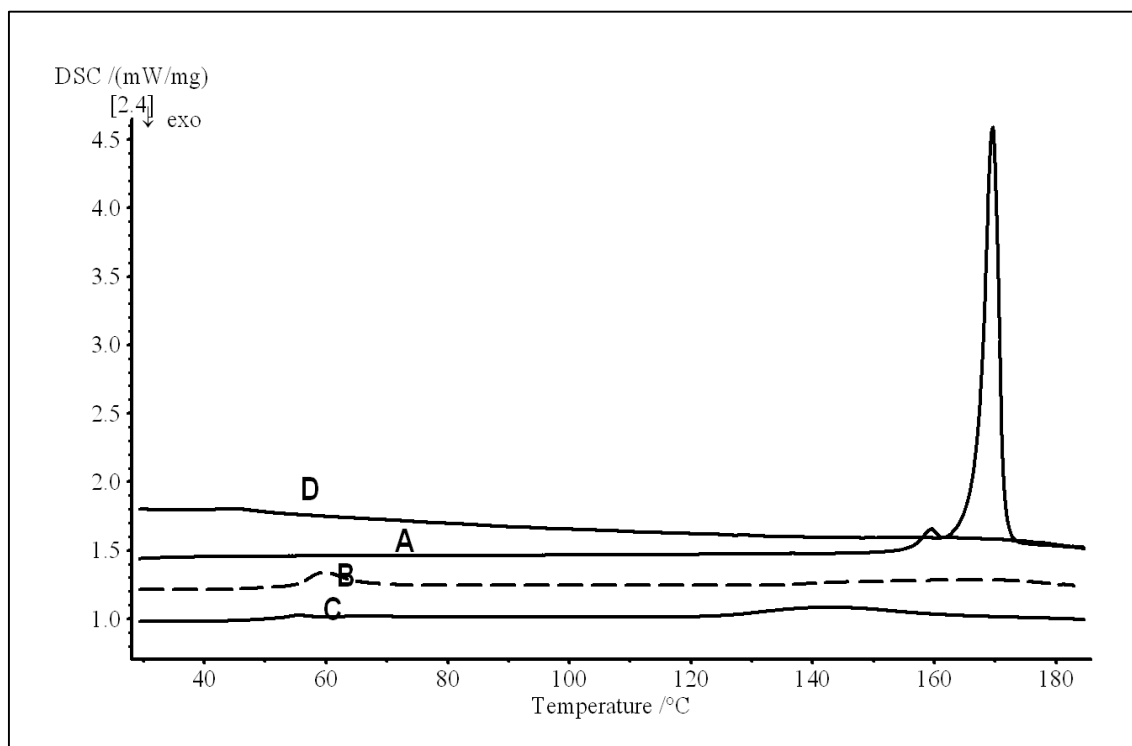


nanovlákných vzorků neobsahoval pík odpovídající termodynamickému (fázovému) přechodu krystalického léčiva.

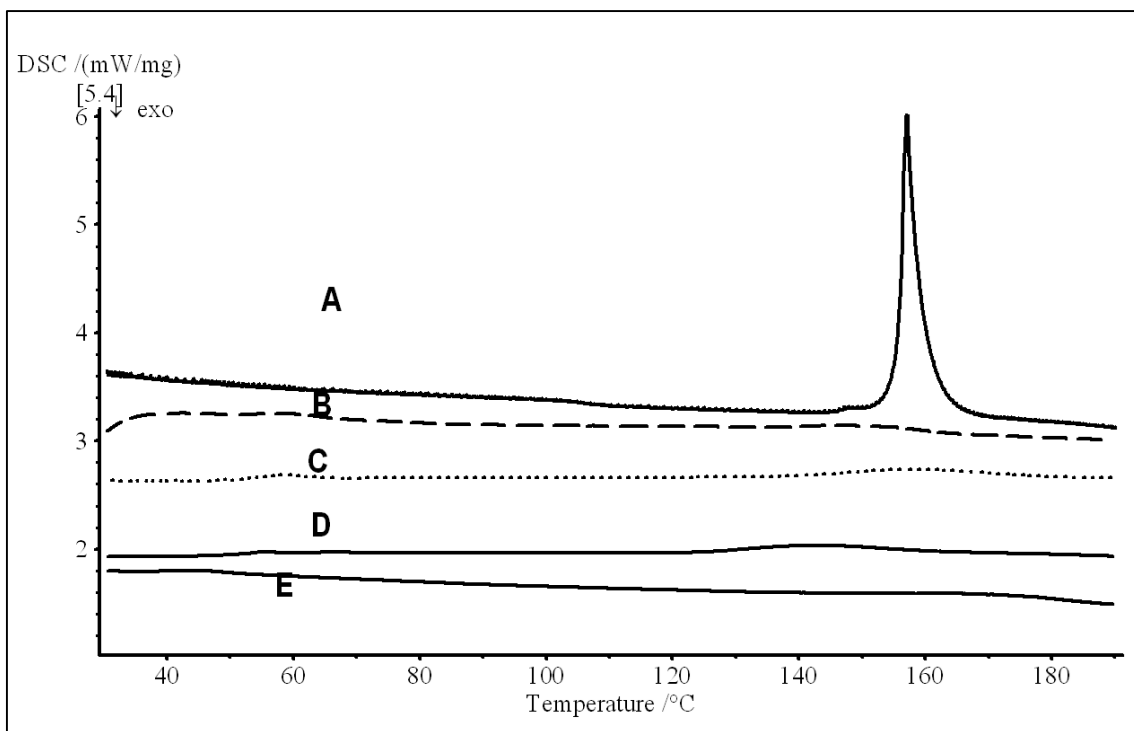
Na termogramu krystalického SUS můžeme pozorovat ostrý endotermický pík při teplotě 169 °C, zatímco na termogramu nanovlákné membrány s obsahem 20 % SUS (vztaženo na hmotnost membrány) není při této teplotě žádný pík přítomen (viz **Obrázek 12**).

Stejně tak krystalický NAP poskytl ostrý endotermický pík, a to při teplotě 157 °C, zatímco měřené nanovlákné membrány, ať již s obsahem 5 % nebo 30 % léčiva na hmotnost membrány, nezobrazily při této teplotě žádný pík (**Obrázek 13, Obrázek 14**).

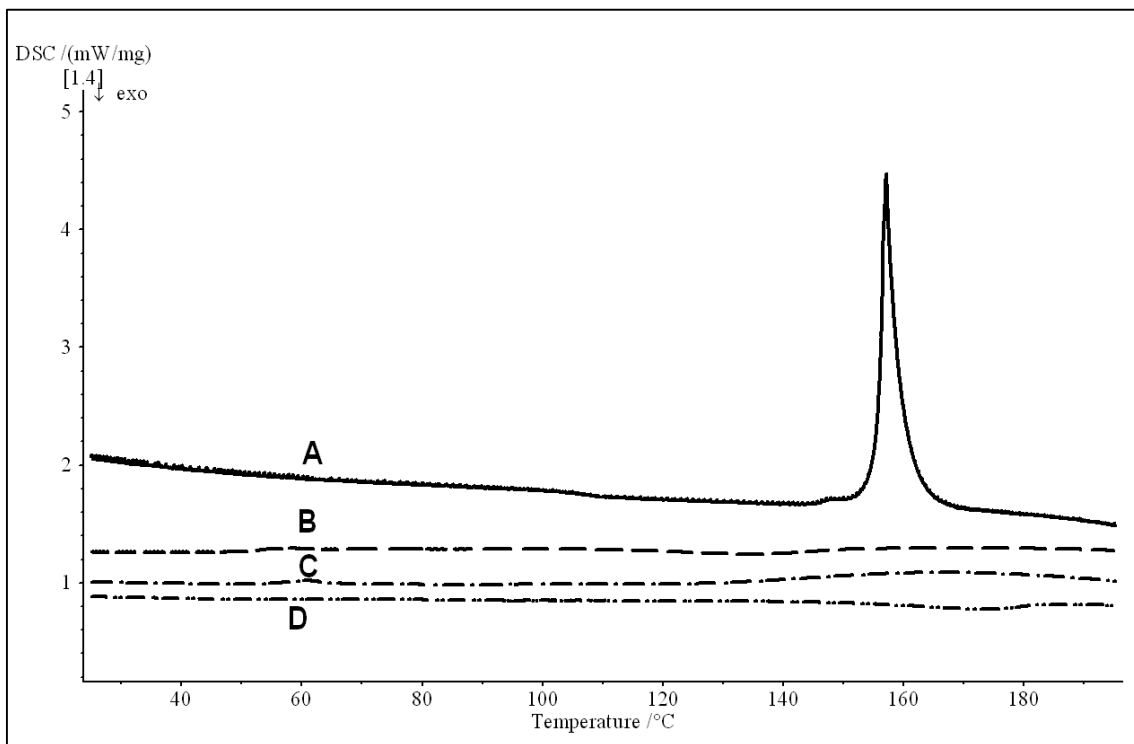
Z toho lze uzavřít, že zde nedochází k tání léčiva, což dokazuje, že krystalická fáze léčiva není přítomna.



**Obrázek 12** Termografické záznamy: **A:** SUS (krystalický); **B:** PVA+SUS 20% (nanovlákná membrána); **C:** PVA (nanovlákná membrána bez léčiva); **D:** PVA (prášek).



**Obrázek 13** Termografické záznamy: **A:** Naproxen (krystalický); **B:** PVA+NAP 30 % (nanovláknenná membrána); **C:** PVA+NAP 5 % (nanovláknenná membrána); **D:** PVA (nanovláknenná membrána bez léčiva); **E:** PVA (prášek).

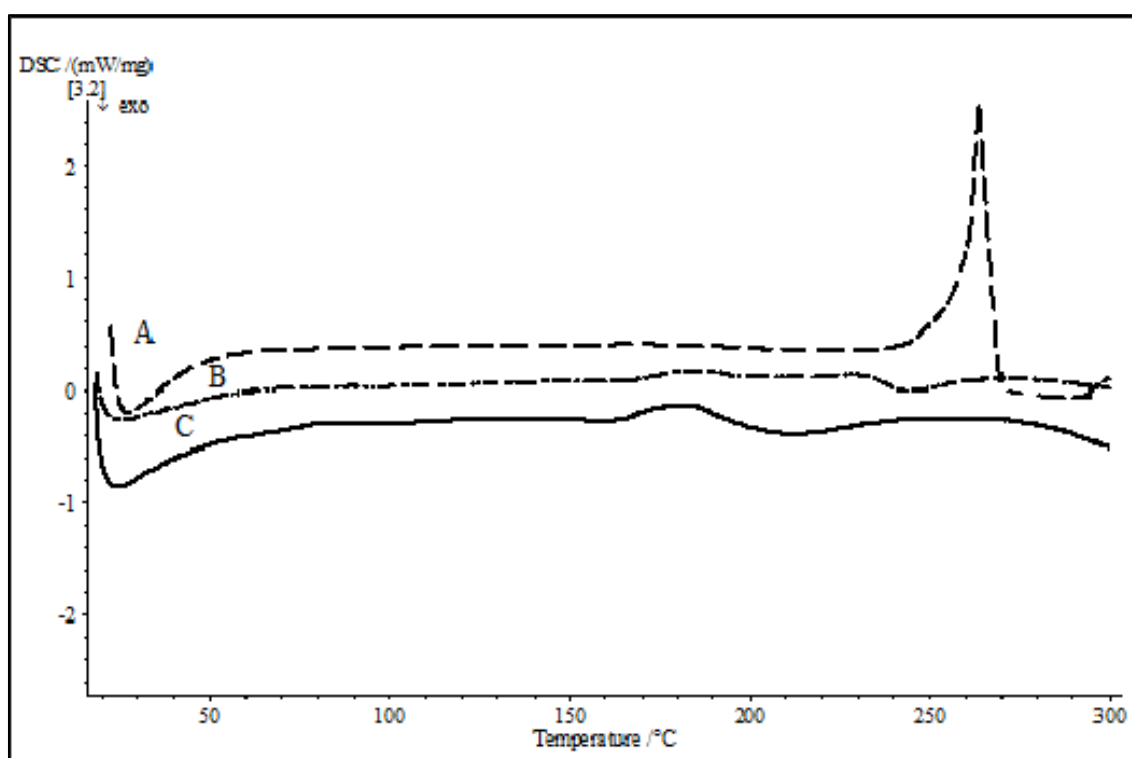


**Obrázek 14** Termografické záznamy: **A:** Naproxen (krystalický); **B:** Chitosan + naproxen 5% (nanovláknenná membrána); **C:** Chitosan (nanovláknenná membrána bez léčiva); **D:** Chitosan (prášek).

### 5.2.2 Nanovláknenné membrány s obsahem diosminu

Termální analýza vzorků membrán pomocí DSC byla provedena za účelem zjištění fyzikálního stavu inkorporovaného léčiva. K charakterizaci byla pro účely srovnání provedena i analýza krystalického léčiva, aby následně mohla být posouzena případná míra krystalické fáze léčiva v nanovlákněch.

Termogram krystalického diosminu vykazuje ostrý endotermický pík při 268 °C, zatímco na termografických záznamech nanovláknenných membrán není při této teplotě žádný pík přítomen, a to jak u vzorků membrán s 15%, tak i s 30% obsahem diosminu (vztaženo na hmotnost membrány). Tato analýza opět potvrzuje, že léčivo je v nanovlákněch inkorporováno v nekystalické podobě, tudíž se zde nachází v amorfní formě anebo jako molekulární disperze. Z teoretického i praktického hlediska je tento poznatek zásadně důležitý z hlediska rozpustnosti diosminu.



**Obrázek 15** Termografický záznam: **A:** diosmin (krystalický); **B:** nanovláknenná membrána obsahující 15 % diosminu; **C:** nanovláknenná membrána obsahující 30 % diosminu.

Všechny získané a takto charakterizované výsledky z DSC měření jasně ukazují, že léčivo byla v nanovlákněch přítomna v nekystalické formě. Jsou zjevně dispergovány a fixovány v amorfním stavu anebo rozptýleny jako molekulární disperze v polymerní matrix.

Z praktického hlediska bylo pro další pokusy důležité to, že se podařilo proces ES optimalizovat do té míry, že poskytoval nanovláknenné soustavy s homogenně distribuovanou aktivní látkou na úrovni nanorozměrné škály.

### *5.3 Uvolňování kofeinu z nanovláknenných membrán*

Kofein byl zvolen jako modelové léčivo pro inkorporaci do nanovláken vzhledem k jeho nízké ceně, snadnému stanovení, bezpečnosti a dobrým parametrům rozpustnosti.

Za účelem prozkoumání liberace látky a ověření si již publikovaných výsledků liberací podobných substancí byly vytvořeny nanovláknenné membrány s obsahem kofeinu z typově různých polymerů. Z hydrofilních polymerů jimi konkrétně byly kationický – CHI, anionický – PAA, neionogenní – PVA. Dále byly vybrány dva hydrofobní polymery esterové povahy PLA a PCL. Pro studium vlivu množství léčiva na jeho liberaci byly také připraveny membrány z PAA se čtyřmi různými procentuálními koncentracemi kofeinu obsaženého v nanovláknenech.

Ve vodě dobře rozpustné polymery byly síťovány, aby nedocházelo k rozpuštění membrán v disolučním médiu, ale pouze k uvolnění inkorporovaného léčiva. Vliv síťování na uvolňování léčiva z nanovláken bude popsán dále.

Výsledky měření jsou shrnuty na **Obrázku 16**. Ukázaly, že u všech nanovláknenných membrán připravených z hydrofilních polymerů došlo k velmi rychlému uvolnění kofeinu. Okolo 90 % dostupného léčiva bylo za daných experimentálních podmínek přítomno v akceptorové fázi do 5 minut od začátku experimentu. Do 15 minut bylo potom uvolněno veškeré dostupné léčivo a následně už koncentrace kofeinu stagnovala (koncentrace měřena po dobu 24 hod). Rozdíly mezi jednotlivými hydrofilními polymery byly pouze v míře léčiva dostupného pro uvolnění.

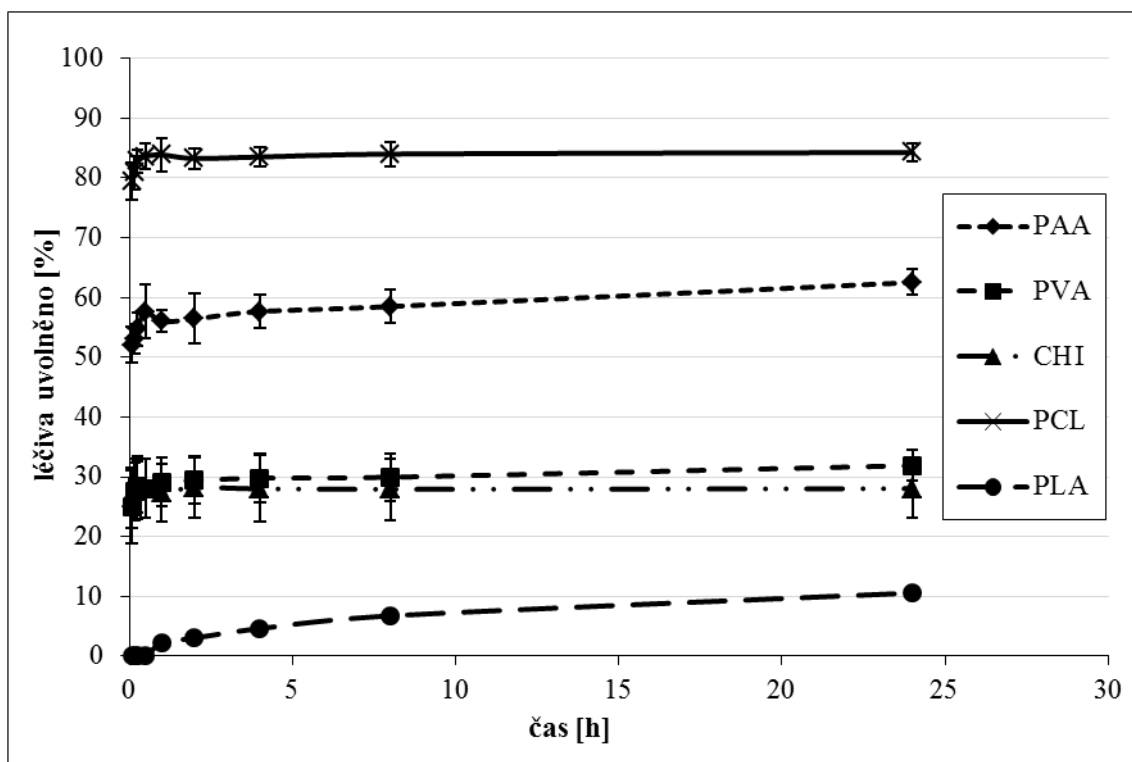
Odlišná situace nastala v případě membrán, vyrobených z hydrofobních polymerů. V případě membrán z PLA se kofein uvolňoval postupně bez iniciální „burst“ liberace. Pozvolna byl uvolňován po dobu minimálně 14 dní, po kterou probíhalo měření a uvolnilo se okolo 35 % léčiva. Liberace léčiva probíhala pravděpodobně i nadále (po dobu okolo jednoho měsíce), jak bylo pozorováno v jiné studii, zabývající se tímto polymerem [216]. Naproti tomu membrány z PCL uvolnily kofein velmi rychle a během 10 minut byla

většina (cca 95 %) dostupného kofeinu rozpuštěna v akceptorovém médiu a během následujících 24 hodin bylo uvolněno již jen velmi malé množství.

Nerozpustné nanovláknenné membrány, ať již síťované nebo tvořené ve vodě nerozpustnými polymery, neposkytly ani v jednom z případů kompletní množství léčiva, uloženého teoreticky do nanovláken během ES. To je způsobeno a zároveň potvrzuje mechanismus uvolňování látek z nanovláken tohoto typu, kterým je převážně desorpce a rozpouštění z povrchu nanovláken [164]. Pouze léčivo nacházející se v povrchových vrstvách polymerních nanovláken, případně v jejich pórech, se může dostat do kontaktu s disolučním médiem a být z nanovláken uvolněno.

Nanovláknena z degradabilních hydrofobních polymerů (PLA), uvolňují léčivo postupně; dochází zde k velmi pozvolnému vyplňování pórů nanovláken vodným akceptorem a k postupné degradaci polymerní matrix. Rychlost degradace polymerní matrix nanovláken hraje při uvolňování léčiva významnou roli, jak bylo popsáno dříve, když přidavkem enzymů, urychlujících degradaci polymerní matrix, bylo uvolňování léčiva významně urychleno [166].

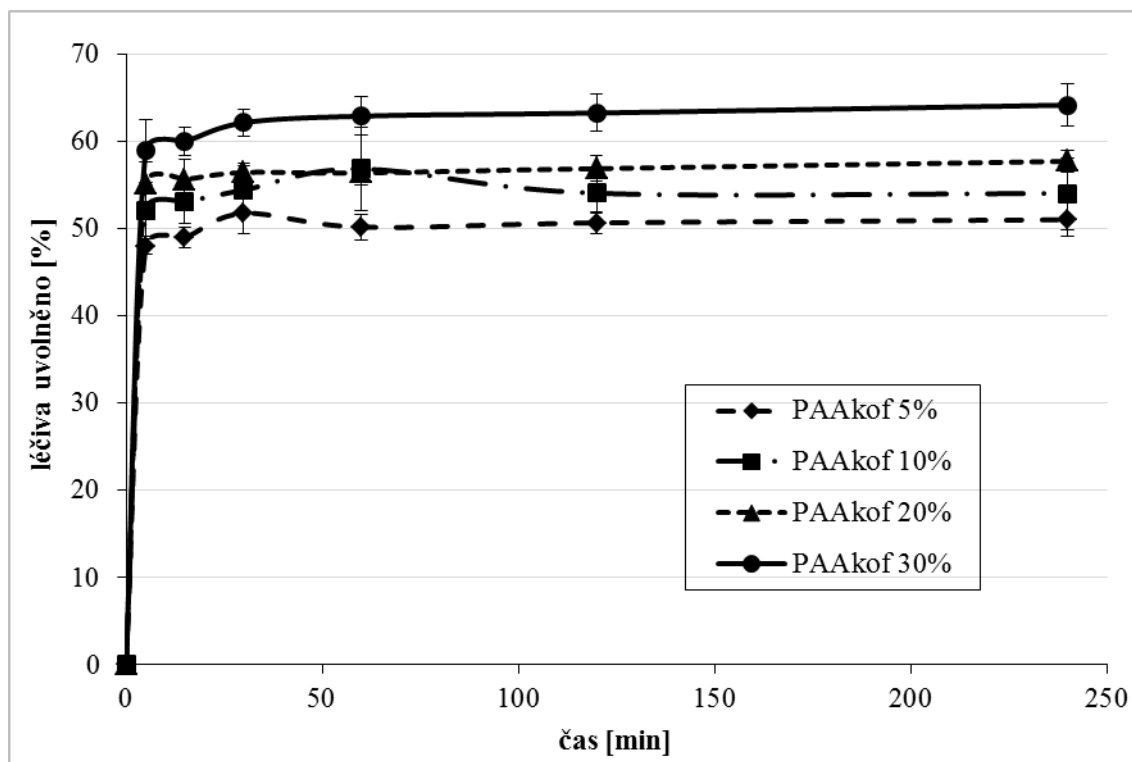
Rychlé uvolnění kofeinu z PCL nanovláknenných nosičů může také být důsledkem schopnosti PCL kapilárně nasát do nanopórů vodu a tím urychlit kontakt s léčivem a jeho následné uvolnění [164]. Konečně, důvodem může částečně být také špatná kompatibilita (nekompletní rozpouštění) kofeinu s roztokem PCL, použitým pro ES, a tím nehomogenní inkorporaci kofeinu do nanovláken s následným přednostním uložením léčiva na povrchu nanovláken [166].



**Obrázek 16** Uvolňování kofeinu z nanovláčkových membrán připravených z 5 polymerů různých vlastností obsahujících 5% kofeinu na hmotnost membrány.

Vliv koncentrace (procentního podílu) kofeinu v nanovláčcích na uvolňování této substance byl zkoumán pro čtyři různé koncentrace kofeinu, a to 5, 10, 20 a 30 % v nanovláčkových nosičích z PAA. Výsledky, jak jsou prezentovány na **Obrázku 17**, ukázaly, že koncentrace kofeinu v nanovláčcích neovlivnila kinetiku jeho liberace. Rozdílná byla pouze míra liberace (množství uvolněného léčiva). Se zvyšující se koncentrací léčiva vzrůstal i podíl celkového uvolněného léčiva: vlákna s obsahem 5 % kofeinu uvolnila okolo 50 % léčiva, zatímco vlákna s 30 % kofeinu uvolnila okolo 62 % inkorporovaného léčiva. Tento jev je pravděpodobně dalším potvrzením desorpčního mechanismu liberace, neboť při větším obsahu léčiva v nanovláčcích a zachování stejného množství polymerní matrice musí být podíl léčiva v povrchových vrstvách nanovláček větší, a tak i více dostupný pro liberaci.

Maximální množství kofeinu, které bylo možno nanést do nanovláček bez vzniků tvarových a povrchových defektů na nanovláčcích se pohybovalo okolo 40 % hmotnosti membrány.



**Obrázek 17** Liberace kofeinu z nanovláknenných membrán z PAA, obsahujících 5, 10, 20 a 30 % kofeinu na hmotnost membrány.

Z uvedených výsledků lze vyvodit, že největší vliv na rychlost uvolnění léčiva z nanovláknenných membrán mají při popsáných průměrech a homogenitě nanovláken vlastnosti polymeru použitého k formulaci membrány.

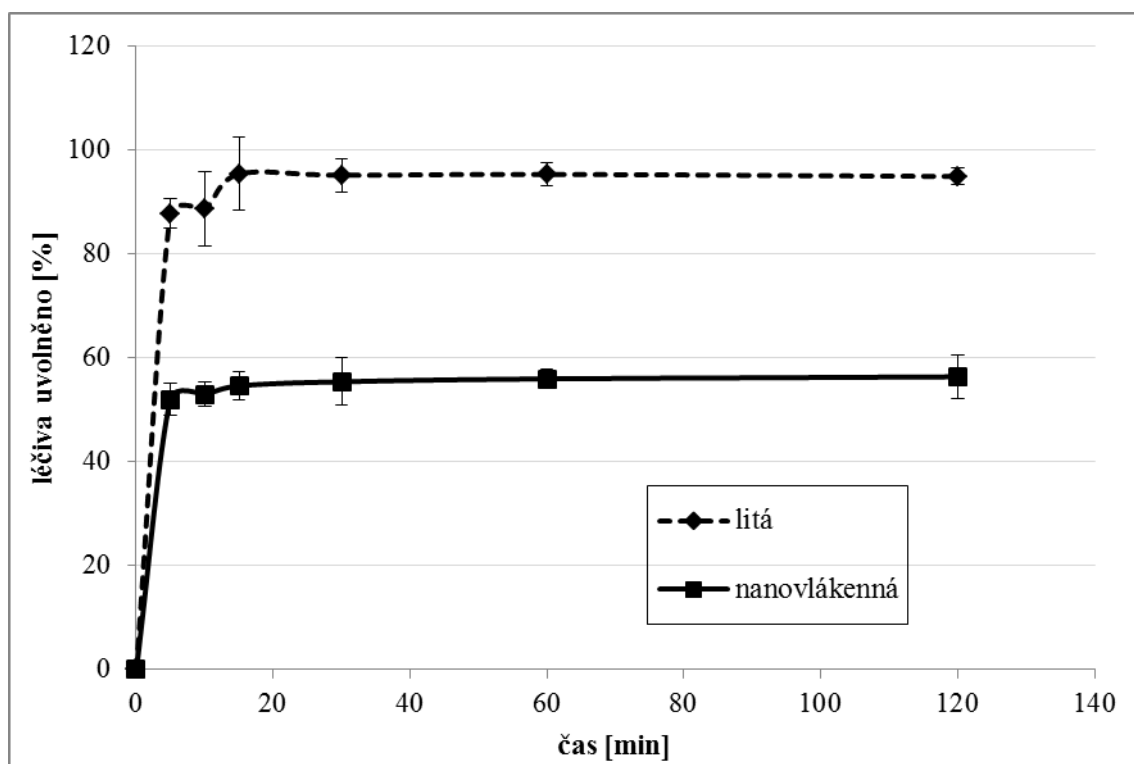
Tvorbou vícevrstevné membrány a individuální volbou vhodných polymerů v jednotlivých vrstvách můžeme docílit optimálního uvolňování z kompozitních systémů pro většinu léčiv. Tento postup nedávno také vyzkoušeli Huang a kol., kdy formulací vícevrstevné membrány z různých polymerů docílili uvolňování ketoprofenu kinetikou nultého řádu [168].

### 5.3.1 Srovnání uvolňování kofeinu z litých a nanovláknenných membrán

Za účelem porovnání liberačních profilů z nanovláknenných a nezvlákněných polymerních nosičů byly připraveny filmy polymeru s obsahem kofeinu ze stejných polymerů, jaké byly použity pro tvorbu nanovláknenných membrán. Uvolňování kofeinu probíhalo za stejných podmínek, aby bylo možno provnat, jaký bude mít metoda inkorporace léčiva ES do nanovláken vliv na liberaci.

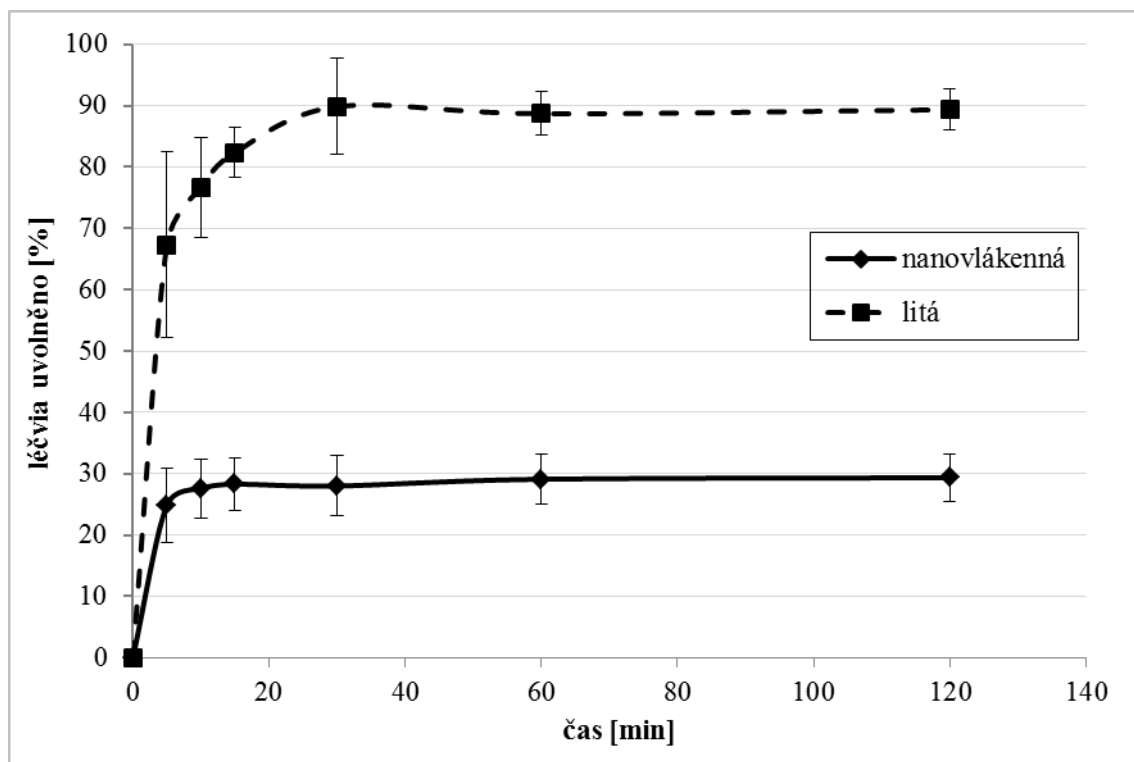
Z hydrofilních polymerů byly pro tvorbu litých membrán zvoleny PAA a PVA, z hydrofobních PLA. U polymerů uvolňujících léčivo okamžitě byl patrný rozdíl v rychlosti uvolnění kofeinu, jak ukazují **Obrázek 18**, **Obrázek 19**. Obrovský povrch nanovláken umožnil rychlejší přístup akceptorové fáze, a tudíž i rychlejší uvolnění léčiva (5 až 10 min. od zahájení experimentu), zatímco z litých membrán bylo uvolňování ukončeno až rozpuštěním membrány za 15 až 30 min.

Nekompletní uvolnění léčiva v případě nanovláčenných membrán bylo způsobeno síťováním, a tudíž nerozpustností membrán, zatímco lité filmy byly plně rozpustné a bylo získáno veškeré inkorporované léčivo.



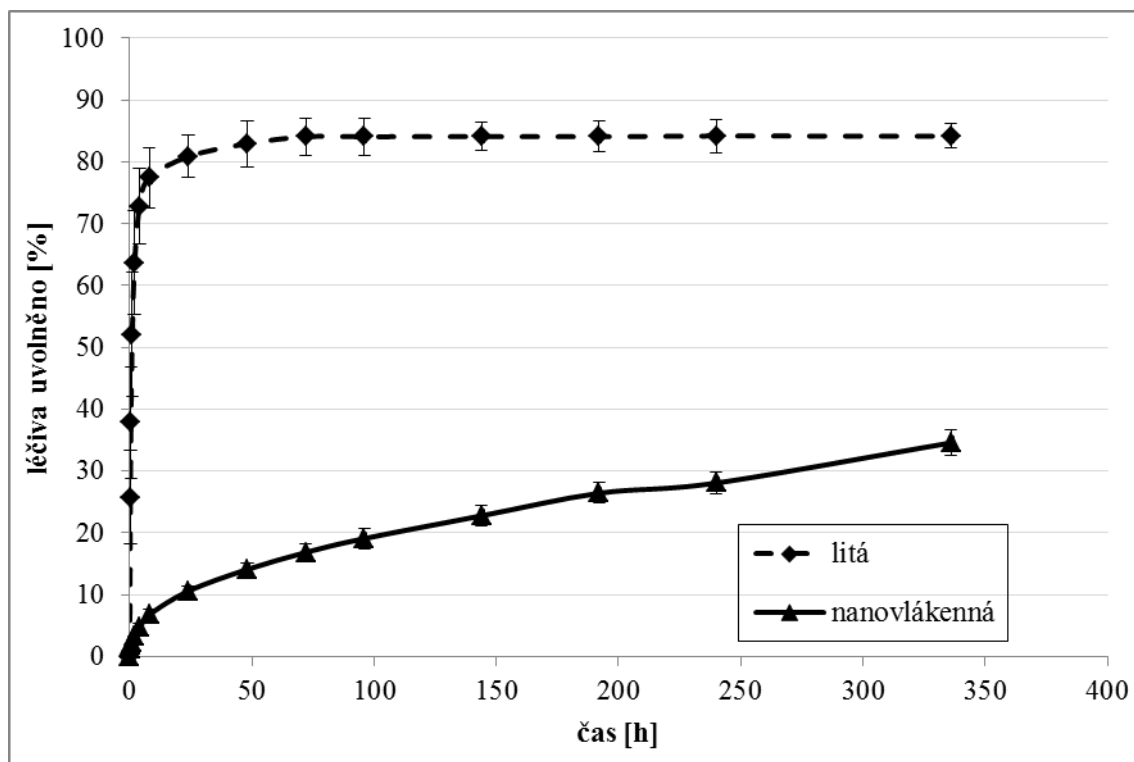
**Obrázek 18** Srovnání liberace kofeinu z nanovláčenné a lité membrány vyrobené z PAA a obsahující 10 % kofeinu na hmotnost membrány.





**Obrázek 19** Srovnání liberace kofeinu z nanovláknenné a lité membrány, vyrobené z PVA a obsahující 10 % kofeinu na hmotnost membrány.

V případě polymeru PLA, ve vodném liberačním mediu nerozpustného, byl rozdíl v uvolňování kofeinu ještě markantnější. Zatímco litá membrána uvolnila léčivo postupně během prvního dne (až dvou) experimentu, nanovláknenný nosič uvolňoval kofein kontinuálně a dlouhodobě a ani po 14 dnech experimentu nebylo uvolňování kofeinu dokončeno (uvolněno pouze okolo 35 % kofeinu).



**Obrázek 20** Srovnání liberace kofeinu z nanovláčkové a lité membrány, vyrobené z PLA a obsahující 5 % kofeinu na hmotnost membrány.

Tyto experimenty jednoznačně ukazují, že zpracování polymerů s léčivem do nanovláček prostřednictvím ES uděluje systému nové vlastnosti, které se potom zřetelně uplatňují při uvolňování léčiv. Toho může být s výhodou využito jak pro systémy s velmi rychlým uvolňováním léčiva, které umožňují velmi rychlý kontakt léčiva s disolučním médiem, ale také pro systémy s postupným uvolňováním, kde může být dosaženo postupné liberace léčiva v řádu týdnů až měsíců.

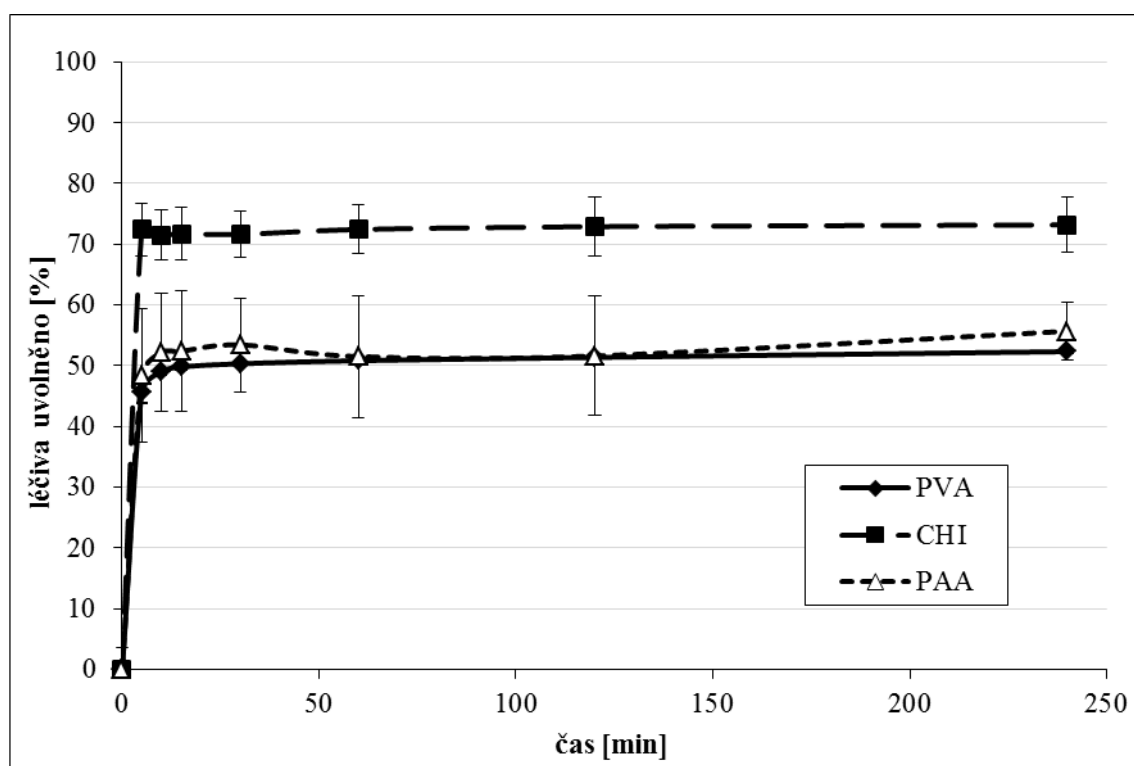
#### 5.4 Formulace nanomembrány pro sublingvální podání léčiv

Pro formulaci sublingvální nanomembrány pro podání léčiv byly z výsledků liberace kofeinu vybrány polymery s rychlým uvolňováním léčiva, a to PAA, CHI, PVA a PCL. Již při počátečním výběru polymeru byly důležitým kritériem jejich dobré mukoadhezivní vlastnosti (PAA, CHI, PVA).

Jako léčiva vhodná pro sublingvální podání byly vybrány SUS a NAPS, které jsou s výhodou používány k léčbě příznaků migrény, a je u nich vyžadován rychlý nástup účinku.

#### 5.4.1 Liberace účinných látek z nanovláčenných membrán

Nanovláčenné membrány s obsahem SUS byly připraveny z PAA, CHI, PVA. Liberace z těchto membrán potvrdily výsledky obdržené s kofeinem, a sice že léčivo bylo uvolněno z nanovláčenného nosiče velmi rychle; okolo 90 % dostupného léčiva bylo rozpuštěno v akceptoru během prvních 5 minut experimentu. Rozdíly mezi jednotlivými polymery pak byly převážně v míře dostupného léčiva, přičemž CHI, jenž nebyl síťován, uvolnil největší podíl inkorporovaného léčiva.

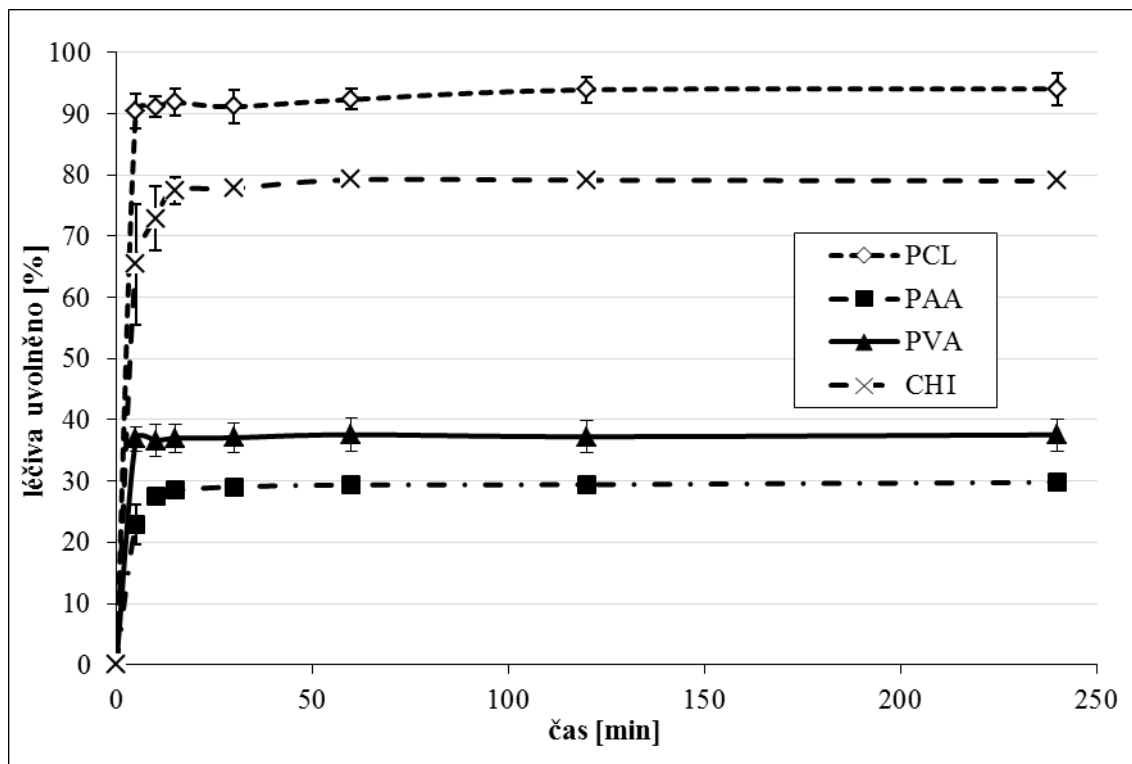


Obrázek 21 Liberace SUS z nanovláčenných membrán, připravených z PVA, PAA a CHI.

V případě naproxenu byla testována liberace z nanovláčien jak samotné kyselé formy léčiva, tak i ve vodě lépe rozpustné sodné soli. Překvapivě byla rychlost liberace obou forem stejná a výrazně nižší rozpustnost kyselé formy oproti její soli se zde vůbec neprojevila. Nanovláčenné membrány byly proto následně připravovány primárně s obsahem neionizované formy, u které byl předpoklad následně lepší absorpce přes sublingvální mukózu.

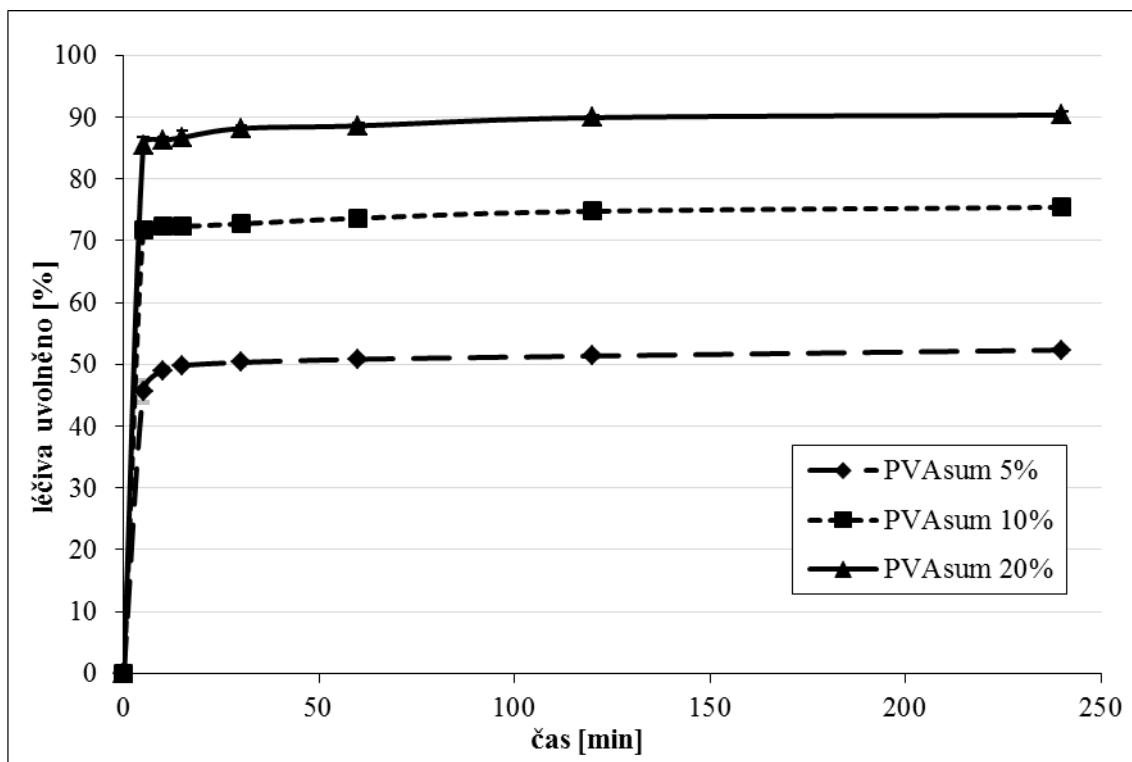
Membrány s obsahem naproxenu byly připraveny ze všech čtyř vybraných polymerů (PAA, PVA, CHI, PCL), vykazujících rychlé uvolňování léčiva. Membrány i v tomto případě poskytly velmi rychlé uvolnění inkorporované látky a celý dostupný obsah léčiva

byl uvolněn do 15 min. od počátku liberačního experimentu a koncentrace následně již pouze stagnovala (sledováno 24 hod).

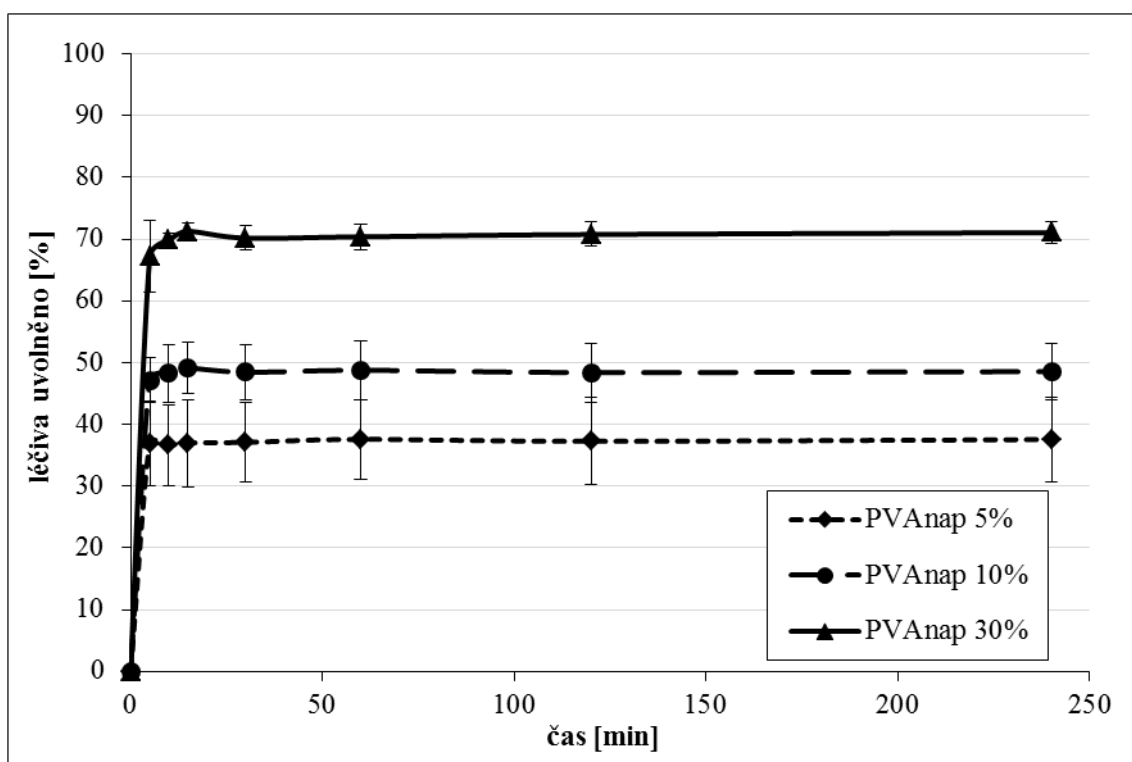


**Obrázek 22** Liberace naproxenu z nanovlákných membrán, připravených ze 4 různých polymerů (PCL, PAA, PVA, CHI) s obsahem 5 % NAP na hmotnost membrány.

Vliv množství inkorporovaného léčiva na jeho liberaci z nanovláken byl testován i pro nanovlákné systémy obsahující NAP a SUS. Výsledky těchto experimentů pak potvrdily, že kinetika liberace léčiva nebyla ovlivněna množstvím inkorporovaného léčiva. Stejně jako v případě kofeinu, i zde s rostoucím obsahem léčiva, inkorporovaného v nanovlákněch, stoupal podíl uvolněného léčiva (**Obrázek 23, Obrázek 24**).



**Obrázek 23** Srovnání uvolňování SUS z nanovlákněných membrán z PVA s různým obsahem léčiva.



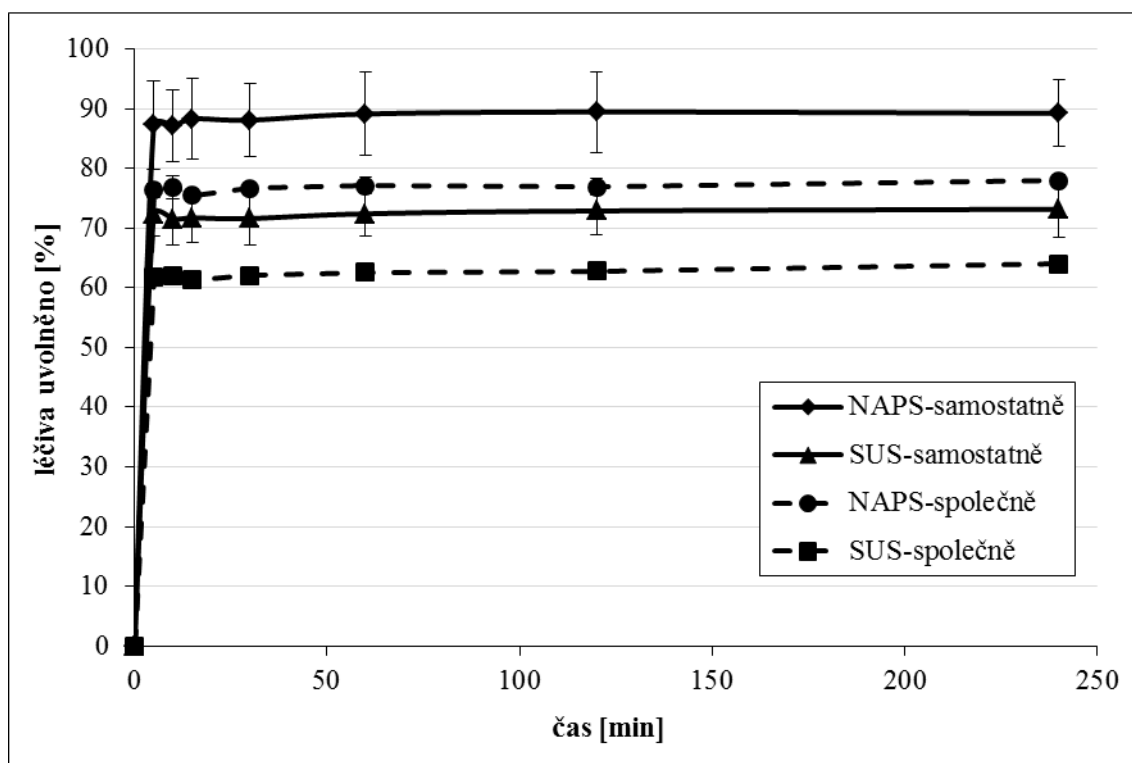
**Obrázek 24** Srovnání uvolňování NAP z nanovlákněných membrán z PVA s různým obsahem léčiva.

#### 5.4.2 Simultánní uvolňování léčiv

Bylo prokázáno, že kombinace SUS a NAPS má lepší účinnost na potlačení příznaků migrény než podání léčiv samostatně [308,317]. Je proto zřejmě vhodné, aby nanovláknenná nosičová sublingvální membrána obsahovala kombinaci těchto léčiv. Z tohoto důvodu bylo nezbytné prozkoumat vliv liberace jednoho léčiva na druhé.

Nanovláknenné membrány byly připraveny s kombinací SUS – NAPS a to buď simultánně ES z jednoho roztoku, kdy byla obě léčiva inkorporována v nanovlákněch současně, nebo přípravou vícevrstvenné membrány s obsahem každého z léčiv samostatně v jedné polymerní vrstvě nanovláknenné membrány.

Liberační experimenty prokázaly, že uvolnění jedné substance nemá žádný vliv na kinetiku uvolňování druhého léčiva, ať již byla obě léčiva v jedné polymerní matrix nebo samostatně ve vrstvách vícevrstvenné membrány. Obě léčiva byla uvolněna během 5 minut od začátku experimentu, stejně jako v případech, kdy probíhala jejich liberace samostatně. Minimální rozdíly byly i v množství léčiva, dostupného z nanovláknenného nosiče s mírně vyššími podíly, uvolněnými v případech, kdy léčiva byla oddělena ve vlastních nanovláknenných vrstvách (**Obrázek 25**).

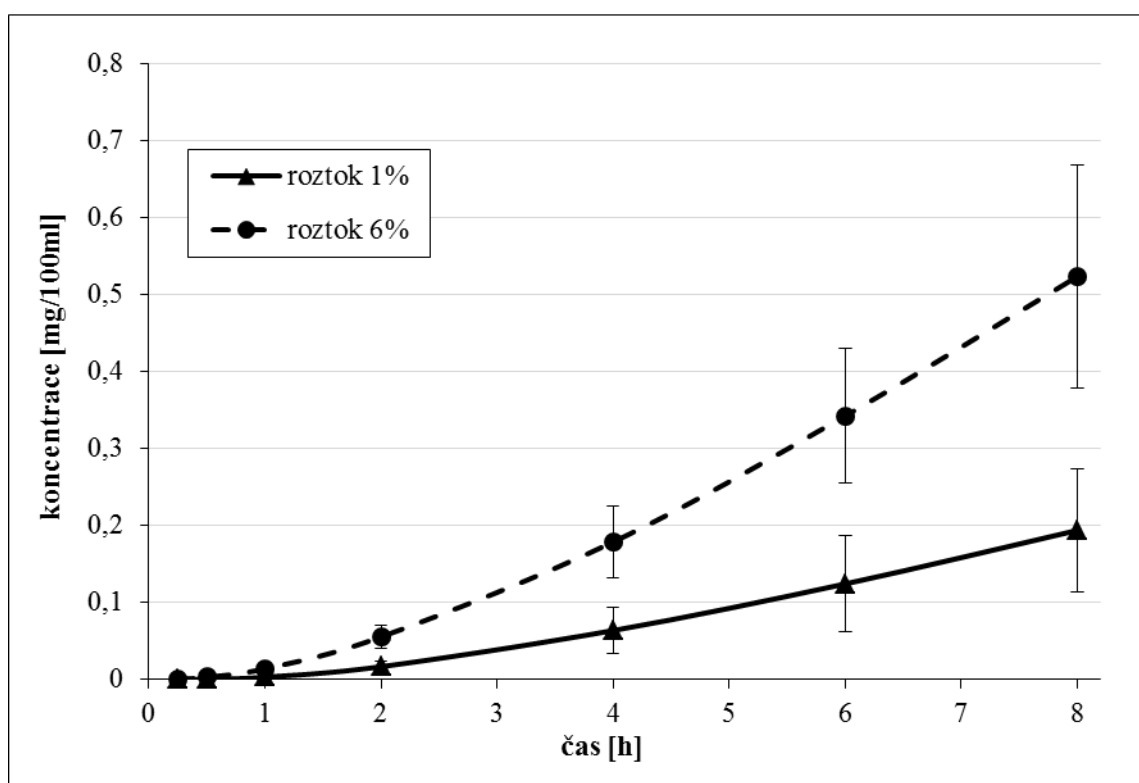


**Obrázek 25** Simultánní liberace SUS a NAPS z vícevrstvé a jednovrstvé nanovláknenné membrány z CHI, obsahující 5 % daných léčiv.

### 5.4.3 *In vitro* permeace přes sublingvální mukózu

#### 5.4.3.1 Permeace sumatriptanu

Protože absorpce sumatriptanu přes sublingvální membránu není v odborné literatuře dostatečně popsána, byla permeace SUS testována nejprve z roztoků, obsahujících různé koncentrace této látky. První *in vitro* experimenty ukázaly, že permeace SUS přes sublingvální mukózu je velmi nízká, během 8 hodin experimentu bylo dosaženo pouze velmi nízké koncentrace léčiva v akceptorové fázi. Zvýšení koncentrace donorového roztoku na 6% úroveň, tedy koncentraci blízkou nasycenému roztoku při dané teplotě, přineslo zhruba dvojnásobný nárůst množství léčiva v akceptoru (viz **Obrázek 26**). Množství sumatriptanu bylo při orientačním propočtu stále zcela nedostačující k případnému dosažení terapeutické dávky.

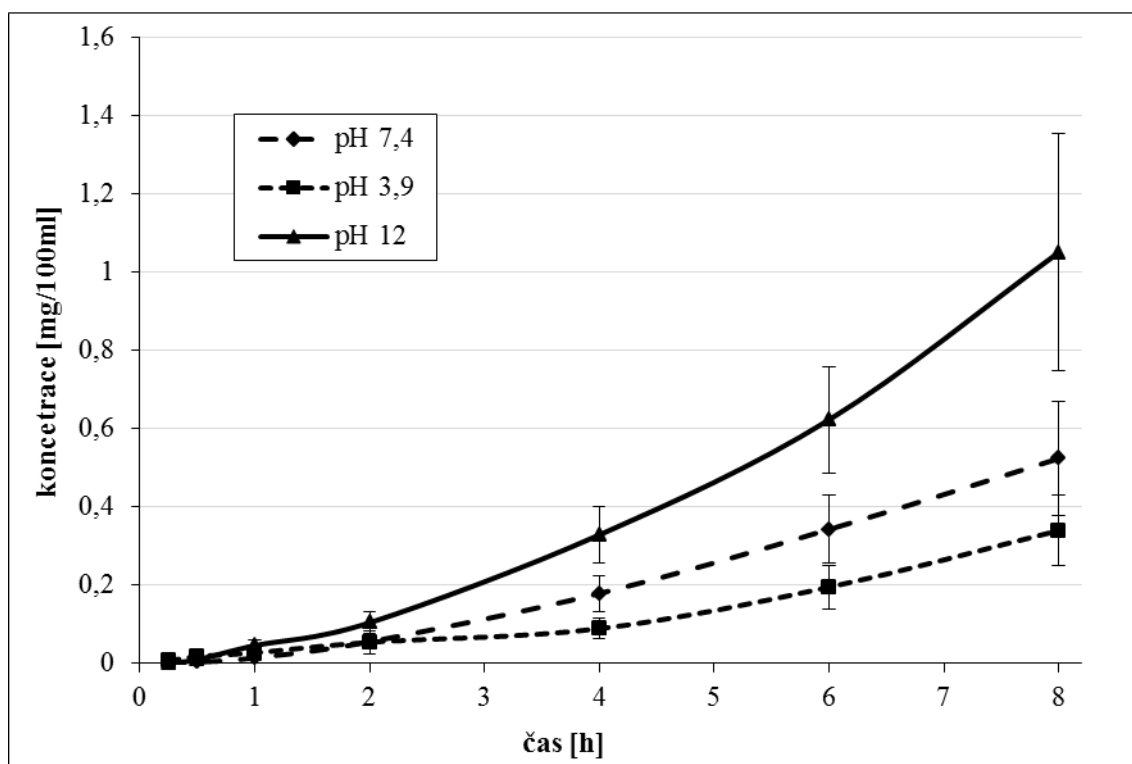


**Obrázek 26** Permeace sumatriptanu přes sublingvální membránu *in vitro* (donor roztoky 1% a 6%).

Proto byl ke zlepšení permeace sumatriptanu mukózou otestován vliv pH donorového roztoku, a tedy míry ionizace sumatriptanu. Význam pH a míry ionizace léčiva na permeaci sublingvální mukózou byl popsán například pro oxykodon a nikotin, kde bylo

dosaženo lepších výsledků při pH donoru, ve kterém bylo léčivo méně ionizováno [288,353].

V *in vitro* experimentu byly použity donorové roztoky obsahující vždy stejné množství SUS o třech různých hodnotách pH (3,9; 7,4 a 12,0), při kterých by měl být sumatriptan v různé míře disociován. Nejlepší výsledky a zhruba dvojnásobné zvýšení permeovaného množství oproti dříve získaným hodnotám bylo dosaženo s donorovým roztokem o pH 12, při kterém se sumatriptan nachází převážně v nedisociované formě. Naopak plně disociovaný sumatriptan, rozpuštěný v donorovém prostředí o pH 3,9, pronikal sublingvální mukózou výrazně méně a naměřené koncentrace v akceptorové fázi byly ze sledovaných roztoků nejnižší (**Obrázek 27**).

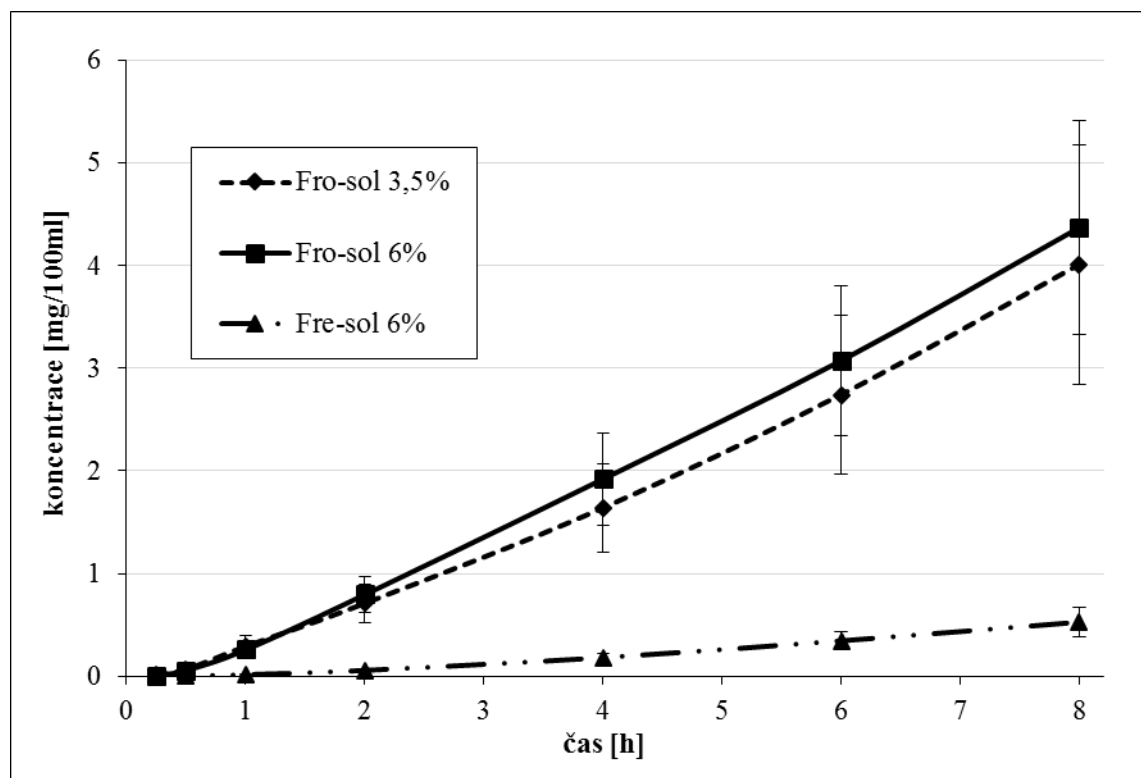


**Obrázek 27** Vliv pH donorového roztoku na permeaci sumatriptanu sublingvální mukózou *in vitro*.

Z organizačně experimentálních důvodů byl dále zjišťován vliv zamrazení sublingvální membrány na její permeabilitu pro nízkomolekulární substance typu sumatriptanu. Permeabilita membrán, které byly uchovány při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , byla několikanásobně vyšší než u membrán čerstvých. Prostupnost membrány pasivní difúzí byla takto navýšena, bariérová funkce membrány zůstala i po zamrazení částečně zachována, mukóza stále



nebyla pro sumatriptan volně propustná, což dokládá i srovnání permeace z 3,5% a 6% roztoku této látky, které poskytlo stejné koncentrace léčiva v donorové fázi (**Obrázek 28**).

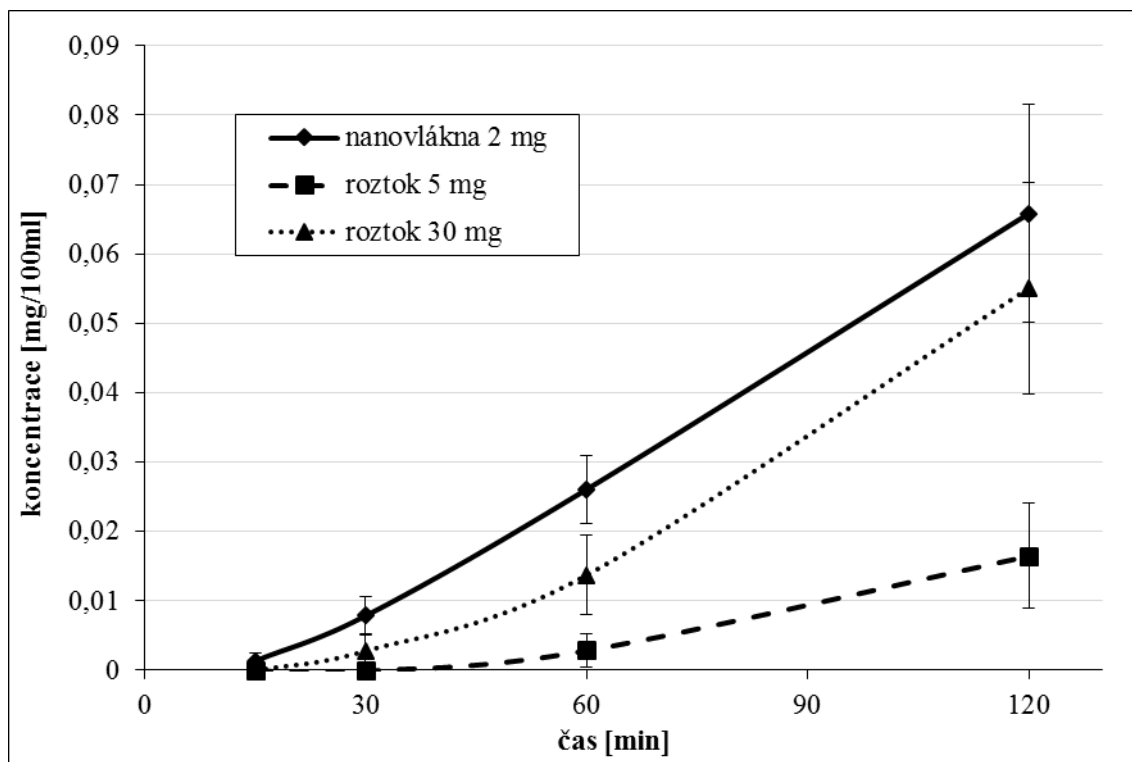


**Obrázek 28** Rozdíl v propustnosti sumatriptanu přes zamraženou (Fro-sol) a čerstvou (Fre-sol) sublingvální membránu *in vitro*.

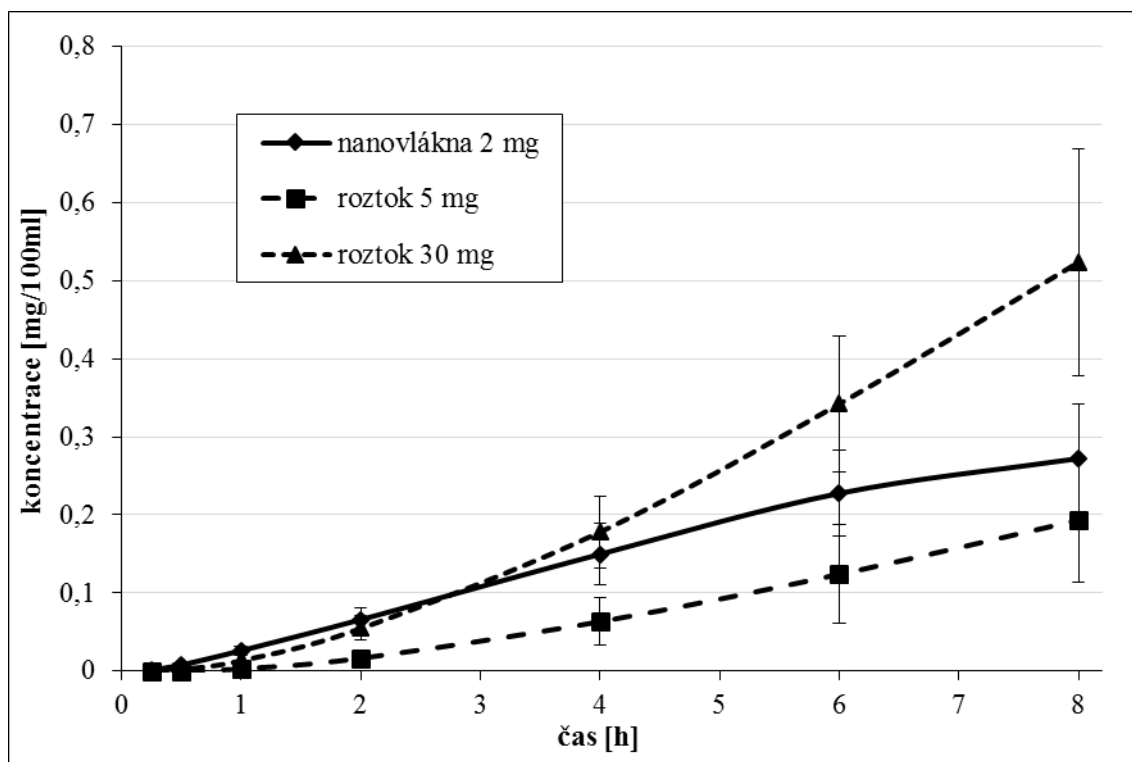
Zamražení membrán značně ovlivnilo permeabilitu této mukózy a byly proto rozhodnuto používat v *in vitro* permeačních experimentech pouze čerstvě zpracované, nezamražené membrány.

#### 5.4.3.1.1 Permeace sumatriptanu s využitím nanovláčenného nosiče

Nanovláčenné membrány nesoucí sumatriptan, byly použity jako donor léčiva a na začátku experimentu byly přiloženy v několika vrstvách na sublingvální mukózu fixovanou v permeační buňce. Liberace a následná permeace, která zde byla vzhledem k velmi rychlému uvolňování substance z nanovláček, krokem určujícím rychlost procesu absorpce do akceptorového média, byla sledována po dobu 8 hodin.

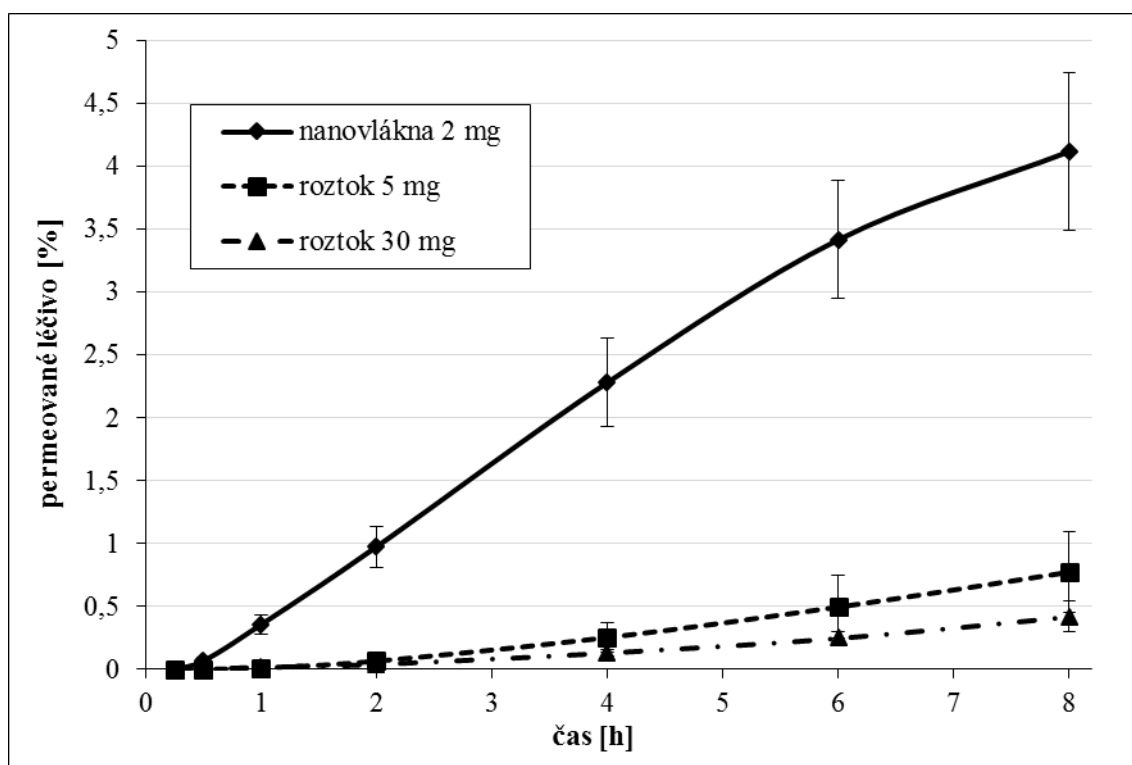


**Obrázek 29** Srovnání permeace sumatriptanu přes sublingvální membránu *in vitro*. Donory byly nanovláknenná membrána (PVA+ SUS 20%, 2 mg), roztok SUS 6% (30 mg), roztok SUS 1% (5 mg).



**Obrázek 30** Porovnání permeace sumatriptanu přes sublingvální membránu *in vitro*. Donory jsou nanovláknenná membrána (PVA+SUS 20%, 2 mg), roztok SUS 6% (30 mg), roztok SUS 1% (5 mg).

Výsledky ukázaly, že sumatriptan z nanovláknenného nosiče procházel membránou lépe než z roztoků aplikovaných přímo na mukózu. Nanovláknenná membrána zřejmě umožnila velmi těsný kontakt léčiva s absorpční plochou, navíc velmi rychle se uvolňující léčivo bylo v úvodní části experimentů stále přítomno v neklesajících vysokých koncentracích (pravděpodobně vyšších než u nasyceného roztoku), což vedlo k dosažení vyšší nabídky sumatriptanu v donorovém oddílu než s využitím roztoků. Situace byla zajímavá také tím, že v úvodních dvou hodinách experimentu byla permeovaná kvanta léčiva z nanovláknenného nosiče vyšší než z vysoce koncentrovaného 6% roztoku (**Obrázek 29**). Po dvou hodinách však bylo velké množství léčiva z nanovláken již vyčerpáno a následně již permeace byla vyšší ze stále téměř nasyceného donorového roztoku (**Obrázek 30**).



**Obrázek 31** Srovnání permeovaného množství sumatriptanu přes sublingvální mukózu *in vitro* s využitím různých donorů léčiva: nanovláknenná membrána (PVA+SUS 20%), roztok 1% (5 mg) a 6% (30 mg).

Výsledky experimentů ukazují na výrazné zlepšení v účinnosti permeace léčiva s využitím nanovláknenného donoru v porovnání s roztokem. Transmukozální permeace

sumatriptanu byla využitím nanovlákných membrán jako nosičů léčiva v tomto ohledu navýšena přibližně pětinašobně (**Obrázek 31**).

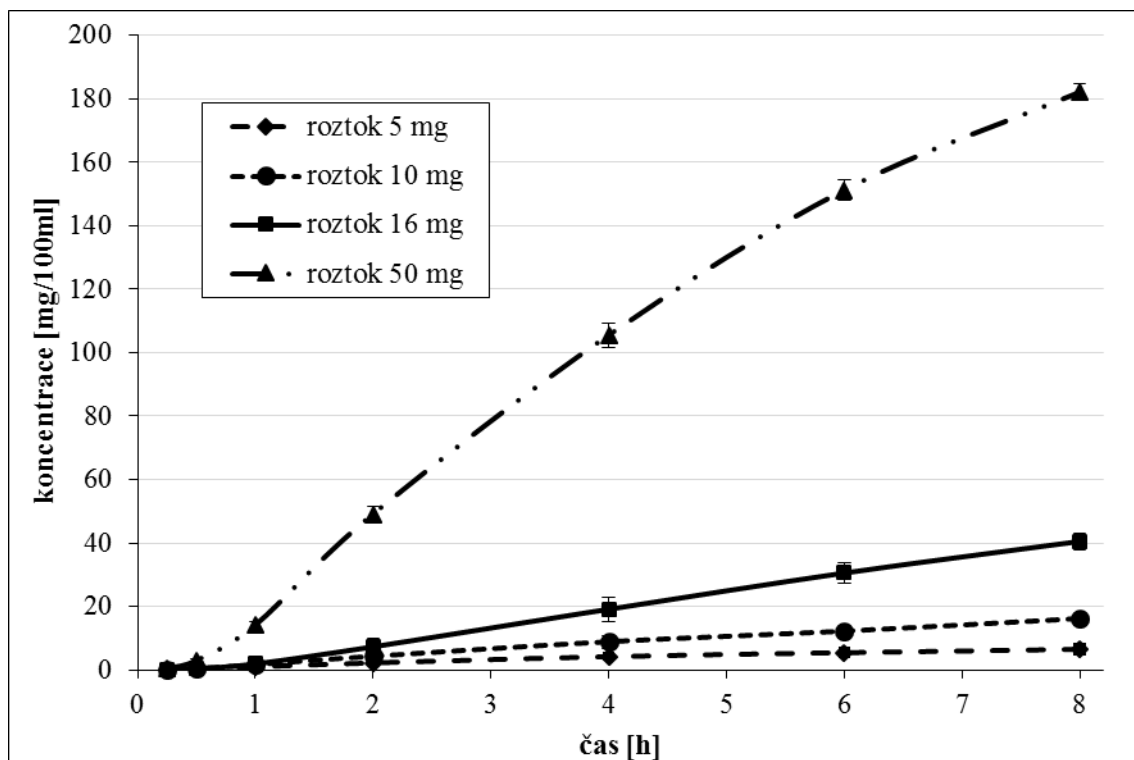
Z terapeutického hlediska je potřebné, aby celkové množství sumatriptanu, absorbovaného do krevního řečiště dosáhlo alespoň 4 mg (lépe 6 mg) SUS, což představuje ekvivalent subkutánně podávané dávky, která má 96% úroveň BA [311]. Při použití nanovlákných nosičů se relativní množství permeovaného léčiva pohybovalo okolo 4 %, což by vyžadovalo membránu, obsahující alespoň 100 mg SUS. Tato membrána může být aplikována na plochu až 20 cm<sup>2</sup>. To je technologicky relativně dobře dosažitelné, takže zvýšení míry absorpce může být z tohoto hlediska esenciální.

Získané výsledky prokázaly, že permeace sumatriptanu z donoru v neionizované formě je zhruba dvakrát vyšší a je proto žádoucí zabudovat sumatriptan do nanovláken ve formě báze, čímž bude permeace sumatriptanu dále navýšena. I když je rozpustnost báze ve vodném prostředí výrazně nižší, výsledky s naproxenem ukazují, že rychlost disoluce báze z nanovláken bude podobná jako u soli sukcinátu. Rychlost a míra permeace může být navíc úspěšně navýšena přidáním akcelerantů permeace mukózou. Ty mohou být v průběhu ES naneseny do nanovláken a uvolňovat se simultánně s léčivou a usnadňovat následně jejich permeaci, čímž je dále možno docílit terapeutické koncentrace v kratším čase.

#### 5.4.3.2 Permeace naproxenu

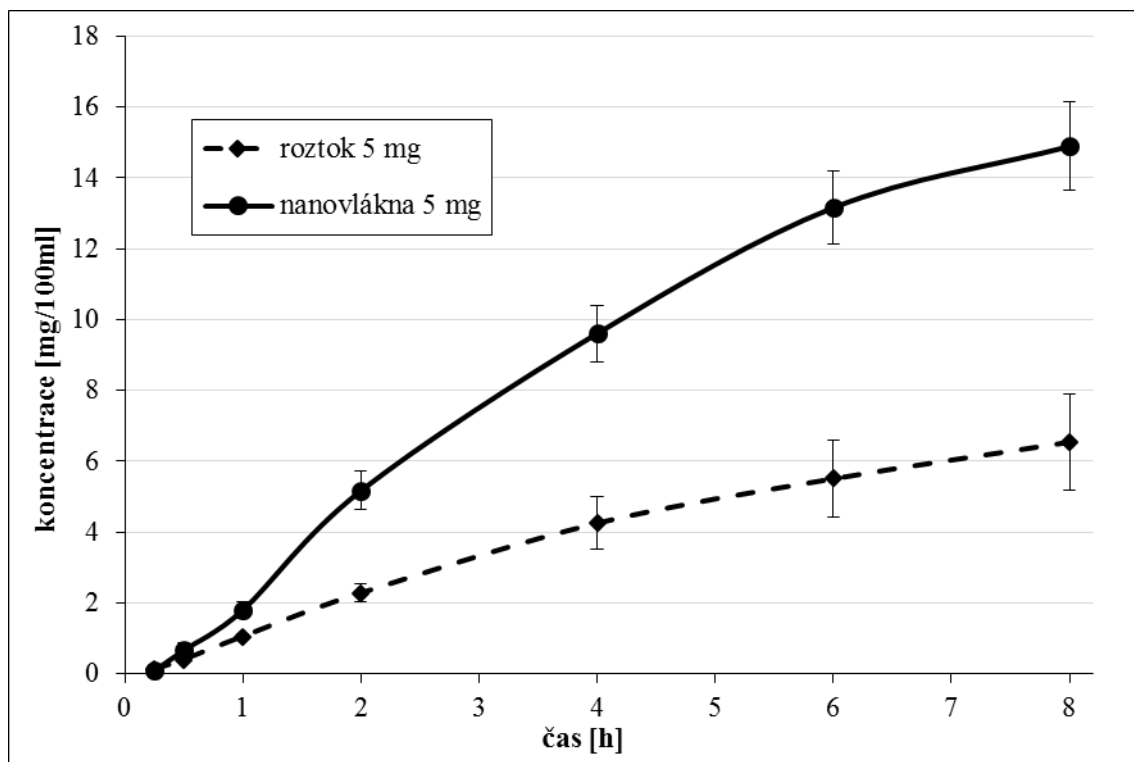
Permeace naproxenu byla testována z roztoků naproxenu sodného o různé koncentraci látky. Byly využity roztoky o koncentraci 1, 2, 3 a 10 %. Výsledky měření ukázaly na velmi dobrý průchod tohoto léčiva sublingvální mukózou *in vitro* s výraznou odezvou na koncentraci léčiva v donorovém roztoku. Saturovaný roztok poskytl koncentrace v akceptorové fázi dosahující přes 180 mg/100 ml, což představovalo průnik přes 70 % léčiva, aplikovaného v donorovém roztoku. Srovnání permeace naproxenu z těchto čtyř roztoků léčiva je zobrazeno na **Obrázku 32**.

Permeace naproxenu oproti jeho sodné soli probíhala nepatrně rychleji, avšak výrazně vyšší rozpustnost ve vodném prostředí a z ní plynoucí možná vyšší koncentrace donorového roztoku sodné soli vedla k využití této formy pro přípravu donorových roztoků.

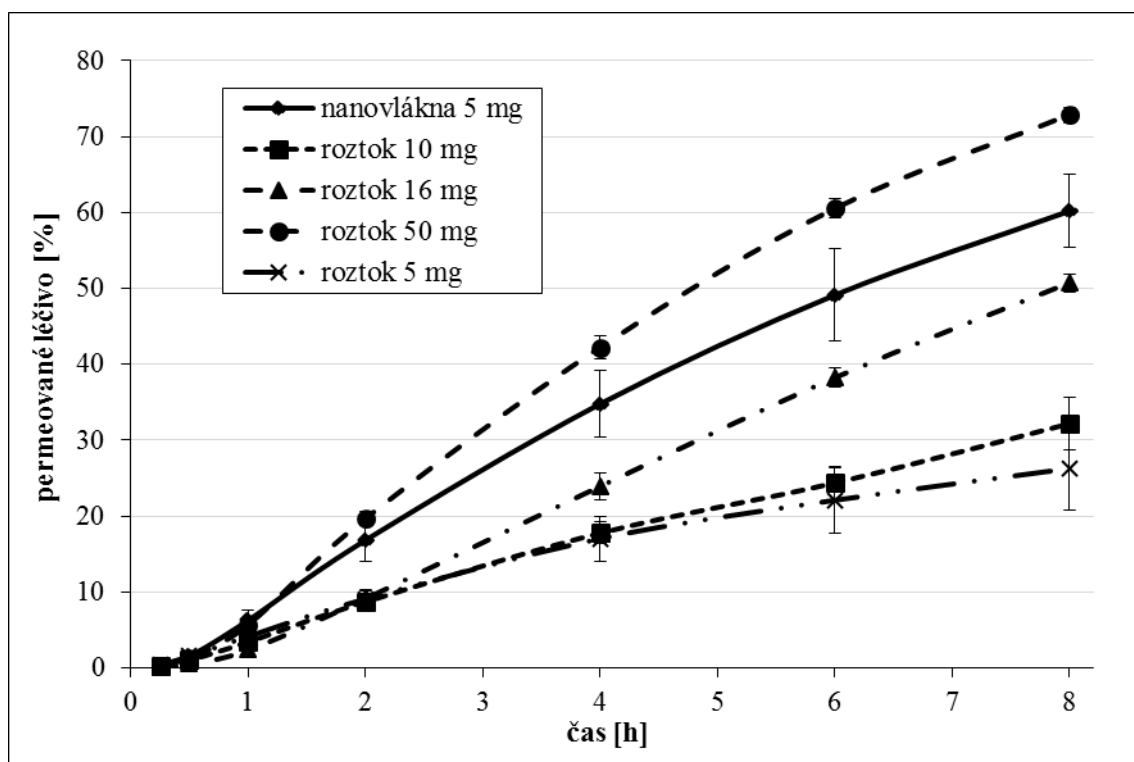


**Obrázek 32** Permeace naproxenu přes sublingvální membránu *in vitro* z roztoků o různé koncentraci látky 1%, (5mg v donoru), 2% (10 mg), 3% (16 mg) a 10% (50 mg).

Využití nanovlákněných membrán jakožto donorů naproxenu přineslo výrazné zlepšení v množství permeovaného léčiva ve srovnání s donorovým roztokem obsahujícím stejné množství látky. Permeaci z nasyceného roztoku NAPS se však nevyrovnala, neboť celkové množství léčiva bylo u nasyceného roztoku daného objemu výrazně vyšší, což bylo u dobře epitelem prostupujícího naproxenu vzhledem ke koncentračnímu spádu primárním faktorem.



**Obrázek 33** Srovnání permeace naproxenu přes sublingvální membránu z roztoku (5 mg v donoru) a nanovlákněné membrány (nanovlákná s 5 mg NAP).



**Obrázek 34** Srovnání množství naproxenu permeovaného přes sublingvální membránu *in vitro*. Donory jsou roztoky (1, 2, 3 a 10%) a nanovlákněné membrány (PCL-NAP 30%, 5 mg).

Permeace naproxenu byla nejvyšší u nasyceného roztoku (roztok s celkovým množstvím 50 mg NAP), avšak v prvních dvou hodinách experimentu byla srovnatelná nebo vyšší při použití nanovlákných membrán, poté již byla velká část léčiva vyčerpána a rychlost permeace klesala, stejně jako bylo pozorováno u sumatriptanu.

**Tabulka 7** Hodnoty fluxů sumatriptanu a naproxenu vybraných permeačních experimentů

Vzorky se SUS	Flux [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	Vzorky s NAP	Flux [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]
nanovrstva PVA (2 mg)	$4,39 \pm 0,56$	nanovrstva PCL (5 mg)	$180,59 \pm 14,05$
roztok pH 7,4 (5 mg)	$2,71 \pm 1,00$	roztok 1% (5 mg)	$77,30 \pm 16,56$
roztok pH 12 (30 mg)	$13,47 \pm 3,47$	roztok 2% (10 mg)	$185,95 \pm 19,40$
roztok pH 7,4 (30 mg)	$10,32 \pm 2,72$	roztok 3% (16 mg)	$521,26 \pm 14,03$
roztok pH 3,9 (30 mg)	$6,43 \pm 2,47$	roztok 10% (50 mg)	$2277,31 \pm 41,71$

Porovnáme-li permeace naproxenu a sumatriptanu, tak naproxen procházel sublingvální membránou výrazně lépe. Molekulová hmotnost obou léčiv je velmi podobná, avšak rozdíly v polaritě těchto molekul jsou velmi výrazné ( $\log P = 3,18$  NAP vs.  $\log P = 0,93$  SUS). Z toho je možné usoudit, že permeace probíhá převážně nepolárními cestami této mukozální membrány. Relativní množství naproxenu, které prošlo membránou, se pohybovalo v rozmezí 35–75 % aplikovaného léčiva, zatímco míra permeace sumatriptanu se pohybovala pouze mezi 0,5–4,5 %.

Využití nanovlákných membrán pro sublingvální podání léčiv přineslo v *in vitro* podmínkách výrazně lepší výsledky z hlediska permeace aplikovaných léčiv, a to jak u špatně absorbovatelného sumatriptanu, tak dobře mukózou procházejícího naproxenu. Zlepšení permeace bylo mnohem výraznější u SUS, který jinak procházel přes sublingvální mukózu pomalu a špatně. Je proto předpokladem, že nanovlákné nosiče budou obzvláště výhodné pro sublingvální aplikaci špatně absorbovatelných léčiv.

Jako optimální navrhované složení této sublingvální membrány na základě výsledků experimentů vychází následující: kontaktní vrstva PAA nesíťovaná s obsahem sumatriptanu, pod níž se nachází vrstva CHI, a to buď se sumatriptanem a NAP, nebo jen NAP a poslední nanovlákná vrstva PCL. Poslední vrstvu je pak možné na povrchu překrýt nepropustnou vrstvou (možno využít jako podkladové vrstvy, na kterou jsou

nanovláknenné membrány nanášeny) k zabránění disoluce aplikovaných látek do dutiny ústní a jejich následného spolknutí.

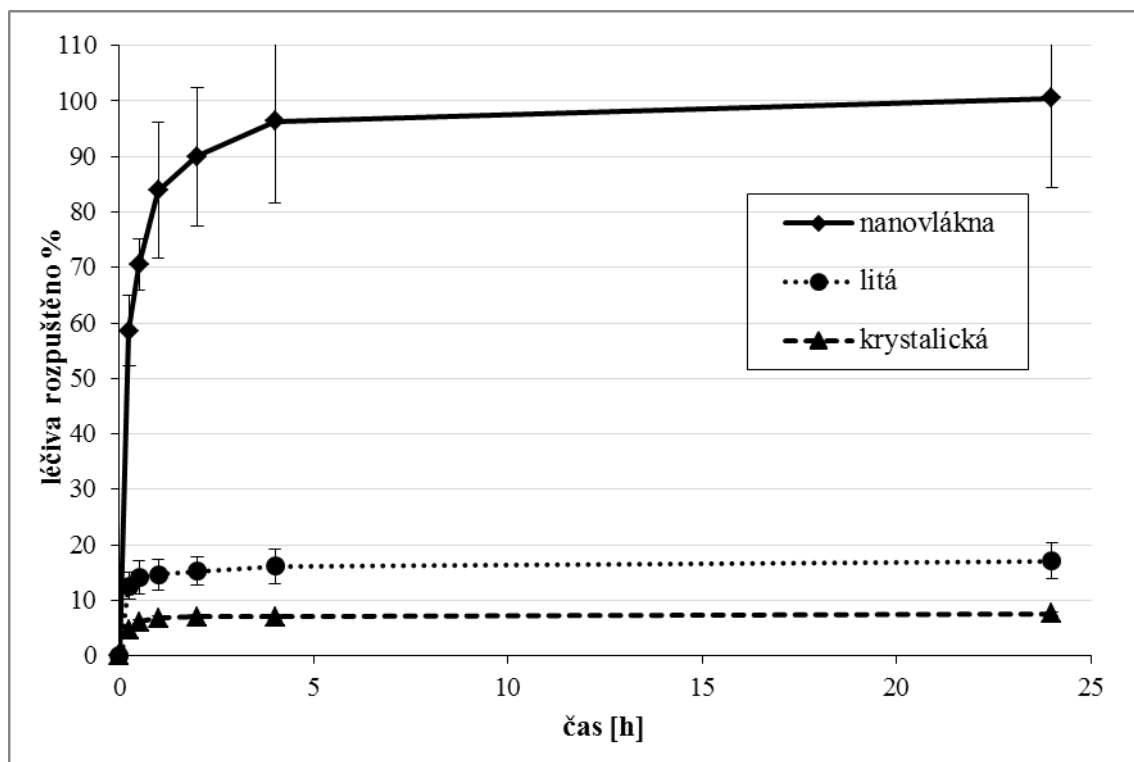
Léčiva je nejvhodnější inkorporovat do této membrány v neionizované formě, neboť zlepšená disoluce z nanovláken téměř smazává rozdíly v rozpustnosti a permeace léčiv dle našich výsledků probíhá přednostně v neionizované formě. Přitom permeace sublingválním epitelem je zde tím krokem, který udává rychlost celého procesu.

## *5.5 Zlepšení disoluce špatně rozpustných léčiv*

### **5.5.1 Nabumeton**

Nabumeton byl zvolen jako představitel ve vodě špatně rozpustného léčiva. Jeho disoluce byla testována z krystalické formy, z polymerních litých membrán a z nanovláknenných membrán s obsahem účinné látky. Disoluce nabumetonu do pufrovaných vodných roztoků prokázala výrazné zvýšení množství rozpuštěné látky, zabudované v nanovláknenném nosiči, oproti léčivu, nanesenému v lité membráně i nemoifikované substanci. Podobných výsledků s výraznými rozdíly mezi rozpustností z krystalické substance a látky, zabudované v nanovláknenném nosiči bylo dosaženo ve studii s využitím PEO pro formulaci nanovláknenných membrán [182].

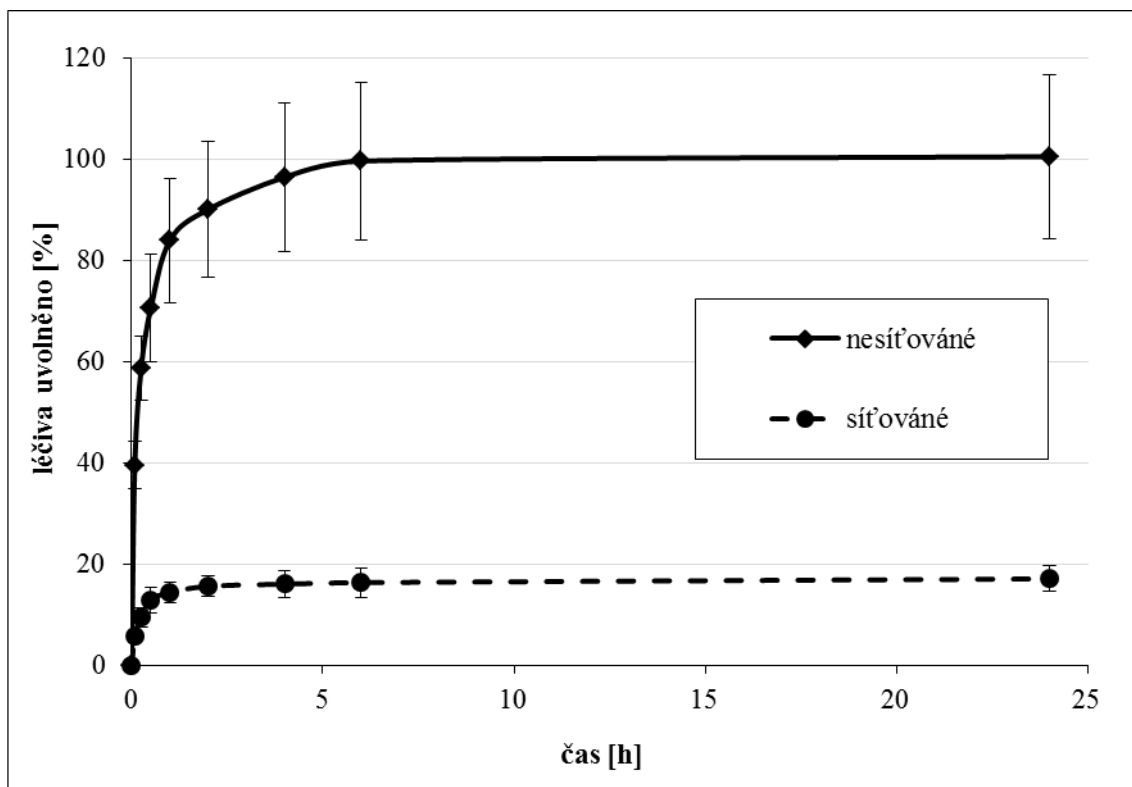




**Obrázek 35** Srovnání disoluce nabumetonu z krystalické látky, nanovláknenného nosiče léčiva a litého filmu s obsahem léčiva.

Vliv síťování na množství uvolnitelného léčiva z nanovláken byl testován pro membrány, připravené z PAA. Membrány byly připraveny stejným způsobem s obsahem 5 % nabumetonu a část membrán byla síťována s použitím  $\beta$ -cyklodextrinu a tepla (viz kapitola 4.2.1.1). Liberace nabumetonu z těchto membrán ukázala velký rozdíl v míře uvolněného léčiva. Zatímco z membrán, které nebyly síťovány a kompletně se rozpustily, bylo získáno veškeré ES inkorporované léčivo; síťované membrány poskytly pouze okolo 20 % inkorporovaného léčiva během 24 hod.

Podobných výsledků bylo dosaženo také v dřívější studii se salicylátem sodným, ve které byl studován vliv délky doby síťování nanovláken z PVA na uvolněné množství léčiva. Síťované membrány uvolnily taktéž menší množství látky s tím, že delší doba síťování (zde glutaraldehydem) vedla lineárně k poklesu uvolněného množství salicylátu [244].



**Obrázek 36** Vliv sít'ování na množství uvolněného nabumetonu z nanovláknenných membrán, připravených z PAA s 5 % nabumetonu na hmotnost membrány.

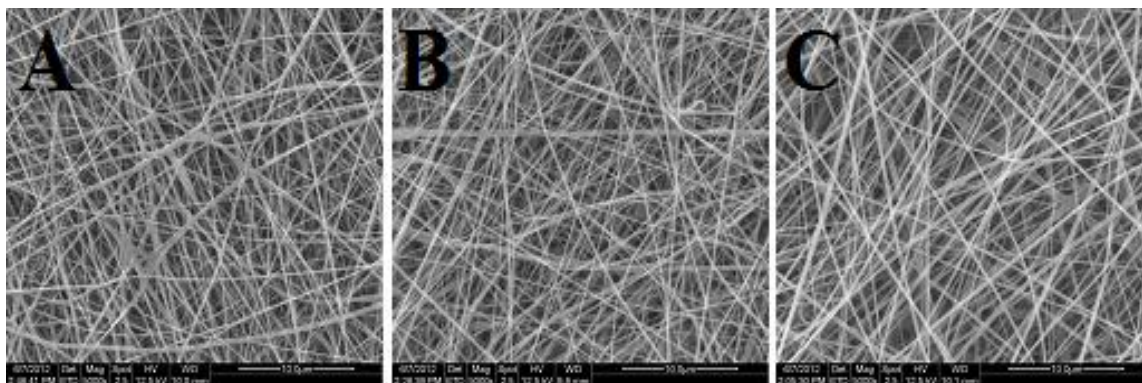
Sít'ování z důvodu velkého poklesu množství dostupného léčiva není proto pro tyto systémy vhodné a sublingvální přípravky je vhodné koncipovat buď jako rychlerozpustné systémy, nebo využít ve vodě nerozpustných polymerů s rychlým uvolňováním léčiva (např. CHI, PCL).

### 5.5.2 Diosmin

Diomin, jakožto ve vodě téměř nerozpustné léčivo, byl vybrán pro testování možností zlepšení disoluce a případně následné absorpce s využitím nanovláknenných membrán. Diosmin byl inkorporován do nanovláknenného nosiče prostřednictvím ES z vodného roztoku. Pro přípravu membrán byl vybrán jako nosný polymer HPC, který je ve farmacii často využíván. Pro tvorbu nanovláken byl při tvorbě vláken přidáván PEO, který usnadňuje a umožňuje tvorbu kontinuálních vláken nízkých průměrů [349]. Dále byl do směsi přidán PVA, jakožto ve vodě dobře rozpustný a snadno zvláknitelný polymer, který dále zlepšil mechanické vlastnosti připravovaných vláken. Složení roztoku těchto

polymerů bylo optimalizováno na poměr 45:47,5:7,5 (HPC:PVA:PEO), který umožňoval tvorbu kontinuálních vláken bez výskytu defektů.

Diosmin byl plně rozpuštěn v roztoku koncentrovaného hydroxidu a přidán v koncentracích 15, 23 a 30 % k roztoku polymerů (počítáno na hmotnost polymerů). Pro každou koncentraci diosminu byly připraveny tři různé šířky nanovlákněné vrstvy (přibližně 5, 10 a 20 g/m<sup>2</sup>). Maximální koncentrace diosminu, kterou bylo možno pro dané složení polymerů připravit, se pohybovala okolo 30 %. Nad tuto koncentraci se již množily defekty vláken a postupně byl roztok natolik viskózní, že již nedocházelo k tvorbě vláken ani při maximálním možném aplikovatelném napětí.

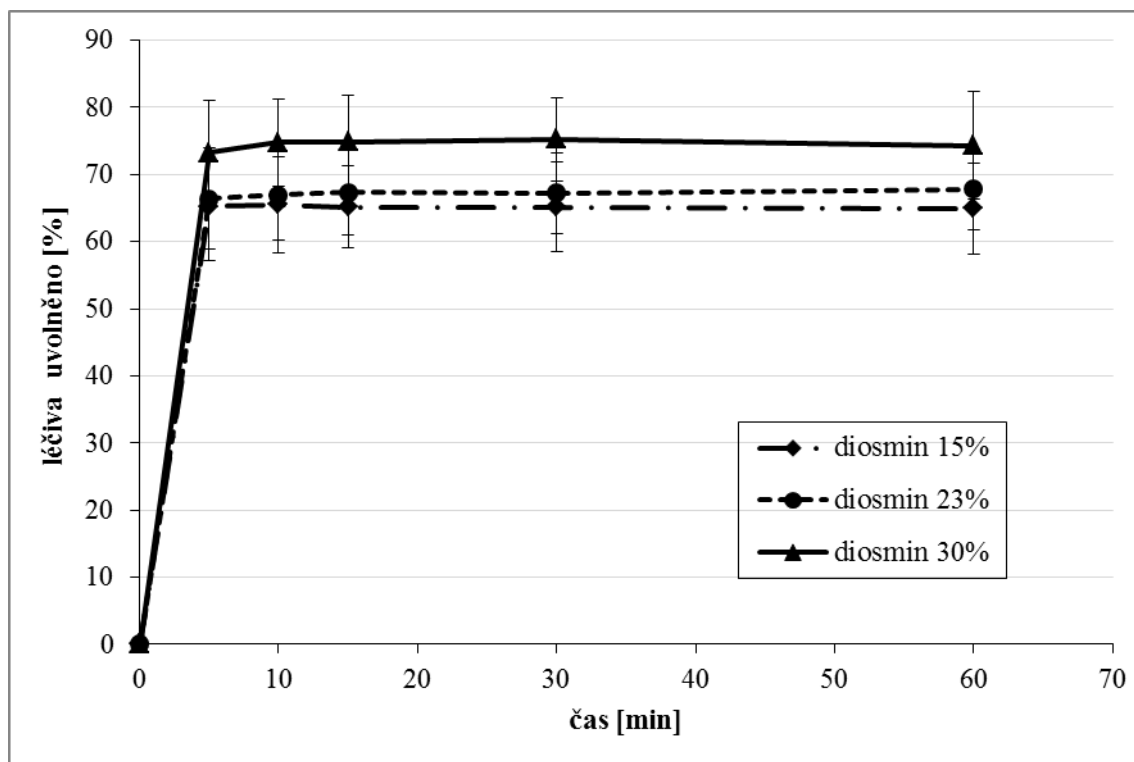


**Obrázek 37** SEM snímky připravených nanovlákněných membrán s obsahem: **A:** 15% diosminu, **B:** 23% diosminu, **C:** 30% diosminu.

#### 5.5.2.1 Liberace diosminu

Liberace diosminu probíhala do pufrovaných roztoků o pH 7,8 za účelem simulovat prostředí střeva, kde je léčivo převážně absorbováno. Diosmin byl uvolněn z nanovlákněných membrán, rozpustných ve vodě, téměř okamžitě po začátku experimentu. Během 5–10 minut bylo uvolněno veškeré léčivo, přítomné v nanovlákněch, jak je ukázáno na **Obrázku 38**. V daném akceptorovém prostředí však nedošlo k úplnému rozpuštění léčiva. Detekovaná množství v akceptorové fázi se pohybovala od 65–75 % léčiva, inkorporovaného ES. Nejvyšší množství rozpuštěného léčiva byla získána při liberacích z membrán s 30% obsahem léčiva, avšak průměrné hodnoty uvolněných množství diosminu ze všech membrán (tedy i s obsahem 15 % či 23 % diosminu) byly vždy v překrývajících se intervalech příslušných směrodatných odchylek, a tedy zjevně statisticky zanedbatelné.

Také při zkoumání vlivu různé koncentrace léčiva v membránách a různé šířky membrán na průběhy liberace léčiva nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly, jak je možno pozorovat na **Obrázku 38**. Můžeme tedy říci, že liberace diosminu z nanovlákných membrán nebyla ovlivněna ani vyšší koncentrací léčiva v nanovlákněch, ani různou tloušťkou nanovlákněné vrstvy (v experimentálním měřítku gramáž 5–20 g/m<sup>2</sup>, obsah léčiva 15–30 %).



**Obrázek 38** Liberace diosminu z nanovlákných membrán, obsahující různé množství inkorporovaného léčiva.

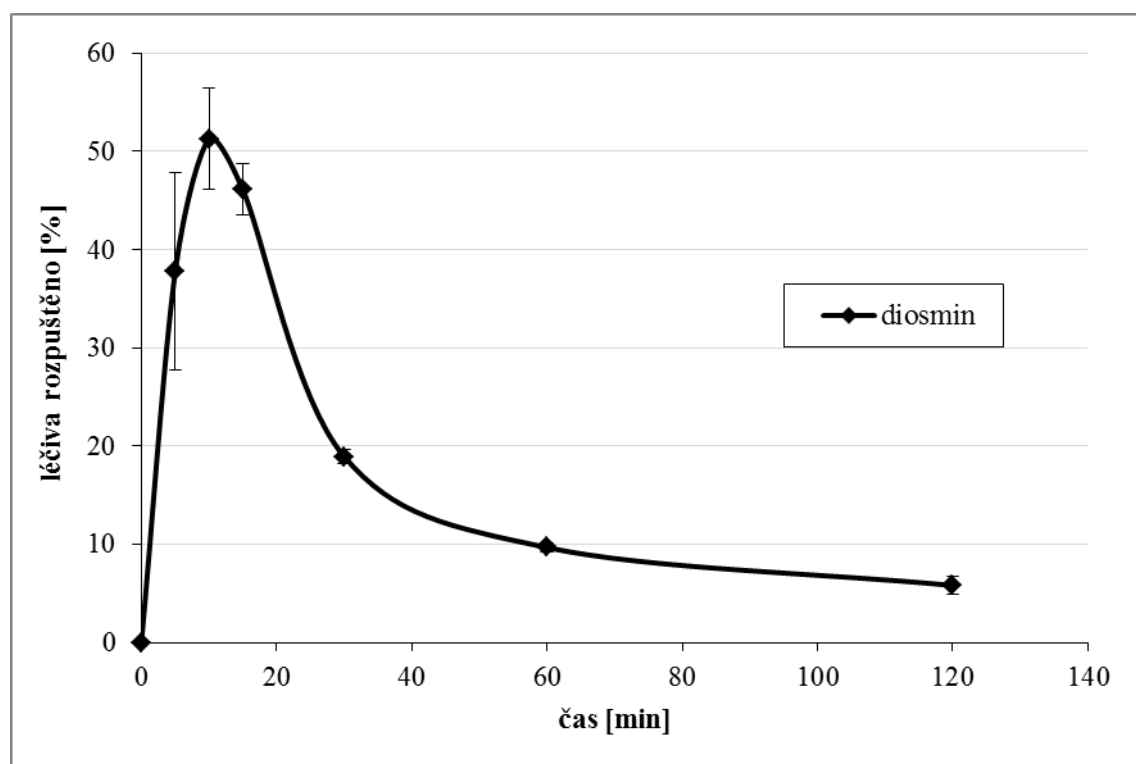
Toto zjištění je obzvláště důležité pro další výrobu těchto membrán pro využití v lékové formě, neboť nárůst koncentrace léčiva vedl ke stejným, případně jen poněkud lepším disolučním výsledkům, ale zvyšující se tloušťka nanovlákněné vrstvy v experimentálním měřítku neovlivnila rychlost disoluce.

V prvotních liberačních experimentech se krátce po ponoření vláken rychle vytvořil vysoce přesycený roztok diosminu, což vedlo k postupné precipitaci látky z akceptorového roztoku. Precipitace, která začala po 15 až 30 minutách od zahájení experimentu, vedla k postupnému snižování koncentrace rozpuštěného diosminu. Tento úkaz byl vyhodnocen jako příklad „spring“ efektu. Ten je typický tvorbou přesyceného roztoku a okamžitou precipitací látek (jejich metastabilních forem) z roztoku [186,354].

Použitý polymer HPC působí mimo jiné jako inhibitor precipitace [347]; jeho koncentrace v roztoku však zřejmě není po rozpuštění membrán k plnění této funkce dostatečná. Dalšího zlepšení by bylo možné teoreticky dosáhnout přidáním dalšího inhibitoru precipitace (např. cyklodextrinů, PVP) do soustavy pro ES a zabudovat je tak do nanovlákných membrán [354].

Z hlediska provádění *in vitro* pokusů byly pro překonání tohoto experimentálního limitu po prvním odběru (5 min) odebrány tři čtvrtiny akceptorové fáze a nahrazeny čerstvým pufrům (tento krok byl také vzat v potaz při dalším zpracování obdržených dat).

Léčivo, uvolněné v podmínkách zažívacího traktu *in vivo* bude rozptýleno do větších absorpčních objemů a následně aglykonováno a absorbováno, proto lze předpokládat, že pozorovaný vznik přesyceného roztoku s následnou precipitací látky nebude hrát tak významnou roli jako v *in vitro* podmínkách. Nicméně přidání inhibitorů precipitace se zde jeví jako možná vhodná úprava.



Obrázek 39 Uvolňování diosminu z nanovlákných membrán a pozorovaný „spring effect“.

#### 5.5.2.2 Srovnání disoluce z různých forem diosminu

K posouzení rozpustnosti diosminu z různých forem byla provedena srovnávací disoluční studie z práškované krystalické látky, mikronizované formy, nacházející se v komerčně

dostupných tabletách, a nanovlákných membrán obsahujících 30 % diosminu. Jako prostředí byl opět zvolen pufr pH 7,8 simulující bazicitu střevního prostředí, kde je léčivo absorbováno.

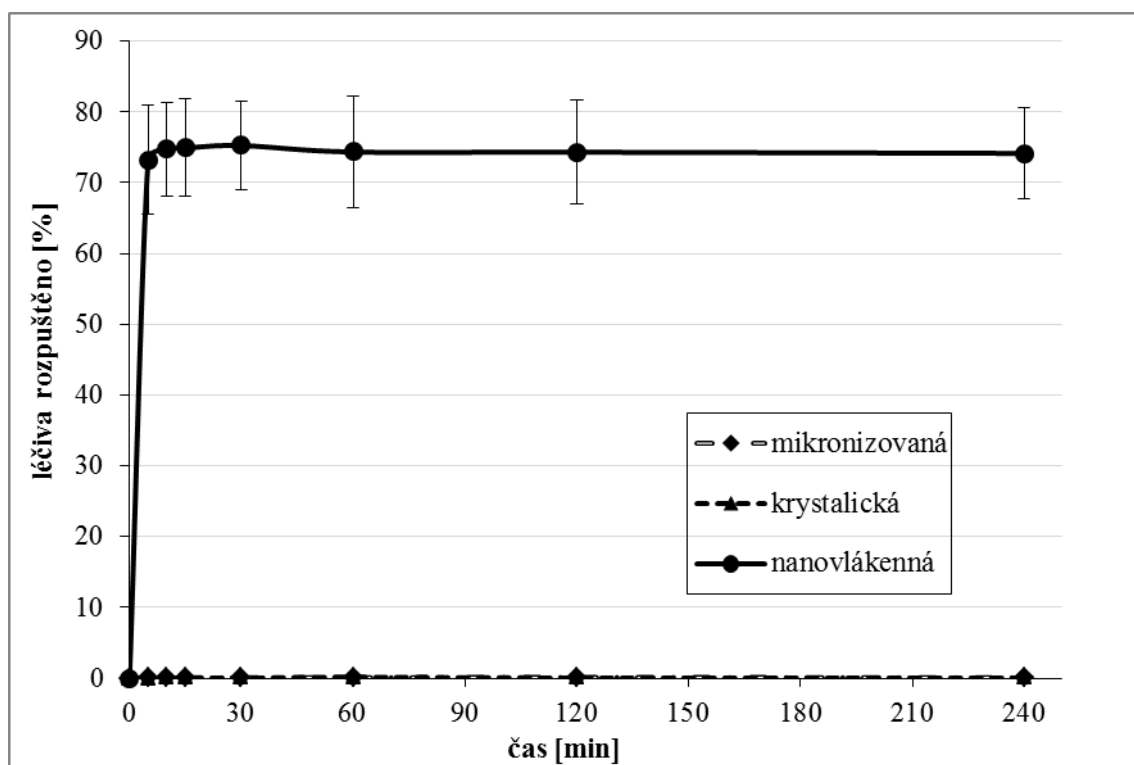
Výsledky experimentů jasně ukázaly mnohonásobně vyšší rozpustnost diosminu, přítomného v nanovlákných membránách oproti ostatním formám. Nejhorší výsledky byly dosaženy s práškovanou krystalickou látkou, kde rozpuštěné množství léčiva nebylo použitou metodou téměř detekovatelné. Mikronizovaná forma poskytla mírné zvýšení množství rozpuštěného léčiva, což však stále představovalo méně než 0,5 % aplikovaného množství látky. Oproti tomu disoluce diosminu z nanovlákného nosiče probíhala velmi rychle a většina nanoseného léčiva se ve vodném akceptorovém médiu rozpustila. Rozpuštěné množství diosminu zde představovalo okolo 75 % použitého léčiva.



**Obrázek 40** Makroskopicky pozorovatelný rozdíl v rozpouštění diosminu z mikronizované (vlevo) a nanovlákné formy diosminu (vpravo).

Takto výrazné zvýšení rozpustnosti bylo dosaženo kombinací faktorů, majících pozitivní vliv na rozpustnost látek. Obrovský povrch nanovláken je nesporně jedním z nich. Dalším a pravděpodobně klíčovým je pak amorfni stav inkorporovaného léčiva. V případě dobře zvládnutého procesu ES umožňuje tato technologie tvorbu stabilní tuhé molekulární disperze, případně nanodisperze okrsků amorfni látky v polymerní matrix [180,356]. Tento nanovlákný systém pak bez zvýšeného rizika předčasné agregace nanodispergovaných substancí vykazuje výrazně vyšší rozpustnost látek v kapalných

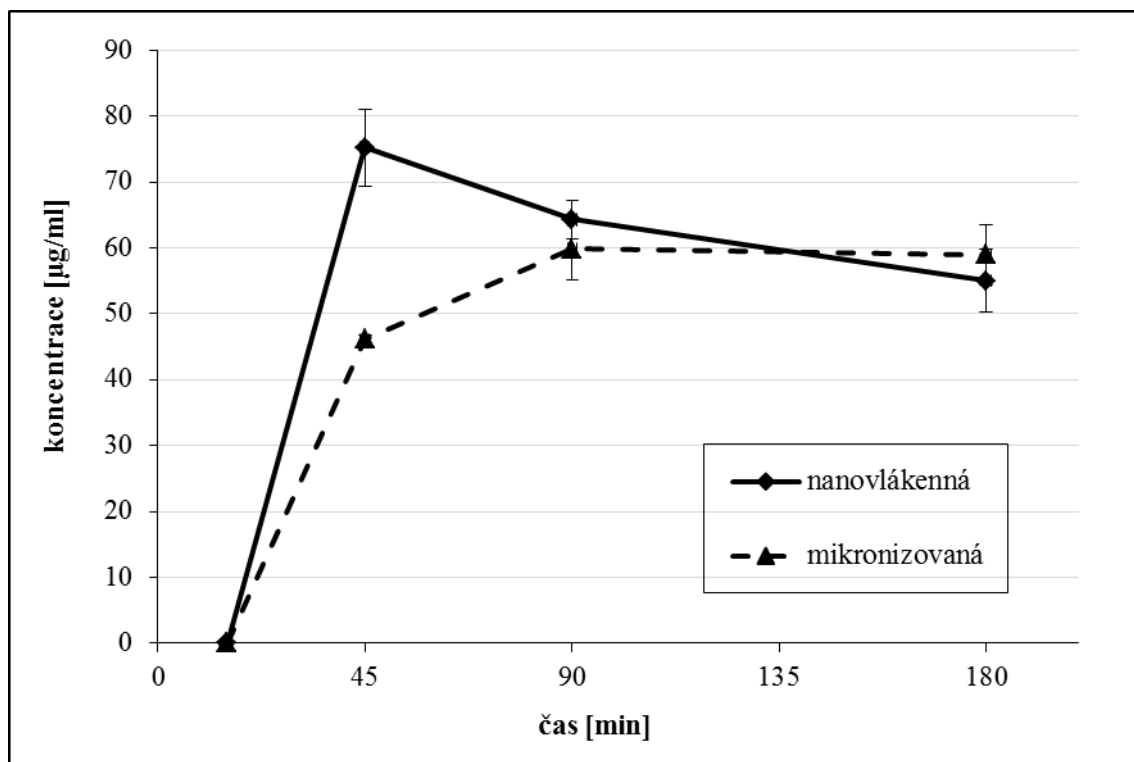
médiích a může být proto využito pro úpravu disolučních vlastností řady dalších špatně rozpustných léčiv.



**Obrázek 41** Rozdíl v míře disoluce diosminu ze tří různých forem látky.

### 5.5.2.3 Pilotní farmakokinetický experiment *in vivo*

Za účelem zjištění *IVIV* korelace obdržných výsledků disolučních testů byl proveden pilotní experiment *in vivo*. Je známo, že často výborné výsledky *in vitro* nemusí vést k jejich následnému potvrzení *in vivo* a praktickému terapeutickému úspěchu. *In vivo* experiment měl proto ukázat, má-li zvýšená rozpustnost, dosažená inkorporací léčiva do nanovláčken, vliv na biologickou dostupnost diosminu. Výsledky experimentu jsou zobrazeny na **Obrázku 42** a ukázaly vyšší iniciální plasmatické koncentrace diosmetinu po podání prostřednictvím nanovláčenných membrán než po podání mikronizovaného prášku (suspenze mikronizovaných částic z komerčně dostupných tablet). V pozdějších časech odběrů (90 a 180 min) již došlo u obou aplikačních forem k vyrovnání plasmatických koncentrací diosmetinu. Výsledná hodnota AUC je pro sledovaný časový interval vyšší pro nanovláčennou formu léčiva než mikronizovanou. Farmakokinetické hodnoty, vypočtené z experimentálních dat jsou shrnuty v **Tabulce 8**.



**Obrázek 42** Plasmatické hladiny diosmetinu po perorálním podání jednotlivé dávky mikronizované X nanovláčenné formy diosminu (3,5 mg) krysám. Graf konstruován s úvodní 15 min prodlevou.

**Tabulka 8** Výsledné farmakokinetické parametry, získané z experimentu *in vivo*.

Diosmin	$t_{max}$ [min]	$C_{max}$ [µg/ml]	AUC <sub>15-180min</sub>	$C_{45min}$ [µg/ml]
nanovláčena	45	75,2 ± 11,4	160,6 ± 6,8	75,2 ± 11,4
mikronizovaný	90	59,9 ± 8,4	140,4 ± 15,2	46,1 ± 1,3

$C_{max}$  – maximální plazmat. koncentrace,  $t_{max}$  – čas dosažení max. koncentrace.

Výsledky ukazují, že využití nanovláčenného nosiče přineslo sice jen mírné, avšak dobře patrné zlepšení v BA diosminu jako modelového léčiva. Zejména vysoké koncentrace v počátku experimentu a zkrácení doby do dosažení  $C_{max}$  může být pro řadu léčiv výhodné, vyžadují-li rychlý nástup účinku (léky proti bolesti, migréně...).

Tyto výsledky *in vivo* považujeme za pozitivní, i když nárůst BA nebyl odpovídající nárůstu rozpuštěného množství diosminu. Bylo by potřebné provést ještě řadu dalších experimentů s delším sledováním plasmatických koncentrací a větším počtem sledovaných subjektů. Přesto však všechna obdržaná data naznačují pozitivní přínos technologie zpracování léčiva do nanovláčenné formy pomocí ES a minimálně ospravedlňují provedení dalších experimentů v širším měřítku.



## 6. Závěry

Nanovláknenné membrány připravené z několika různých polymerů a jedné polymerní směsi s obsahem vybraných léčiv byly připraveny elektrospiningem na velkoprodukčním zařízení Nanospider™. Úspěšnost inkorporace léčiv byla potvrzena pomocí SEM a DSC měření. Elektronmikroskopická měření ukázala, že všechny membrány měly vlákna s průměry v nanometrech (80 nm až 550 nm) a léčiva byla úspěšně inkorporována do struktury nanovláken bez výskytu krystalů léčiva na povrchu nanovláken či vmezeřených ve struktuře membrán. Provedená DSC měření potvrdila nepřítomnost krystalické formy léčiv v nanovláknenných soustavách.

S využitím modelového léčiva kofeinu bylo potvrzeno, že hlavním faktorem ovlivňujícím kinetiku uvolňování z nanovláknenných membrán jsou vlastnosti použitého polymeru. Membrány z hydrofilních polymerů se prezentovaly velmi rychlým uvolněním léčiva v řádu minut, zatímco z hydrofobní PLA uvolňovaly léčivo postupně v průběhu minimálně dvou týdnů. Tyto zjištění jsou v souladu s hlavním mechanismem uvolňování látek inkorporovaných v nanovláknenných desorpcí z jejich povrchových vrstev po kontaktu s disolučním médiem. Zpracování polymerů se stejným léčivem do nanovláken prostřednictvím ES tedy umožňuje formulaci nosičových systémů s velmi rychlým ale i postupným uvolňováním substance.

Permeace vybraných léčiv sublingvální membránou byla úspěšně navýšena s využitím nanovláknenných membrán, nesoucích daná léčiva (sumatriptan, naproxen), přičemž zlepšení bylo výraznější u hůře epitelem procházejícího léčiva sumatriptanu. Léčiva je dále vhodnější inkorporovat do nanomembrán v neionizované formě, která lépe prostupuje mukózou.

ES a nanosení ve vodě špatně rozpustného léčiva diosminu do nanovláken přineslo výrazné zvýšení rozpustnosti léčiva v porovnání s komerčně dostupným přípravkem a následná *in vivo* studie biodostupnosti poskytla také zlepšené farmakokinetické parametry po podání nanovláknenného přípravku.

Výsledky této disertační práce demonstrovaly výhodnost využití nanovláknenných membrán pro formulaci lékových forem a to hlavně přípravků pro mukozální podání – sublingvální případně bukální a perorálních přípravků se zlepšenou disolucí ve vodě špatně rozpustných léčiv.

## 7.Literatura

- [1] M.C. Roco, C.A. Mirkin, M.C. Hersam, Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: Summary of international study, *J. Nanoparticle Res.* 13 (2011) 897–919. doi:10.1007/s11051-011-0275-5.
- [2] V. Leung, F. Ko, Biomedical applications of nanofibers, *Polym. Adv. Technol.* 22 (2011) 350–365. doi:10.1002/pat.1813.
- [3] A.H. Faraji, P. Wipf, Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorganic Med. Chem.* 17 (2009) 2950–2962. doi:10.1016/j.bmc.2009.02.043.
- [4] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control. Release.* 70 (2001) 1–20. doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4.
- [5] V.K. Pawar, Y. Singh, J.G. Meher, S. Gupta, M.K. Chourasia, Engineered nanocrystal technology: *In-vivo* fate, targeting and applications in drug delivery., *J. Control. Release.* 183C (2014) 51–66. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.030.
- [6] L. Gao, G. Liu, J. Ma, X. Wang, L. Zhou, X. Li, et al., Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs, *Pharm. Res.* 30 (2013) 307–324. doi:10.1007/s11095-012-0889-z.
- [7] J.-U.A.H. Junghanns, R.H. Müller, Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications., *Int. J. Nanomedicine.* 3 (2008) 295–309. doi:10.2147/IJN.S595.
- [8] A. Sharma, U.S. Sharma, Liposomes in drug delivery: Progress and limitations, *Int. J. Pharm.* 154 (1997) 123–140. doi:10.1016/S0378-5173(97)00135-X.
- [9] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48. doi:10.1016/j.addr.2012.09.037.
- [10] A. Greiner, J.H. Wendorff, Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (2007) 5670–703. doi:10.1002/anie.200604646.

- [11] S. Agarwal, A. Greiner, J.H. Wendorff, Functional materials by electrospinning of polymers, *Prog. Polym. Sci.* 38 (2013) 963–991. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001.
- [12] L.T.H. Nguyen, S. Chen, N.K. Elumalai, M.P. Prabhakaran, Y. Zong, C. Vijila, et al., Biological, Chemical, and Electronic Applications of Nanofibers, *Macromol. Mater. Eng.* 298 (2013) 822–867. doi:10.1002/mame.201200143.
- [13] G.C. Rutledge, S. V Fridrikh, Formation of fibers by electrospinning., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1384–91. doi:10.1016/j.addr.2007.04.020.
- [14] N. Tucker, J. Stanger, The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995., *J. Eng. Fiber. Fabr.* (2012) 63–73.
- [15] F.-L. Zhou, R.-H. Gong, I. Porat, Mass production of nanofibre assemblies by electrostatic spinning, *Polym. Int.* 58 (2009) 331–342. doi:10.1002/pi.2521.
- [16] J. Jirsak, O. Sanetrnik, F. Lukas, D. Kotek, K. Martinova, L. Chaloupek, A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method, WO2005024101, 2005.
- [17] A. Frenot, I.S. Chronakis, Polymer nanofibers assembled by electrospinning, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 64–75. doi:10.1016/S1359-0294(03)00004-9.
- [18] S. Chakraborty, I.-C. Liao, A. Adler, K.W. Leong, Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1043–54. doi:10.1016/j.addr.2009.07.013.
- [19] J. Doshi, D.H. Reneker, Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers, *J. Electrostat.* 35 (1995) 151–160.
- [20] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Compos. Sci. Technol.* 63 (2003) 2223–2253. doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
- [21] C.J. Thompson, G.G. Chase, a. L. Yarin, D.H. Reneker, Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model, *Polymer (Guildf)*. 48 (2007) 6913–6922. doi:10.1016/j.polymer.2007.09.017.

- [22] B. Cramariuc, R. Cramariuc, R. Scarlet, L.R. Manea, I.G. Lupu, O. Cramariuc, Fiber diameter in electrospinning process, *J. Electrostat.* 71 (2013) 189–198. doi:10.1016/j.elstat.2012.12.018.
- [23] P.D. Dalton, D. Grafahrend, K. Klinkhammer, D. Klee, M. Möller, Electrospinning of polymer melts: Phenomenological observations, *Polymer (Guildf)*. 48 (2007) 6823–6833. doi:10.1016/j.polymer.2007.09.037.
- [24] D.W. Hutmacher, P.D. Dalton, Melt electrospinning., *Chem. Asian J.* 6 (2011) 44–56. doi:10.1002/asia.201000436.
- [25] J. Lyons, C. Li, F. Ko, Melt-electrospinning part I: Processing parameters and geometric properties, *Polymer (Guildf)*. 45 (2004) 7597–7603. doi:10.1016/j.polymer.2004.08.071.
- [26] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing, Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications., *J. Control. Release.* 185 (2014) 12–21. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.018.
- [27] Z. Sun, E. Zussman, a L. Yarin, J.H. Wendorff, a Greiner, Compound Core–Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning, *Adv. Mater.* 15 (2003) 1929–1932. doi:10.1002/adma.200305136.
- [28] A.L. Yarin, Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers, *Polym. Adv. Technol.* 22 (2011) 310–317. doi:10.1002/pat.1781.
- [29] S. Maretschek, A. Greiner, T. Kissel, Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins., *J. Control. Release.* 127 (2008) 180–7. doi:10.1016/j.jconrel.2008.01.011.
- [30] Y. Yang, X. Li, M. Qi, S. Zhou, J. Weng, Release pattern and structural integrity of lysozyme encapsulated in core-sheath structured poly(DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 106–16. doi:10.1016/j.ejpb.2007.10.016.
- [31] Y. Yang, X. Li, L. Cheng, S. He, J. Zou, F. Chen, et al., Core-sheath structured fibers with pDNA polyplex loadings for the optimal release profile and transfection efficiency as potential tissue engineering scaffolds., *Acta Biomater.* 7 (2011) 2533–43. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.031.

- [32] D.-G. Yu, J.-H. Yu, L. Chen, G.R. Williams, X. Wang, Modified coaxial electrospinning for the preparation of high-quality ketoprofen-loaded cellulose acetate nanofibers., *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1016–23. doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.036.
- [33] D.G. Yu, W. Chian, X. Wang, X.Y. Li, Y. Li, Y.Z. Liao, Linear drug release membrane prepared by a modified coaxial electrospinning process, *J. Memb. Sci.* 428 (2013) 150–156. doi:10.1016/j.memsci.2012.09.062.
- [34] S. Yan, L. Xiaoqiang, L. Shuiping, M. Xiumei, S. Ramakrishna, Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 73 (2009) 376–381. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.06.009.
- [35] M. Maleki, M. Latifi, M. Amani-Tehran, S. Mathur, Electrospun core-shell nanofibers for drug encapsulation and sustained release, *Polym. Eng. Sci.* 53 (2013) 1770–1779. doi:10.1002/pen.23426.
- [36] K.M. Forward, G.C. Rutledge, Free surface electrospinning from a wire electrode, *Chem. Eng. J.* 183 (2012) 492–503. doi:10.1016/j.cej.2011.12.045.
- [37] L. Persano, A. Camposeo, C. Tekmen, D. Pisignano, Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review, *Macromol. Mater. Eng.* 298 (2013) 504–520. doi:10.1002/mame.201200290.
- [38] K.K. Sankaran, K.S. Vasanthan, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, Development and evaluation of axially aligned nanofibres for blood vessel tissue engineering, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2012). doi:10.1002/term.1566.
- [39] W. Wang, S. Itoh, K. Konno, T. Kikkawa, S. Ichinose, K. Sakai, et al., Effects of Schwann cell alignment along the oriented electrospun chitosan nanofibers on nerve regeneration., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 91 (2009) 994–1005. doi:10.1002/jbm.a.32329.
- [40] S.F. Li, Y.H. Fan, J.F. Hu, Y.S. Huang, W.T. Wu, Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for transesterification reaction, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 73 (2011) 98–103. doi:10.1016/j.molcatb.2011.08.005.
- [41] S.F. Li, Y.H. Fan, R.F. Hu, W.T. Wu, *Pseudomonas cepacia* lipase immobilized onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for biodiesel production from

- soybean oil, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 72 (2011) 40–45. doi:10.1016/j.molcatb.2011.04.022.
- [42] S.F. Li, W.T. Wu, Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis, *Biochem. Eng. J.* 45 (2009) 48–53. doi:10.1016/j.bej.2009.02.004.
- [43] J.S. Im, M. Il Kim, Y.S. Lee, Preparation of PAN-based electrospun nanofiber webs containing TiO<sub>2</sub> for photocatalytic degradation, *Mater. Lett.* 62 (2008) 3652–3655. doi:10.1016/j.matlet.2008.04.019.
- [44] T. He, Z. Zhou, W. Xu, F. Ren, H. Ma, J. Wang, Preparation and photocatalysis of TiO<sub>2</sub>-fluoropolymer electrospun fiber nanocomposites, *Polymer (Guildf).* 50 (2009) 3031–3036. doi:10.1016/j.polymer.2009.04.015.
- [45] S. Chuangchote, J. Jitputti, T. Sagawa, S. Yoshikawa, Photocatalytic activity for hydrogen evolution of electrospun TiO<sub>2</sub> nanofibers., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 1 (2009) 1140–1143. doi:10.1021/am9001474.
- [46] H.R. Pant, D.R. Pandeya, K.T. Nam, W. il Baek, S.T. Hong, H.Y. Kim, Photocatalytic and antibacterial properties of a TiO<sub>2</sub>/nylon-6 electrospun nanocomposite mat containing silver nanoparticles, *J. Hazard. Mater.* 189 (2011) 465–471. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.02.062.
- [47] T.E. Herricks, S.-H. Kim, J. Kim, D. Li, J.H. Kwak, J.W. Grate, et al., Direct fabrication of enzyme-carrying polymer nanofibers by electrospinning, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3241. doi:10.1039/b503660g.
- [48] J.-P. Lindner, C. Röben, A. Studer, M. Stasiak, R. Ronge, A. Greiner, et al., Reusable catalysts based on dendrimers trapped in poly(p-xylylene) nanotubes., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 8874–7. doi:10.1002/anie.200903448.
- [49] K. Desai, K. Kit, J. Li, P. Michael Davidson, S. Zivanovic, H. Meyer, Nanofibrous chitosan non-wovens for filtration applications, *Polymer (Guildf).* 50 (2009) 3661–3669. doi:10.1016/j.polymer.2009.05.058.
- [50] A. Ruhal, J.S. Rana, P. Ruhal, A. Kumar, M. Ruhil, C. Ram, et al., Antimicrobial nanocomposite of silver and gelatin nanofibers for medical applications, *Int. J. Technol. Res. Eng.* 1 (2013) 177–182.

- [51] N. Daels, S. De Vrieze, I. Sampers, B. Decostere, P. Westbroek, A. Dumoulin, et al., Potential of a functionalised nanofibre microfiltration membrane as an antibacterial water filter, *Desalination*. 275 (2011) 285–290. doi:10.1016/j.desal.2011.03.012.
- [52] X. Peng, I. Ichinose, Green-Chemical Synthesis of Ultrathin  $\beta$ -MnOOH Nanofibers for Separation Membranes, *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 2080–2087. doi:10.1002/adfm.201002628.
- [53] M. Boopathi, B. Singh, R. Vijayaraghavan, A Review on NBC Body Protective Clothing, *Open Text. J.* 1 (2008) 1–8. doi:10.2174/1876520300801010001.
- [54] R. Ramaseshan, S. Ramakrishna, Zinc Titanate Nanofibers for the Detoxification of Chemical Warfare Simulants, *J. Am. Ceram. Soc.* 90 (2007) 1836–1842. doi:10.1111/j.1551-2916.2007.01633.x.
- [55] J. Lademann, A. Patzelt, S. Schanzer, H. Richter, I. Gross, K.H. Menting, et al., Decontamination of the Skin with absorbing materials, *Skin Pharmacol. Physiol.* 24 (2011) 87–92. doi:10.1159/000322305.
- [56] S. Lee, Developing UV-protective textiles based on electrospun zinc oxide nanocomposite fibers, *Fibers Polym.* 10 (2009) 295–301. doi:10.1007/s12221-009-0295-2.
- [57] N. Selvakumar, A. Azhagurajan, T.S. Natarajan, M. Mohideen Abdul Khadir, Flame-retardant fabric systems based on electrospun polyamide/boric acid nanocomposite fibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 126 (2012) 614–619. doi:10.1002/app.36640.
- [58] A. Laforgue, Electrically controlled colour-changing textiles using the resistive heating properties of PEDOT nanofibers, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 8233. doi:10.1039/c0jm02307h.
- [59] Y.-Y. Lv, J. Wu, Z.-K. Xu, Colorimetric and fluorescent sensor constructing from the nanofibrous membrane of porphyrinated polyimide for the detection of hydrogen chloride gas, *Sensors Actuators B Chem.* 148 (2010) 233–239. doi:10.1016/j.snb.2010.05.029.

- [60] Y. Li, J. Gong, G. He, Y. Deng, Fabrication of polyaniline/titanium dioxide composite nanofibers for gas sensing application, *Mater. Chem. Phys.* 129 (2011) 477–482. doi:10.1016/j.matchemphys.2011.04.045.
- [61] O. Landau, A. Rothschild, E. Zussman, Processing-Microstructure-Properties Correlation of Ultrasensitive Gas Sensors Produced by Electrospinning, *Chem. Mater.* 21 (2009) 9–11. doi:10.1021/cm802498c.
- [62] A. Yang, X. Tao, R. Wang, S. Lee, C. Surya, Room temperature gas sensing properties of SnO<sub>2</sub>/multiwall-carbon-nanotube composite nanofibers, *Appl. Phys. Lett.* 91 (2007) 133110. doi:10.1063/1.2783479.
- [63] Y. Long, H. Chen, Y. Yang, H. Wang, Y. Yang, N. Li, et al., Electrospun Nanofibrous Film Doped with a Conjugated Polymer for DNT Fluorescence Sensor, *Macromolecules.* 42 (2009) 6501–6509. doi:10.1021/ma900756w.
- [64] J. Choi, E.J. Park, D.W. Park, S.E. Shim, MWCNT–OH adsorbed electrospun nylon 6,6 nanofibers chemiresistor and their application in low molecular weight alcohol vapours sensing, *Synth. Met.* 160 (2010) 2664–2669. doi:10.1016/j.synthmet.2010.10.022.
- [65] G.R. Patzke, F. Krumeich, R. Nesper, Oxidic nanotubes and nanorods--anisotropic modules for a future nanotechnology., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 2446–61. doi:10.1002/1521-3773.
- [66] N. Mathews, B. Varghese, C. Sun, V. Thavasi, B.P. Andreasson, C.H. Sow, et al., Oxide nanowire networks and their electronic and optoelectronic characteristics., *Nanoscale.* 2 (2010) 1984–98. doi:10.1039/c0nr00285b.
- [67] S. Chuangchote, T. Sagawa, S. Yoshikawa, Efficient dye-sensitized solar cells using electrospun TiO<sub>2</sub> nanofibers as a light harvesting layer, *Appl. Phys. Lett.* 93 (2008) 033310. doi:10.1063/1.2958347.
- [68] B.H. Lee, M.Y. Song, S.-Y. Jang, S.M. Jo, S.-Y. Kwak, D.Y. Kim, Charge Transport Characteristics of High Efficiency Dye-Sensitized Solar Cells Based on Electrospun TiO<sub>2</sub> Nanorod Photoelectrodes, *J. Phys. Chem. C.* 113 (2009) 21453–21457. doi:10.1021/jp907855x.



- [69] L. Ji, K.-H. Jung, A.J. Medford, X. Zhang, Electrospun polyacrylonitrile fibers with dispersed Si nanoparticles and their electrochemical behaviors after carbonization, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 4992. doi:10.1039/b903165k.
- [70] L. Ji, X. Zhang, Fabrication of porous carbon nanofibers and their application as anode materials for rechargeable lithium-ion batteries., *Nanotechnology.* 20 (2009) 155705. doi:10.1088/0957-4484/20/15/155705.
- [71] H.-W. Lu, L. Yu, W. Zeng, Y.-S. Li, Z.-W. Fu, Fabrication and Electrochemical Properties of Three-Dimensional Structure of LiCoO<sub>2</sub> Fibers, *Electrochem. Solid-State Lett.* 11 (2008) A140. doi:10.1149/1.2932054.
- [72] S.W. Choi, J.R. Kim, S.M. Jo, W.S. Lee, Y.-R. Kim, Electrochemical and Spectroscopic Properties of Electrospun PAN-Based Fibrous Polymer Electrolytes, *J. Electrochem. Soc.* 152 (2005) A989. doi:10.1149/1.1887166.
- [73] A. Fathi-Azarbayjani, L. Qun, Y.W. Chan, S.Y. Chan, Novel vitamin and gold-loaded nanofiber facial mask for topical delivery., *AAPS PharmSciTech.* 11 (2010) 1164–70. doi:10.1208/s12249-010-9475-z.
- [74] P. Taepaiboon, U. Rungsardthong, P. Supaphol, Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 387–397. doi:10.1016/j.ejpb.2007.03.018.
- [75] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review, *Int. J. Polym. Sci.* 2011 (2011). doi:10.1155/2011/290602.
- [76] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue Engineering, *Science* (80-. ). 260 (1993) 920–926. doi:10.1126/science.8493529.
- [77] S. Zhong, Y. Zhang, C.T. Lim, Fabrication of Large Pores in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cellular Infiltration: A Review, *Tissue Eng. Part B Rev.* 18 (2012) 77–87. doi:10.1089/ten.teb.2011.0390.
- [78] B.W. Tillman, S.K. Yazdani, S.J. Lee, R.L. Geary, A. Atala, J.J. Yoo, The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction, *Biomaterials.* 30 (2009) 583–588. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.006.

- [79] J. Venugopal, S. Low, A.T. Choon, T.S. Sampath Kumar, S. Ramakrishna, Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 2039–2046. doi:10.1007/s10856-007-3289-x.
- [80] A. Timnak, F. Yousefi Gharebaghi, R. Pajoum Shariati, S.H. Bahrami, S. Javadian, S. Hojjati Emami, et al., Fabrication of nano-structured electrospun collagen scaffold intended for nerve tissue engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 1555–1567. doi:10.1007/s10856-011-4316-5.
- [81] D.G. Simpson, B.S. Jha, C.E. Ayres, J.R. Bowman, T.A. Telemeco, S.A. Sell, et al., Electrospun collagen: A tissue engineering scaffold with unique functional properties in a wide variety of applications, *J. Nanomater.* 2011 (2011). doi:10.1155/2011/348268.
- [82] J. Rnjak-Kovacina, S.G. Wise, Z. Li, P.K.M. Maitz, C.J. Young, Y. Wang, et al., Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering, *Biomaterials.* 32 (2011) 6729–6736. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.065.
- [83] M. Li, M.J. Mondrinos, M.R. Gandhi, F.K. Ko, A.S. Weiss, P.I. Lelkes, Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials.* 26 (2005) 5999–6008. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.030.
- [84] K.A. McKenna, M.T. Hinds, R.C. Sarao, P.C. Wu, C.L. Maslen, R.W. Glanville, et al., Mechanical property characterization of electrospun recombinant human tropoelastin for vascular graft biomaterials, *Acta Biomater.* 8 (2012) 225–233. doi:10.1016/j.actbio.2011.08.001.
- [85] M. McManus, E. Boland, S. Sell, W. Bowen, H. Koo, D. Simpson, et al., Electrospun nanofibre fibrinogen for urinary tract tissue reconstruction., *Biomed. Mater.* 2 (2007) 257–262. doi:10.1088/1748-6041/2/4/008.
- [86] S.A. Sell, M.P. Francis, K. Garg, M.J. McClure, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Cross-linking methods of electrospun fibrinogen scaffolds for tissue engineering applications., *Biomed. Mater.* 3 (2008) 045001. doi:10.1088/1748-6041/3/4/045001.

- [87] M.C. McManus, E.D. Boland, D.G. Simpson, C.P. Barnes, G.L. Bowlin, Electrospun fibrinogen: Feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 81 (2007) 299–309. doi:10.1002/jbm.a.30989.
- [88] H. Liu, X. Li, G. Zhou, H. Fan, Y. Fan, Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering, *Biomaterials*. 32 (2011) 3784–3793. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.002.
- [89] C.R. Wittmer, T. Claudepierre, M. Reber, P. Wiedemann, J.A. Garlick, D. Kaplan, et al., Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in central nervous system., *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 4202. doi:10.1002/adfm.201190103.
- [90] L. Soffer, X. Wang, X. Zhang, J. Kluge, L. Dorfmann, D.L. Kaplan, et al., Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 19 (2008) 653–664. doi:10.1163/156856208784089607.
- [91] X. Zhang, M.R. Reagan, D.L. Kaplan, Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 988–1006. doi:10.1016/j.addr.2009.07.005.
- [92] S.I. Jeong, O. Jeon, M.D. Krebs, M.C. Hill, E. Alsberg, Biodegradable photocrosslinked alginate nanofibre scaffolds with tuneable physical properties, cell adhesivity and growth factor release., *Eur. Cell. Mater.* 24 (2012) 331–43.
- [93] S.I. Jeong, M.D. Krebs, C.A. Bonino, S.A. Khan, E. Alsberg, Electrospun alginate nanofibers with controlled cell adhesion for tissue engineering, *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 934–943. doi:10.1002/mabi.201000046.
- [94] Y.M. Kolambkar, K.M. Dupont, J.D. Boerckel, N. Huebsch, D.J. Mooney, D.W. Huttmacher, et al., An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects, *Biomaterials*. 32 (2011) 65–74. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.074.
- [95] Y. Zhang, J.R. Venugopal, A. El-Turki, S. Ramakrishna, B. Su, C.T. Lim, Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for

- bone tissue engineering, *Biomaterials*. 29 (2008) 4314–4322. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.038.
- [96] H. Peng, Z. Yin, H. Liu, X. Chen, B. Feng, H. Yuan, et al., Electrospun biomimetic scaffold of hydroxyapatite/chitosan supports enhanced osteogenic differentiation of mMSCs., *Nanotechnology*. 23 (2012) 485102. doi:10.1088/0957-4484/23/48/485102.
- [97] S.I. Jeong, M.D. Krebs, C.A. Bonino, J.E. Samorezov, S.A. Khan, E. Alsberg, Electrospun chitosan-alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds., *Tissue Eng. Part A*. 17 (2011) 59–70. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0086.
- [98] Y. Ji, K. Ghosh, B. Li, J.C. Sokolov, R.A.F. Clark, M.H. Rafailovich, Dual-syringe reactive electrospinning of cross-linked hyaluronic acid hydrogel nanofibers for tissue engineering applications, *Macromol. Biosci*. 6 (2006) 811–817. doi:10.1002/mabi.200600132.
- [99] Y. Ji, K. Ghosh, X.Z. Shu, B. Li, J.C. Sokolov, G.D. Prestwich, et al., Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds, *Biomaterials*. 27 (2006) 3782–3792. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.037.
- [100] C.R. Reed, L. Han, A. Andrady, M. Caballero, M.C. Jack, J.B. Collins, et al., Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds., *Ann. Plast. Surg*. 62 (2009) 505–512. doi:10.1097/SAP.0b013e31818e48bf.
- [101] A. Balguid, A. Mol, M.H. van Marion, R.A. Bank, C.V.C. Bouten, F.P.T. Baaijens, Tailoring fiber diameter in electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for optimal cellular infiltration in cardiovascular tissue engineering., *Tissue Eng. Part A*. 15 (2009) 437–444. doi:10.1089/ten.tea.2007.0294.
- [102] Y.Z. Cai, L.L. Wang, H.X. Cai, Y.Y. Qi, X.H. Zou, H.W. Ouyang, Electrospun nanofibrous matrix improves the regeneration of dense cortical bone, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 95 (2010) 49–57. doi:10.1002/jbm.a.32816.
- [103] S.I. Jeong, E.K. Ko, J. Yum, C.H. Jung, Y.M. Lee, H. Shin, Nanofibrous poly(lactic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration, *Macromol. Biosci*. 8 (2008) 328–338. doi:10.1002/mabi.200700107.

- [104] H.S. Koh, T. Yong, W.E. Teo, C.K. Chan, M.E. Puhaindran, T.C. Tan, et al., *In vivo* study of novel nanofibrous intra-luminal guidance channels to promote nerve regeneration., *J. Neural Eng.* 7 (2010) 046003. doi:10.1088/1741-2560/7/4/046003.
- [105] G. Wang, X. Hu, W. Lin, C. Dong, H. Wu, Electrospun PLGA-silk fibroin-collagen nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 47 (2011) 234–240. doi:10.1007/s11626-010-9381-4.
- [106] Z.G. Chen, P.W. Wang, B. Wei, X.M. Mo, F.Z. Cui, Electrospun collagen-chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell, *Acta Biomater.* 6 (2010) 372–382. doi:10.1016/j.actbio.2009.07.024.
- [107] M.C. Phipps, W.C. Clem, J.M. Grunda, G.A. Clines, S.L. Bellis, Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration, *Biomaterials.* 33 (2012) 524–534. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.080.
- [108] J. Lee, J.J. Yoo, A. Atala, S.J. Lee, The effect of controlled release of PDGF-BB from heparin-conjugated electrospun PCL/gelatin scaffolds on cellular bioactivity and infiltration, *Biomaterials.* 33 (2012) 6709–6720. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.017.
- [109] W.-J. Li, K.G. Danielson, P.G. Alexander, R.S. Tuan, Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 67 (2003) 1105–1114. doi:10.1002/jbm.a.10101.
- [110] W.-J.W.-J. Li, R. Tuli, C. Okafor, A. Derfoul, K.G.K.G. Danielson, D.J.D.J. Hall, et al., A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells., *Biomaterials.* 26 (2005) 599–609. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.005.
- [111] Y. Zhang, F. Yang, K. Liu, H. Shen, Y. Zhu, W. Zhang, et al., The impact of PLGA scaffold orientation on *in vitro* cartilage regeneration, *Biomaterials.* 33 (2012) 2926–2935. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.006.
- [112] W.J. Li, R. Tuli, C. Okafor, A. Derfoul, K.G. Danielson, D.J. Hall, et al., A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human

- mesenchymal stem cells, *Biomaterials*. 26 (2005) 599–609. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.005.
- [113] M. P Prabhakaran, D. Kai, L. Ghasemi-Mobarakeh, S. Ramakrishna, Electrospun biocomposite nanofibrous patch for cardiac tissue engineering, *Biomed. Mater.* 6 (2011) 055001. doi:10.1088/1748-6041/6/5/055001.
- [114] C. Shi, Q. Li, Y. Zhao, W. Chen, B. Chen, Z. Xiao, et al., Stem-cell-capturing collagen scaffold promotes cardiac tissue regeneration, *Biomaterials*. 32 (2011) 2508–2515. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.026.
- [115] D. Kai, M.P. Prabhakaran, G. Jin, S. Ramakrishna, Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 98 B (2011) 379–386. doi:10.1002/jbm.b.31862.
- [116] D. Kai, M.P. Prabhakaran, G. Jin, S. Ramakrishna, Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 99 A (2011) 376–385. doi:10.1002/jbm.a.33200.
- [117] M. Kharaziha, M. Nikkhah, S.R. Shin, N. Annabi, N. Masoumi, A.K. Gaharwar, et al., PGS:Gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering cardiac tissues, *Biomaterials*. 34 (2013) 6355–6366. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.045.
- [118] L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.-H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna, Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering., *Biomaterials*. 29 (2008) 4532–4539. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.08.007.
- [119] W. Ji, Y. Sun, F. Yang, J.J.J.P. Van Den Beucken, M. Fan, Z. Chen, et al., Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications, *Pharm. Res.* 28 (2011) 1259–1272. doi:10.1007/s11095-010-0320-6.
- [120] L.B. Hejazian, B. Esmaeilzade, F. Moghanni Ghoroghi, F. Moradi, M.B. Hejazian, A. Aslani, et al., The role of biodegradable engineered nanofiber scaffolds seeded with hair follicle stem cells for tissue engineering., *Iran. Biomed. J.* 16 (2012) 193–201. doi:10.6091/ibj.1074.2012.

- [121] N. Navarro-Alvarez, A. Soto-Gutierrez, Y. Chen, J. Caballero-Corbalan, W. Hassan, S. Kobayashi, et al., Intramuscular transplantation of engineered hepatic tissue constructs corrects acute and chronic liver failure in mice, *J. Hepatol.* 52 (2010) 211–219. doi:10.1016/j.jhep.2009.11.019.
- [122] M. Ghaedi, M. Soleimani, I. Shabani, Y. Duan, A.S. Lotfi, Hepatic differentiation from human mesenchymal stem cells on a novel nanofiber scaffold, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 17 (2012) 89–106. doi:10.2478/s11658-011-0040-x.
- [123] M.C. McManus, S.A. Sell, W.C. Bowen, H.P. Koo, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Electrospun Fibrinogen-Polydioxanone Composite Matrix: Potential for In Situ Urologic Tissue Engineering, *J. Eng. Fiber. Fabr.* 3 (2008) 10.
- [124] J.S. Choi, S.J. Lee, G.J. Christ, A. Atala, J.J. Yoo, The influence of electrospun aligned poly( $\epsilon$ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes, *Biomaterials.* 29 (2008) 2899–2906. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.031.
- [125] R. Hashizume, K.L. Fujimoto, Y. Hong, N.J. Amoroso, K. Tobita, T. Miki, et al., Morphological and mechanical characteristics of the reconstructed rat abdominal wall following use of a wet electrospun biodegradable polyurethane elastomer scaffold, *Biomaterials.* 31 (2010) 3253–3265. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.051.
- [126] S.G. Kumbar, R. James, S.P. Nukavarapu, C.T. Laurencin, Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues., *Biomed. Mater.* 3 (2008) 034002. doi:10.1088/1748-6041/3/3/034002.
- [127] V. Holan, A. Zajicova, A. Lencova, K. Pokorna, E. Svobodova, M. Krulova, Treatment of ocular surface injuries by the transfer of limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofibrous scaffolds, *Acta Ophthalmol.* 87 (2009) 0.
- [128] A. Zajicova, K. Pokorna, A. Lencova, M. Krulova, E. Svobodova, S. Kubinova, et al., Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds., *Cell Transplant.* 19 (2010) 1281–1290. doi:10.3727/096368910X509040.

- [129] V. Holan, E. Javorkova, Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction., *Stem Cell Rev.* 9 (2013) 609–19. doi:10.1007/s12015-013-9449-0.
- [130] I. Rezaeian, P. Zahedi, S.O. Ranaei-Siadat, S.H. Jafari, P. Supaphol, A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages, *Polym. Adv. Technol.* 21 (2010) 77–95. doi:10.1002/pat.1625.
- [131] H.M. Powell, D.M. Supp, S.T. Boyce, Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes, *Biomaterials.* 29 (2008) 834–843. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.036.
- [132] K.S. Rho, L. Jeong, G. Lee, B.M. Seo, Y.J. Park, S.D. Hong, et al., Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials.* 27 (2006) 1452–1461. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.08.004.
- [133] P. o. Rujitanaroj, N. Pimpha, P. Supaphol, Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles, *Polymer (Guildf).* 49 (2008) 4723–4732. doi:10.1016/j.polymer.2008.08.021.
- [134] A.A. Dongargaonkar, G.L. Bowlin, H. Yang, Electrospun blends of gelatin and gelatin-dendrimer conjugates as a wound-dressing and drug-delivery platform, *Biomacromolecules.* 14 (2013) 4038–4045. doi:10.1021/bm401143p.
- [135] R. Uppal, G.N. Ramaswamy, C. Arnold, R. Goodband, Y. Wang, Hyaluronic acid nanofiber wound dressing--production, characterization, and in vivo behavior., *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 97 (2011) 20–29. doi:10.1002/jbm.b.31776.
- [136] R. Uppal, G.N. Ramaswamy, C. Arnold, R. Goodband, Y. Wang, Hyaluronic acid nanofiber wound dressing-production, characterization, and in vivo behavior, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 97 B (2011) 20–29. doi:10.1002/jbm.b.31776.
- [137] S. Kondo, Y. Kuroyanagi, Development of a Wound Dressing Composed of Hyaluronic Acid and Collagen Sponge with Epidermal Growth Factor, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 23 (2012) 629–643. doi:10.1163/092050611X555687.



- [138] J. Lin, C. Li, Y. Zhao, J. Hu, L.-M. Zhang, Co-electrospun nanofibrous membranes of collagen and zein for wound healing., *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 4 (2012) 1050–7. doi:10.1021/am201669z.
- [139] S. Xu, J. Li, A. He, W. Liu, X. Jiang, J. Zheng, et al., Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes, *Polymer (Guildf)*. 50 (2009) 3762–3769. doi:10.1016/j.polymer.2009.06.009.
- [140] M.-S. Khil, D.-I. Cha, H.-Y. Kim, I.-S. Kim, N. Bhattarai, Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing., *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater*. 67 (2003) 675–679. doi:10.1002/jbm.b.10058.
- [141] L. Lakshman, K.T. Shalumon, S. Nair, R. Jayakumar, S. V Nair, Preparation of Silver Nanoparticles Incorporated Electrospun Polyurethane Nano-fibrous Mat for Wound Dressing, *J. Macromol. Sci. Part A*. 47 (2010) 1012–1018. doi:10.1080/10601325.2010.508001.
- [142] A. Toncheva, D. Paneva, N. Manolova, I. Rashkov, Electrospun poly(L-lactide) membranes containing a single drug or multiple drug system for antimicrobial wound dressings, *Macromol. Res*. 19 (2011) 1310–1319. doi:10.1007/s13233-011-1206-0.
- [143] R. Thakur, C. Florek, J. Kohn, B.B. Michniak, Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing., *Int. J. Pharm*. 364 (2008) 87–93. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.033.
- [144] E.J. Chong, T.T. Phan, I.J. Lim, Y.Z. Zhang, B.H. Bay, S. Ramakrishna, et al., Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution, *Acta Biomater*. 3 (2007) 321–330. doi:10.1016/j.actbio.2007.01.002.
- [145] S.Y. Gu, Z.M. Wang, J. Ren, C.Y. Zhang, Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(l-lactide) blend and its characteristics for wound dressing, *Mater. Sci. Eng. C*. 29 (2009) 1822–1828. doi:10.1016/j.msec.2009.02.010.
- [146] S.J. Liu, Y.C. Kau, C.Y. Chou, J.K. Chen, R.C. Wu, W.L. Yeh, Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing, *J. Memb. Sci*. 355 (2010) 53–59. doi:10.1016/j.memsci.2010.03.012.

- [147] D.W. Chen, Y.-H. Hsu, J.-Y. Liao, S.-J. Liu, J.-K. Chen, S.W.-N. Ueng, Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes., *Int. J. Pharm.* 430 (2012) 335–41. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.010.
- [148] R. Qi, R. Guo, F. Zheng, H. Liu, J. Yu, X. Shi, Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 110 (2013) 148–55. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.04.036.
- [149] L. Chen, L. Bromberg, T.A. Hatton, G.C. Rutledge, Electrospun cellulose acetate fibers containing chlorhexidine as a bactericide, *Polymer (Guildf).* 49 (2008) 1266–1275. doi:10.1016/j.polymer.2008.01.003.
- [150] X. Xu, M. Zhou, Antimicrobial gelatin nanofibers containing silver nanoparticles, *Fibers Polym.* 9 (2008) 685–690. doi:10.1007/s12221-008-0108-z.
- [151] Z. Ma, H. Ji, D. Tan, Y. Teng, G. Dong, J. Zhou, et al., Silver nanoparticles decorated, flexible SiO<sub>2</sub> nanofibers with long-term antibacterial effect as reusable wound cover, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 387 (2011) 57–64. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.07.025.
- [152] Y. Matsumoto, Y. Kuroyanagi, Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21 (2010) 715–726. doi:10.1163/156856209X444394.
- [153] O. Suwantong, U. Ruktanonchai, P. Supaphol, Electrospun cellulose acetate fiber mats containing asiaticoside or *Centella asiatica* crude extract and the release characteristics of asiaticoside, *Polymer (Guildf).* 49 (2008) 4239–4247. doi:10.1016/j.polymer.2008.07.020.
- [154] K.N. Kontogiannopoulos, A.N. Assimopoulou, I. Tsivintzelis, C. Panayiotou, V.P. Papageorgiou, Electrospun fiber mats containing shikonin and derivatives with potential biomedical applications., *Int. J. Pharm.* 409 (2011) 216–28. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.004.
- [155] N. Charernsriwilaiwat, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, M. Sukma, P. Opanasopit, Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts., *Int. J. Pharm.* 452 (2013) 333–43. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.012.

- [156] G. Jin, M.P. Prabhakaran, D. Kai, S.K. Annamalai, K.D. Arunachalam, S. Ramakrishna, Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing, *Biomaterials*. 34 (2013) 724–734. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.026.
- [157] E. a T. Vargas, N.C. do Vale Baracho, J. de Brito, a a a de Queiroz, Hyperbranched polyglycerol electrospun nanofibers for wound dressing applications., *Acta Biomater*. 6 (2010) 1069–78. doi:10.1016/j.actbio.2009.09.018.
- [158] J.G. Merrell, S.W. McLaughlin, L. Tie, C.T. Laurencin, A.F. Chen, L.S. Nair, Curcumin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanofibres: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 36 (2009) 1149–1156. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05216.x.
- [159] S. Liao, C.K. Chan, S. Ramakrishna, Electrospun nanofibers: Work for medicine?, *Front. Mater. Sci. China*. 4 (2010) 29–33. doi:10.1007/s11706-010-0009-0.
- [160] P. López-Jaramillo, M.Y. Rincón, R.G. García, S.Y. Silva, E. Smith, P. Kampeerapappun, et al., A controlled, randomized-blinded clinical trial to assess the efficacy of a nitric oxide releasing patch in the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (V.) panamensis*., *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 83 (2010) 97–101. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0287.
- [161] S.Y. Silva, L.C. Rueda, G.A. Márquez, M. López, D.J. Smith, C.A. Calderón, et al., Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial for the treatment of diabetic foot ulcers, using a nitric oxide releasing patch: PATHON., *Trials*. 8 (2007) 26. doi:10.1186/1745-6215-8-26.
- [162] S.Y. Silva, L.C. Rueda, M. López, I.D. Vélez, C.F. Rueda-Clausen, D.J. Smith, et al., Double blind, randomized controlled trial, to evaluate the effectiveness of a controlled nitric oxide releasing patch versus meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis [NCT00317629]., *Trials*. 7 (2006) 14. doi:10.1186/1745-6215-7-14.
- [163] E.R. Kenawy, G.L. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, D.G. Simpson, E.H. Sanders, et al., Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend, *J. Control. Release*. 81 (2002) 57–64. doi:10.1016/S0168-3659(02)00041-X.

- [164] R. Srikar, A.L. Yarin, C.M. Megaridis, A. V Bazilevsky, E. Kelley, Desorption-limited mechanism of release from polymer nanofibers., *Langmuir*. 24 (2008) 965–974. doi:10.1021/la702449k.
- [165] X. Li, H. Zhang, H. Li, G. Tang, Y. Zhao, X. Yuan, Self-accelerated biodegradation of electrospun poly(ethylene glycol)–poly(l-lactide) membranes by loading proteinase K, *Polym. Degrad. Stab.* 93 (2008) 618–626. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2008.01.003.
- [166] J. Zeng, L. Yang, Q. Liang, X. Zhang, H. Guan, X. Xu, et al., Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation., *J. Control. Release.* 105 (2005) 43–51. doi:10.1016/j.jconrel.2005.02.024.
- [167] T. Okuda, K. Tominaga, S. Kidoaki, Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes, *J. Control. Release.* 143 (2010) 258–264. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.029.
- [168] L.-Y. Huang, C. Branford-White, X.-X. Shen, D.-G. Yu, L.-M. Zhu, Time-engineered biphasic drug release by electrospun nanofiber meshes., *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 88–96. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.058.
- [169] X. Shen, D. Yu, L. Zhu, C. Branford-White, K. White, N.P. Chatterton, Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit® L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery., *Int. J. Pharm.* 408 (2011) 200–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.058.
- [170] M. Wang, L. Wang, Y. Huang, Electrospun hydroxypropyl methyl cellulose phthalate (HPMCP)/erythromycin fibers for targeted release in intestine, *J. Appl. Polym. Sci.* 106 (2007) 2177–2184. doi:10.1002/app.25666.
- [171] C. Huang, S.J. Soenen, E. van Gulck, G. Vanham, J. Rejman, S. Van Calenbergh, et al., Electrospun cellulose acetate phthalate fibers for semen induced anti-HIV vaginal drug delivery., *Biomaterials.* 33 (2012) 962–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.004.
- [172] J. Sirc, S. Kubinova, R. Hobzova, D. Stranska, P. Kozlik, Z. Bosakova, et al., Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous

- structures of various thicknesses., *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 5315–25. doi:10.2147/IJN.S35781.
- [173] A.P.S. Immich, M.L. Arias, N. Carreras, R.L. Boemo, J.A. Tornero, Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen., *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33 (2013) 4002–8. doi:10.1016/j.msec.2013.05.034.
- [174] T.L. Downing, A. Wang, Z.-Q. Yan, Y. Nout, A.L. Lee, M.S. Beattie, et al., Drug-eluting microfibrinous patches for the local delivery of rolipram in spinal cord repair., *J. Control. Release*. 161 (2012) 910–7. doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.034.
- [175] C.G. Park, E. Kim, M. Park, J.H. Park, Y. Bin Choy, A nanofibrous sheet-based system for linear delivery of nifedipine, *J. Control. Release*. 149 (2011) 250–257. doi:10.1016/j.jconrel.2010.10.023.
- [176] Y. Wang, B. Wang, W. Qiao, T. Yin, A novel controlled release drug delivery system for multiple drugs based on electrospun nanofibers containing nanoparticles., *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 4805–4811. doi:10.1002/jps.
- [177] M. Beck-Broichsitter, M. Thieme, J. Nguyen, T. Schmehl, T. Gessler, W. Seeger, et al., Novel “nano in nano” composites for sustained drug delivery: biodegradable nanoparticles encapsulated into nanofiber non-wovens., *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 1527–1535. doi:10.1002/mabi.201000100.
- [178] D.-G. Yu, X.-X. Shen, C. Branford-White, K. White, L.-M. Zhu, S.W.A. Bligh, Oral fast-dissolving drug delivery membranes prepared from electrospun polyvinylpyrrolidone ultrafine fibers., *Nanotechnology*. 20 (2009) 055104. doi:10.1088/0957-4484/20/5/055104.
- [179] D.-G. Yu, L.-D. Gao, K. White, C. Branford-White, W.-Y. Lu, L.-M. Zhu, Multicomponent amorphous nanofibers electrospun from hot aqueous solutions of a poorly soluble drug., *Pharm. Res.* 27 (2010) 2466–77. doi:10.1007/s11095-010-0239-y.
- [180] D.-G. Yu, C. Branford-White, K. White, X.-L. Li, L.-M. Zhu, Dissolution improvement of electrospun nanofiber-based solid dispersions for acetaminophen., *AAPS PharmSciTech.* 11 (2010) 809–17. doi:10.1208/s12249-010-9438-4.

- [181] G. Verreck, I. Chun, J. Rosenblatt, J. Peeters, A. Van Dijck, J. Mensch, et al., Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer, *J. Control. Release.* 92 (2003) 349–360. doi:10.1016/S0168-3659(03)00342-0.
- [182] F. Ignatious, L. Sun, C.-P. Lee, J. Baldoni, Electrospun nanofibers in oral drug delivery., *Pharm. Res.* 27 (2010) 576–88. doi:10.1007/s11095-010-0061-6.
- [183] Z.K. Nagy, A. Balogh, G. Drávavölgyi, J. Ferguson, H. Pataki, B. Vajna, et al., Solvent-free melt electrospinning for preparation of fast dissolving drug delivery system and comparison with solvent-based electrospun and melt extruded systems., *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 508–17. doi:10.1002/jps.23374.
- [184] Z.K. Nagy, A. Balogh, B. Vajna, A. Farkas, G. Patyi, A. Kramarics, et al., Comparison of electrospun and extruded Soluplus®-based solid dosage forms of improved dissolution., *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 322–32. doi:10.1002/jps.22731.
- [185] E. Merisko-Liversidge, G.G. Liversidge, E.R. Cooper, Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 113–120. doi:10.1016/S0928-0987(02)00251-8.
- [186] N.J. Babu, A. Nangia, Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals, *Cryst. Growth Des.* 11 (2011) 2662–2679. doi:10.1021/cg200492w.
- [187] K. Karthikeyan, S. Guhathakarta, R. Rajaram, P.S. Korrapati, Electrospun zein/eudragit nanofibers based dual drug delivery system for the simultaneous delivery of aceclofenac and pantoprazole., *Int. J. Pharm.* 438 (2012) 117–22. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.07.075.
- [188] M. V Natu, H.C. de Sousa, M.H. Gil, Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers., *Int. J. Pharm.* 397 (2010) 50–8. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.045.
- [189] D.-G. Yu, C. Branford-White, L. Li, X.-M. Wu, L.-M. Zhu, The compatibility of acyclovir with polyacrylonitrile in the electrospun drug-loaded nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.* (2010) NA–NA. doi:10.1002/app.32019.

- [190] C. Ball, E. Krogstad, T. Chaowanachan, K. a Woodrow, Drug-eluting fibers for HIV-1 inhibition and contraception., *PLoS One*. 7 (2012) e49792. doi:10.1371/journal.pone.0049792.
- [191] A.-C. Vega-Lugo, L.-T. Lim, Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers, *Food Res. Int.* 42 (2009) 933–940. doi:10.1016/j.foodres.2009.05.005.
- [192] G. Buschle-Diller, J. Cooper, Z. Xie, Y. Wu, J. Waldrup, X. Ren, Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers, *Cellulose*. 14 (2007) 553–562. doi:10.1007/s10570-007-9183-3.
- [193] E. Valarezo, L. Tammaro, S. González, O. Malagón, V. Vittoria, Fabrication and sustained release properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers loaded with layered double hydroxide nanoparticles intercalated with amoxicillin, *Appl. Clay Sci.* 72 (2013) 104–109. doi:10.1016/j.clay.2012.12.006.
- [194] M.M. Castillo-Ortega, a. Nájera-Luna, D.E. Rodríguez-Félix, J.C. Encinas, F. Rodríguez-Félix, J. Romero, et al., Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011) 1772–1778. doi:10.1016/j.msec.2011.08.009.
- [195] C.B. Weldon, J.H. Tsui, S. a Shankarappa, V.T. Nguyen, M. Ma, D.G. Anderson, et al., Electrospun drug-eluting sutures for local anesthesia., *J. Control. Release*. 161 (2012) 903–9. doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.021.
- [196] K. Kim, Y.K. Luu, C. Chang, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu, et al., Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds, *J. Control. Release*. 98 (2004) 47–56. doi:10.1016/j.jconrel.2004.04.009.
- [197] M. Jannesari, J. Varshosaz, M. Morshed, M. Zamani, Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs., *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 993–1003. doi:10.2147/IJN.S17595.
- [198] A.R. Unnithan, N.A.M. Barakat, P.B. Tirupathi Pichiah, G. Gnanasekaran, R. Nirmala, Y.S. Cha, et al., Wound-dressing materials with antibacterial activity

- from electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1786–1793. doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.071.
- [199] V. Holan, M. Chudickova, P. Trosan, E. Svobodova, M. Krulova, S. Kubinova, et al., Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression., *J. Control. Release.* 156 (2011) 406–12. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.022.
- [200] A. Martins, A.R.C. Duarte, S. Faria, A.P. Marques, R.L. Reis, N.M. Neves, Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality., *Biomaterials.* 31 (2010) 5875–5885. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.010.
- [201] H. Maleki, A.A. Gharehaghaji, P.J. Dijkstra, A novel honey-based nanofibrous scaffold for wound dressing application, *J. Appl. Polym. Sci.* 127 (2013) 4086–4092. doi:10.1002/app.37601.
- [202] D. Liu, S. Liu, X. Jing, X. Li, W. Li, Y. Huang, Necrosis of cervical carcinoma by dichloroacetate released from electrospun polylactide mats., *Biomaterials.* 33 (2012) 4362–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.062.
- [203] P. Taepaiboon, U. Rungsardthong, P. Supaphol, Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs, *Nanotechnology.* 17 (2006) 2317–2329. doi:10.1088/0957-4484/17/9/041.
- [204] P. Vrbata, P. Berka, D. Stránská, P. Doležal, M. Lázníček, Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption., *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 407–13. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.017.
- [205] Z.K. Nagy, Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of Donepezil HCl, *eXPRESS Polym. Lett.* 4 (2010) 763–772. doi:10.3144/expresspolymlett.2010.92.
- [206] X. Xu, L. Yang, X. Xu, X. Wang, X. Chen, Q. Liang, et al., Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions., *J. Control. Release.* 108 (2005) 33–42. doi:10.1016/j.jconrel.2005.07.021.



- [207] X. Xu, X. Chen, Z. Wang, X. Jing, Ultrafine PEG-PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro cytotoxicity., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 18–25. doi:10.1016/j.ejpb.2008.10.015.
- [208] B. Motealleh, P. Zahedi, I. Rezaeian, M. Moghimi, A.H. Abdolghaffari, M.A. Zarandi, Morphology, drug release, antibacterial, cell proliferation, and histology studies of chamomile-loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly( $\epsilon$ -caprolactone)/polystyrene blends, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 102 (2014) 977–987. doi:10.1002/jbm.b.33078.
- [209] Z.X. Meng, X.X. Xu, W. Zheng, H.M. Zhou, L. Li, Y.F. Zheng, et al., Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 84 (2011) 97–102. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.12.022.
- [210] Z.M. Huang, C.L. He, A. Yang, Y. Zhang, X.J. Han, J. Yin, et al., Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 77 (2006) 169–179. doi:10.1002/jbm.a.30564.
- [211] A. Fathi-Azarbayjani, S.Y. Chan, Single and multi-layered nanofibers for rapid and controlled drug delivery., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 58 (2010) 143–6.
- [212] C. Xie, X. Li, X. Luo, Y. Yang, W. Cui, J. Zou, et al., Release modulation and cytotoxicity of hydroxycamptothecin-loaded electrospun fibers with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inoculations, *Int. J. Pharm.* 391 (2010) 55–64. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.02.016.
- [213] S. Tungprapa, I. Jangchud, P. Supaphol, Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats, *Polymer (Guildf).* 48 (2007) 5030–5041. doi:10.1016/j.polymer.2007.06.061.
- [214] D.-G. Yu, X.-F. Zhang, X.-X. Shen, C. Brandford-White, L.-M. Zhu, Ultrafine ibuprofen-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats using electrospinning, *Polym. Int.* 58 (2009) 1010–1013. doi:10.1002/pi.2629.
- [215] I. Cantón, R. Mckean, M. Charnley, K.A. Blackwood, C. Fiorica, A.J. Ryan, et al., Development of an Ibuprofen-releasing biodegradable PLA/PGA electrospun scaffold for tissue regeneration., *Biotechnol. Bioeng.* 105 (2010) 396–408. doi:10.1002/bit.22530.

- [216] C. Hu, S. Liu, Y. Zhang, B. Li, H. Yang, C. Fan, et al., Long-term drug release from electrospun fibers for *in vivo* inflammation prevention in the prevention of peritendinous adhesions., *Acta Biomater.* 9 (2013) 7381–8. doi:10.1016/j.actbio.2013.03.040.
- [217] C. Hu, W. Cui, Hierarchical structure of electrospun composite fibers for long-term controlled drug release carriers., *Adv. Healthc. Mater.* 1 (2012) 809–14. doi:10.1002/adhm.201200146.
- [218] V. Pornsopone, P. Supaphol, R. Rangkupan, S. Tantayanon, Electrospun Methacrylate-Based Copolymer/Indomethacin Fibers and Their Release Characteristics of Indomethacin, *J. Polym. Res.* 14 (2006) 53–59. doi:10.1007/s10965-006-9080-8.
- [219] S.T. Yohe, V.L.M. Herrera, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, 3D superhydrophobic electrospun meshes as reinforcement materials for sustained local drug delivery against colorectal cancer cells., *J. Control. Release.* 162 (2012) 92–101. doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.047.
- [220] D. Yang, Y. Li, J. Nie, Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 538–543. doi:10.1016/j.carbpol.2007.01.008.
- [221] E.-R. Kenawy, F.I. Abdel-Hay, M.H. El-Newehy, G.E. Wnek, Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems, *Mater. Chem. Phys.* 113 (2009) 296–302. doi:10.1016/j.matchemphys.2008.07.081.
- [222] E.R. Kenawy, F.I. Abdel-Hay, M.H. El-Newehy, G.E. Wnek, Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers, *Mater. Sci. Eng. A.* 459 (2007) 390–396. doi:10.1016/j.msea.2007.01.039.
- [223] Y.N. Jiang, H.Y. Mo, D.G. Yu, Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release, *Int. J. Pharm.* 438 (2012) 232–239. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.053.
- [224] A. Wei, J. Wang, X. Wang, Q. Wei, M. Ge, D. Hou, Preparation and characterization of the electrospun nanofibers loaded with clarithromycin, *J. Appl. Polym. Sci.* 118 (2010) 346–352. doi:10.1002/app.32363.

- [225] X. Li, M. a Kanjwal, L. Lin, I.S. Chronakis, Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 103 (2013) 182–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.016.
- [226] O. Suwanton, P. Opanasopit, U. Ruktanonchai, P. Supaphol, Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance, *Polymer (Guildf).* 48 (2007) 7546–7557. doi:10.1016/j.polymer.2007.11.019.
- [227] D.-G. Yu, J.-M. Yang, C. Branford-White, P. Lu, L. Zhang, L.-M. Zhu, Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers., *Int. J. Pharm.* 400 (2010) 158–64. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.08.010.
- [228] S.S. Said, A.K. Aloufy, O.M. El-Halfawy, N.A. Boraie, L.K. El-Khordagui, Antimicrobial PLGA ultrafine fibers: Interaction with wound bacteria, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2011) 108–118. doi:10.1016/j.ejpb.2011.03.002.
- [229] D. Puppi, A.M. Piras, N. Detta, D. Dinucci, F. Chiellini, Poly(lactic-co-glycolic acid) electrospun fibrous meshes for the controlled release of retinoic acid, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1258–1268. doi:10.1016/j.actbio.2009.08.015.
- [230] U.E. Illangakoon, T. Nazir, G.R. Williams, N.P. Chatterton, Mebeverine-loaded electrospun nanofibers: physicochemical characterization and dissolution studies., *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 283–92. doi:10.1002/jps.23759.
- [231] M. Zamani, M. Morshed, J. Varshosaz, M. Jannesari, Controlled release of metronidazole benzoate from poly epsilon-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75 (2010) 179–85. doi:10.1016/j.ejpb.2010.02.002.
- [232] M. Reise, R. Wyrwa, U. Müller, M. Zylinski, A. Völpel, M. Schnabelrauch, et al., Release of metronidazole from electrospun poly(L-lactide-co-D/L-lactide) fibers for local periodontitis treatment., *Dent. Mater.* 28 (2012) 179–88. doi:10.1016/j.dental.2011.12.006.
- [233] X. Wu, C.J. Branford-White, L. Zhu, N.P. Chatterton, D. Yu, Ester prodrug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats as transdermal drug delivery systems., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2403–2411. doi:10.1007/s10856-010-4100-y.

- [234] P. Vrbata, P. Berka, D. Stránská, P. Doležal, M. Musilová, L. Čížinská, Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen., *Int. J. Pharm.* 457 (2013) 168–76. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.085.
- [235] M.F. Canbolat, A. Celebioglu, T. Uyar, Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 115 (2014) 15–21. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.11.021.
- [236] D.C. Aduba, J. a Hammer, Q. Yuan, W.A. Yeudall, G.L. Bowlin, H. Yang, Semi-interpenetrating network (sIPN) gelatin nanofiber scaffolds for oral mucosal drug delivery., *Acta Biomater.* 9 (2013) 6576–84. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.006.
- [237] G. Ma, Y. Liu, C. Peng, D. Fang, B. He, J. Nie, Paclitaxel loaded electrospun porous nanofibers as mat potential application for chemotherapy against prostate cancer, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 505–512. doi:10.1016/j.carbpol.2011.04.082.
- [238] Y. Zhu, C. Hu, B. Li, H. Yang, Y. Cheng, W. Cui, A highly flexible paclitaxel-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibrous-membrane-covered stent for benign cardia stricture, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8328–8336. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.004.
- [239] W. Cui, X. Li, X. Zhu, G. Yu, S. Zhou, J. Weng, Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly(DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation., *Biomacromolecules*. 7 (2006) 1623–1629. doi:10.1021/bm060057z.
- [240] W. Cui, M. Qi, X. Li, S. Huang, S. Zhou, J. Weng, Electrospun fibers of acid-labile biodegradable polymers with acetal groups as potential drug carriers., *Int. J. Pharm.* 361 (2008) 47–55. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.05.005.
- [241] M. Qi, X. Li, Y. Yang, S. Zhou, Electrospun fibers of acid-labile biodegradable polymers containing ortho ester groups for controlled release of paracetamol., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 445–52. doi:10.1016/j.ejpb.2008.05.003.
- [242] S. Shao, L. Li, G. Yang, J. Li, C. Luo, T. Gong, et al., Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers., *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 310–20. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.033.

- [243] J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, et al., Biodegradable electrospun fibers for drug delivery, *J. Control. Release.* 92 (2003) 227–231. doi:10.1016/S0168-3659(03)00372-9.
- [244] P. Taepaiboon, U. Rungsardthong, P. Supaphol, Effect of cross-linking on properties and release characteristics of sodium salicylate-loaded electrospun poly(vinyl alcohol) fibre mats, *Nanotechnology.* 18 (2007) 175102. doi:10.1088/0957-4484/18/17/175102.
- [245] E. Pişkin, I.A. Işoğlu, N. Bölgen, I. Vargel, S. Griffiths, T. Cavuşoğlu, et al., In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 90 (2009) 1137–51. doi:10.1002/jbm.a.32157.
- [246] T. Vigh, T. Horváthová, A. Balogh, P.L. Sóti, G. Drávavölgyi, Z.K. Nagy, et al., Polymer-free and polyvinylpyrrolidone-based electrospun solid dosage forms for drug dissolution enhancement., *Eur. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 595–602. doi:10.1016/j.ejps.2013.04.034.
- [247] P. Chen, Q.-S. Wu, Y.-P. Ding, M. Chu, Z.-M. Huang, W. Hu, A controlled release system of titanocene dichloride by electrospun fiber and its antitumor activity in vitro., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76 (2010) 413–20. doi:10.1016/j.ejpb.2010.09.005.
- [248] C.L. He, Z.M. Huang, X.J. Han, L. Liu, H.S. Zhang, L.S. Chen, Coaxial electrospun poly(L-lactic acid) ultrafine fibers for sustained drug delivery, *J. Macromol. Sci. Part B-Physics.* 45 (2006) 515–524. doi:10.1080/00222340600769832.
- [249] C.-L. He, Z.-M. Huang, X.-J. Han, Fabrication of drug-loaded electrospun aligned fibrous threads for suture applications., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 89 (2009) 80–95. doi:10.1002/jbm.a.32004.
- [250] X. Xu, W. Zhong, S. Zhou, A. Trajtman, M. Alfa, Electrospun PEG-PLA nanofibrous membrane for sustained Release of hydrophilic antibiotics, *J. Appl. Polym. Sci.* 118 (2010) 588–595. doi:10.1002/app.32415.
- [251] P. Zahedi, Z. Karami, I. Rezaeian, S.-H. Jafari, P. Mahdaviani, A.H. Abdolghaffari, et al., Preparation and performance evaluation of tetracycline

- hydrochloride loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly(lactic acid)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends, *J. Appl. Polym. Sci.* 124 (2012) 4174–4183. doi:10.1002/app.35372.
- [252] N. Alhusein, I.S. Blagbrough, P.A. de Bank, Electrospun matrices for localised controlled drug delivery: Release of tetracycline hydrochloride from layers of polycaprolactone and poly(ethylene-co-vinyl acetate), *Drug Deliv. Transl. Res.* 2 (2012) 477–488. doi:10.1007/s13346-012-0106-y.
- [253] K. Madhaiyan, R. Sridhar, S. Sundarrajan, J.R. Venugopal, S. Ramakrishna, Vitamin B12 loaded polycaprolactone nanofibers: a novel transdermal route for the water soluble energy supplement delivery., *Int. J. Pharm.* 444 (2013) 70–6. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.01.040.
- [254] H. Jiang, Y. Hu, P. Zhao, Y. Li, K. Zhu, Modulation of protein release from biodegradable core-shell structured fibers prepared by coaxial electrospinning., *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 79 (2006) 50–7. doi:10.1002/jbm.b.30510.
- [255] X.J. Loh, P. Peh, S. Liao, C. Sng, J. Li, Controlled drug release from biodegradable thermoresponsive physical hydrogel nanofibers, *J. Control. Release.* 143 (2010) 175–182. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.030.
- [256] J. Xu, Y. Jiao, X. Shao, C. Zhou, Controlled dual release of hydrophobic and hydrophilic drugs from electrospun poly (l-lactic acid) fiber mats loaded with chitosan microspheres, *Mater. Lett.* 65 (2011) 2800–2803. doi:10.1016/j.matlet.2011.06.018.
- [257] N. Han, J. Johnson, J.J. Lannutti, J.O. Winter, Hydrogel-electrospun fiber composite materials for hydrophilic protein release., *J. Control. Release.* 158 (2012) 165–70. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.094.
- [258] D. Li, M.W. Frey, D. Vynias, A.J. Baeumner, Availability of biotin incorporated in electrospun PLA fibers for streptavidin binding, *Polymer (Guildf).* 48 (2007) 6340–6347. doi:10.1016/j.polymer.2007.08.027.
- [259] T.C. Hung, C.C. Fu, C.H. Su, J.Y. Chen, W.T. Wu, Y.S. Lin, Immobilization of cellulase onto electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membranes and its

- application to the reducing sugar production from microalgae, *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 30–37. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.04.012.
- [260] E. Luong-Van, L. Grøndahl, K.N. Chua, K.W. Leong, V. Nurcombe, S.M. Cool, Controlled release of heparin from poly(epsilon-caprolactone) electrospun fibers., *Biomaterials.* 27 (2006) 2042–2050. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.028.
- [261] S.R.D. A. Sharma, A. Gupta, G. Rath, A. Goyal, R. B. Mathur, Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery, *J. Mater. Chem. B.* (2013) 3410–3418. doi:10.1039/c3tb20487a.
- [262] S. Sakai, Y. Liu, T. Yamaguchi, R. Watanabe, M. Kawabe, K. Kawakami, Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electrospun polyacrylonitrile fibers, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7344–7349. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.036.
- [263] S. Sakai, Y. Liu, T. Yamaguchi, R. Watanabe, M. Kawabe, K. Kawakami, Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in nonaqueous solvent., *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 1059–1062. doi:10.1007/s10529-010-0279-8.
- [264] S.F. Li, J.P. Chen, W.T. Wu, Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 47 (2007) 117–124. doi:10.1016/j.molcatb.2007.04.010.
- [265] X.J. Huang, P.C. Chen, F. Huang, Y. Ou, M.R. Chen, Z.K. Xu, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 70 (2011) 95–100. doi:10.1016/j.molcatb.2011.02.010.
- [266] X. HUANG, A. YU, D. GE, Z. XU, Immobilization and Properties of Lipase from *Candida rugosa* on Electrospun Nanofibrous Membranes with Biomimetic Phospholipid Moities, *Chem. Res. Chinese Univ.* 24 (2008) 231–237. doi:10.1016/S1005-9040(08)60048-3.
- [267] X.J. Huang, A.G. Yu, J. Jiang, C. Pan, J.W. Qian, Z.K. Xu, Surface modification of nanofibrous poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) membrane with biomacromolecules for lipase immobilization, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57 (2009) 250–256. doi:10.1016/j.molcatb.2008.09.014.

- [268] T.G. Kim, D.S. Lee, T.G. Park, Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene oxide)., *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 276–83. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.01.040.
- [269] N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing, *Int. J. Pharm.* 427 (2012) 379–384. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.02.010.
- [270] Y. Yang, X. Li, W. Cui, S. Zhou, R. Tan, C. Wang, Structural stability and release profiles of proteins from core-shell poly (DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 86 (2008) 374–385. doi:10.1002/jbm.a.31595.
- [271] S. Yan, L. Xiaoqiang, T. Lianjiang, H. Chen, M. Xiumei, Poly(l-lactide-co-epsilon-caprolactone) electrospun nanofibers for encapsulating and sustained releasing proteins, *Polymer (Guildf).* 50 (2009) 4212–4219. doi:10.1016/j.polymer.2009.06.058.
- [272] X. Li, Y. Su, S. Liu, L. Tan, X. Mo, S. Ramakrishna, Encapsulation of proteins in poly(L-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 75 (2010) 418–24. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.014.
- [273] H.S. Kim, H.S. Yoo, MMPs-responsive release of DNA from electrospun nanofibrous matrix for local gene therapy: *in vitro* and *in vivo* evaluation., *J. Control. Release.* 145 (2010) 264–71. doi:10.1016/j.jconrel.2010.03.006.
- [274] A. Saraf, L.S. Baggett, R.M. Raphael, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Regulated non-viral gene delivery from coaxial electrospun fiber mesh scaffolds., *J. Control. Release.* 143 (2010) 95–103. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.009.
- [275] S. He, T. Xia, H. Wang, L. Wei, X. Luo, X. Li, Multiple release of polyplexes of plasmids VEGF and bFGF from electrospun fibrous scaffolds towards regeneration of mature blood vessels., *Acta Biomater.* 8 (2012) 2659–69. doi:10.1016/j.actbio.2012.03.044.
- [276] A. Mickova, M. Buzgo, O. Benada, M. Rampichova, Z. Fisar, E. Filova, et al., Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system, *Biomacromolecules.* 13 (2012) 952–962. doi:10.1021/bm2018118.



- [277] X. Li, H. Zhang, H. Li, X. Yuan, Encapsulation of proteinase K in PELA ultrafine fibers by emulsion electrospinning: preparation and *in vitro* evaluation, *Colloid Polym. Sci.* 288 (2010) 1113–1119. doi:10.1007/s00396-010-2235-5.
- [278] W. Salalha, J. Kuhn, Y. Dror, E. Zussman, Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres., *Nanotechnology.* 17 (2006) 4675–81. doi:10.1088/0957-4484/17/18/025.
- [279] R. Korehei, J. Kadla, Incorporation of T4 bacteriophage in electrospun fibres, *J. Appl. Microbiol.* 114 (2013) 1425–1434. doi:10.1111/jam.12158.
- [280] A. López-Rubio, E. Sanchez, Y. Sanz, J.M. Lagaron, Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers., *Biomacromolecules.* 10 (2009) 2823–9. doi:10.1021/bm900660b.
- [281] Z.K. Nagy, Nanofibrous solid dosage form of living bacteria prepared by electrospinning, *Express Polym. Lett.* 8 (2014) 352–361. doi:10.3144/expresspolymlett.2014.39.
- [282] A. Townsend-Nicholson, S.N. Jayasinghe, Cell electrospinning: a unique biotechnique for encapsulating living organisms for generating active biological microthreads/scaffolds., *Biomacromolecules.* 7 (2006) 3364–9. doi:10.1021/bm060649h.
- [283] A.M. Hillery, A.W. Lloyd, J. Swarbrick, *Drug Delivery and Targeting*, Taylor & Francis, London and New York (2001) 186–206. ISBN:0-415-27197-5.
- [284] J.K.W. Lam, Y. Xu, A. Worsley, I.C.K. Wong, Oral transmucosal drug delivery for pediatric use., *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2013). doi:10.1016/j.addr.2013.08.011.
- [285] V.F. Patel, F. Liu, M.B. Brown, Advances in oral transmucosal drug delivery., *J. Control. Release.* 153 (2011) 106–16. doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.027.
- [286] N.V.S. Madhav, A.K. Shakya, P. Shakya, K. Singh, Orotransmucosal drug delivery systems: a review., *J. Control. Release.* 140 (2009) 2–11. doi:10.1016/j.jconrel.2009.07.016.
- [287] V. Hearnden, V. Sankar, K. Hull, D.V. Juras, M. Greenberg, a R. Kerr, et al., New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 16–28. doi:10.1016/j.addr.2011.02.008.

- [288] L.L.H. Chen, D.J. Chetty, Y.W. Chien, A mechanistic analysis to characterize oramucosal permeation properties, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 63–72. doi:10.1016/S0378-5173(99)00091-5.
- [289] S. Sharma, J. Kulkarni, A.P. Pawar, Permeation enhancers in the transmucosal delivery of macromolecules., *Pharmazie*. 61 (2006) 495–504.
- [290] T. Goswami, B.R. Jasti, X. Li, Estimation of the theoretical pore sizes of the porcine oral mucosa for permeation of hydrophilic permeants., *Arch. Oral Biol.* 54 (2009) 577–82. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.03.001.
- [291] H. Sohi, A. Ahuja, F.J. Ahmad, R.K. Khar, Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36 (2010) 254–282. doi:10.3109/03639040903117348.
- [292] N. Narang, J. Sharma, Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2011) 18–22.
- [293] P. Patel, S. Makwana, U. Jobanputra, M. Ravat, A. Ajmera, Sublingual route for the systemic delivery of Ondansetron, *Int. J. Drug Dev. Res.* 3 (2011) 36–44.
- [294] M.-N. Kweon, Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity., *Cytokine*. 54 (2011) 1–5. doi:10.1016/j.cyto.2010.12.014.
- [295] C. Czerkinsky, N. Cuburu, M.-N. Kweon, F. Anjuere, J. Holmgren, Sublingual vaccination., *Hum. Vaccin.* 7 (2011) 110–114. doi:10.4161/hv.7.1.13739.
- [296] S. Radulovic, M.A. Calderon, D. Wilson, S. Durham, Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis., *Cochrane Database Syst. Rev. Online*. 8 (2003) CD002893.
- [297] E. Compalati, F. Braido, G. Walter Canonica, Sublingual immunotherapy: recent advances., *Allergol. Int.* 62 (2013) 415–23. doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0627.
- [298] H.J. Cho, J.Y. Kim, Y. Lee, J.M. Kim, Y.B. Kim, T. Chun, et al., Enhanced humoral and cellular immune responses after sublingual immunization against human papillomavirus 16 L1 protein with adjuvants, *Vaccine*. 28 (2010) 2598–2606. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.013.
- [299] Z. Huo, S.L. Bissett, R. Giemza, S. Beddows, C. Oeser, D.J.M. Lewis, Systemic and mucosal immune responses to sublingual or intramuscular Human Papilloma

- Virus antigens in healthy female volunteers, *PLoS One*. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0033736.
- [300] G.B. Pajno, L. Caminiti, D. Vita, G. Barberio, G. Salzano, F. Lombardo, et al., Sublingual immunotherapy in mite-sensitized children with atopic dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study., *J. Allergy Clin. Immunol.* 120 (2007) 164–70. doi:10.1016/j.jaci.2007.04.008.
- [301] G. Passalacqua, E. Compalati, G.W. Canonica, Sublingual Immunotherapy: Other Indications, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 31 (2011) 279–287. doi:10.1016/j.iac.2011.02.011.
- [302] Z. Bayrak, C. Tas, U. Tasdemir, H. Erol, C.K. Ozkan, A. Savaser, et al., Formulation of zolmitriptan sublingual tablets prepared by direct compression with different polymers: in vitro and in vivo evaluation., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011) 499–505. doi:10.1016/j.ejpb.2011.02.014.
- [303] S.S. Shidhaye, N.S. Saindane, S. Sutar, V. Kadam, Mucoadhesive bilayered patches for administration of sumatriptan succinate., *AAPS PharmSciTech.* 9 (2008) 909–16. doi:10.1208/s12249-008-9125-x.
- [304] O. a Scholz, A. Wolff, A. Schumacher, L.I. Giannola, G. Campisi, T. Ciach, et al., Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device., *Drug Discov. Today.* 13 (2008) 247–53. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.018.
- [305] C. Tavares, R.K. Sakata, Caffeine in the Treatment of Pain, *Rev. Bras. Anesthesiol.* 62 (2012) 387–401. doi:10.1016/S0034-7094(12)70139-3.
- [306] J. Sawynok, Caffeine and pain, *Pain.* 152 (2011) 726–729. doi:10.1016/j.pain.2010.10.011.
- [307] D.K. Arulmozhi, A. Veeranjanyulu, S.L. Bodhankar, Migraine: Current concepts and emerging therapies, *Vascul. Pharmacol.* 43 (2005) 176–187. doi:10.1016/j.vph.2005.07.001.
- [308] C.K. Khoury, J.R. Couch, Sumatriptan-naproxen fixed combination for acute treatment of migraine: a critical appraisal., *Drug Des. Devel. Ther.* 4 (2010) 9–17.
- [309] G.A. Weir, M.Z. Cader, New directions in migraine, *BMC Med.* 9 (2011) 116. doi:10.1186/1741-7015-9-116.

- [310] N.M. Ramadan, T.M. Buchanan, New and future migraine therapy, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 199–212. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.010.
- [311] GlaxoSmithKline, Imitrex Product monograph, (2013) 1–58.
- [312] M. Vikelis, D.D. Mitsikostas, A.M. Rapoport, Sumatriptan iontophoretic transdermal system for the acute treatment of migraine., *Pain Manag.* 4 (2014) 123–8. doi:10.2217/pmt.13.71.
- [313] Y. Wang, R. Thakur, Q. Fan, B. Michniak, Transdermal iontophoresis: Combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery, in: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2005: pp. 179–191. doi:10.1016/j.ejpb.2004.12.008.
- [314] M. Pierce, T. Marbury, C. O’Neill, S. Siegel, W. Du, T. Sebree, Zelrix: a novel transdermal formulation of sumatriptan., 2009. doi:10.1111/j.1526-4610.2009.01437.x.
- [315] F. Facchinetti, G. Allais, R.E. Nappi, I.C. Gabellari, G.C. Di Renzo, A.R. Genazzani, et al., Sumatriptan (50 mg tablets vs. 25 mg suppositories) in the acute treatment of menstrually related migraine and oral contraceptive-induced menstrual migraine: a pilot study., *Gynecol. Endocrinol.* 26 (2010) 773–9. doi:10.3109/09513590.2010.487607.
- [316] C.J. Derry, S. Derry, R.A. Moore, Sumatriptan (rectal route of administration) for acute migraine attacks in adults., *Cochrane Database Syst. Rev.* 2 (2012) CD009664. doi:10.1002/14651858.CD009664.
- [317] J.L. Brandes, D. Kudrow, S.R. Stark, C.P. O’Carroll, J.U. Adelman, F.J. O’Donnell, et al., Sumatriptan-naproxen for acute treatment of migraine: a randomized trial., *JAMA.* 297 (2007) 1443–1454. doi:10.1001/jama.297.13.1443.
- [318] C.C. Suthisisang, N. Poolsup, N. Suksomboon, V. Lertpipopmetha, B. Tepwitukgid, Meta-analysis of the efficacy and safety of naproxen sodium in the acute treatment of migraine, *Headache.* 50 (2010) 808–818. doi:10.1111/j.1526-4610.2010.01635.x.
- [319] M. Nobilis, J. Kopecký, J. Květina, Z. Svoboda, M. Pour, J. Kuneš, et al., Comparative biotransformation and disposition studies of nabumetone in humans and minipigs using high-performance liquid chromatography with ultraviolet,

- fluorescence and mass spectrometric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 641–656. doi:10.1016/S0731-7085(03)00171-7.
- [320] P. Patil, V.R.M. Gupta, R.H. Udupi, B.S.G. Prasad, N. Pati, K. Srikanth, et al., Application of spherical agglomeration technique to improve micromeritic properties and dissolution characteristics of Nabumetone., *Int. Res. J. Pharm.* 3 (2012) 156–162.
- [321] C.-S. Su, M. Tang, Y.-P. Chen, Micronization of nabumetone using the rapid expansion of supercritical solution (RESS) process, *J. Supercrit. Fluids.* 50 (2009) 69–76. doi:10.1016/j.supflu.2009.04.013.
- [322] Diosmin, *Altern. Med. Rev.* 9 (2004) 308–311.
- [323] H. Serra, T. Mendes, M.R. Bronze, A.L. Simplício, Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones., *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 4009–18. doi:10.1016/j.bmc.2008.01.028.
- [324] R.C. Garner, J. V Garner, S. Gregory, M. Whattam, A. Calam, D. Leong, Comparison of the Absorption of Micronized (Daflon 500 mg) and Nonmicronized C-Diosmin Tablets After Oral Administration to Healthy Volunteers by Accelerator Mass Spectrometry and Liquid Scintillation Counting, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 32–40.
- [325] Y. Tsume, D.M. Mudie, P. Langguth, G.E. Amidon, G.L. Amidon, The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for *in vivo* predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC., *Eur. J. Pharm. Sci.* (2014). doi:10.1016/j.ejps.2014.01.009.
- [326] A. Dokoumetzidis, P. Macheras, A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System, *Int. J. Pharm.* 321 (2006) 1–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.011.
- [327] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability., *Pharm. Res.* 12 (1995) 413–420. doi:10.1023/A:1016212804288.

- [328] X. Geng, O.-H. Kwon, J. Jang, Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution., *Biomaterials*. 26 (2005) 5427–32. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.066.
- [329] K. Sun, Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning, *Express Polym. Lett.* 5 (2011) 342–361. doi:10.3144/expresspolymlett.2011.34.
- [330] K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, H. Yamamoto, Electrospinning of Chitosan, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 1600–1605. doi:10.1002/marc.200400253.
- [331] K. Paipitak, T. Pornpra, P. Mongkontalang, W. Techitdheer, W. Pecharapa, Characterization of PVA-chitosan nanofibers prepared by electrospinning, *Procedia Eng.* (2011) 101–105. doi:10.1016/j.proeng.2011.03.019.
- [332] B. Duan, C. Dong, X. Yuan, K. Yao, Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide)., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 797–811. doi:10.1163/156856204774196171.
- [333] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Sixth edition, Pharm. Press, London (2009) ISBN:978 0 85369 792 3.
- [334] L. Li, Y.-L. Hsieh, Ultra-fine polyelectrolyte fibers from electrospinning of poly(acrylic acid), *Polymer (Guildf)*. 46 (2005) 5133–5139. doi:10.1016/j.polymer.2005.04.039.
- [335] B. Ding, M. Yamazaki, S. Shiratori, Electrospun fibrous polyacrylic acid membrane-based gas sensors, in: *Sensors Actuators, B Chem.*, 2005: pp. 477–483. doi:10.1016/j.snb.2004.09.010.
- [336] S. a. Theron, E. Zussman, a. L. Yarin, Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions, *Polymer (Guildf)*. 45 (2004) 2017–2030. doi:10.1016/j.polymer.2004.01.024.
- [337] B. Ding, H.-Y. Kim, S.-C. Lee, D.-R. Lee, K.-J. Choi, Preparation and characterization of nanoscaled poly(vinyl alcohol) fibers via electrospinning, *Fibers Polym.* 3 (2002) 73–79. doi:10.1007/BF02875403.
- [338] E. Yang, X. Qin, S. Wang, Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane, *Mater. Lett.* 62 (2008) 3555–3557. doi:10.1016/j.matlet.2008.03.049.

- [339] A.P.D. Elfick, Poly( $\epsilon$ -caprolactone) as a potential material for a temporary joint spacer, *Biomaterials*. 23 (2002) 4463–4467. doi:10.1016/S0142-9612(02)00163-1.
- [340] K. Tomihata, M. Suzuki, T. Oka, Y. Ikada, A new resorbable monofilament suture, *Polym. Degrad. Stab.* 59 (1998) 13–18. doi:10.1016/S0141-3910(97)00183-3.
- [341] A.J.R. Lasprilla, G.A.R. Martinez, B.H. Lunelli, A.L. Jardini, R.M. Filho, Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 321–328. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.019.
- [342] T.K. Dash, V.B. Konkimalla, Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review, *J. Control. Release*. 158 (2012) 15–33. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.064.
- [343] L. Van der Schueren, B. De Schoenmaker, Ö.I. Kalaoglu, K. De Clerck, An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 1256–1263. doi:10.1016/j.eurpolymj.2011.02.025.
- [344] B. Gupta, N. Revagade, J. Hilborn, Poly(lactic acid) fiber: An overview, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 455–482. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005.
- [345] S.N. Patra, A.J. Easteal, D. Bhattacharyya, Parametric study of manufacturing poly(lactic) acid nanofibrous mat by electrospinning, *J. Mater. Sci.* 44 (2009) 647–654. doi:10.1007/s10853-008-3050-y.
- [346] Z. Jun, H. Hou, A. Schaper, J.H. Wendorff, A. Greiner, Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning – Influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology, *E-Polymers*. (2003) 1–9. doi:10.1515/epoly.2003.3.1.102.
- [347] N. Zhao, S. Shi, G. Lu, M. Wei, Polylactide (PLA)/layered double hydroxides composite fibers by electrospinning method, *J. Phys. Chem. Solids*. 69 (2008) 1564–1568. doi:10.1016/j.jpcs.2007.10.046.
- [348] D.B. Warren, H. Benameur, C.J.H. Porter, C.W. Pouton, Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility., *J. Drug Target*. 18 (2010) 704–31. doi:10.3109/1061186X.2010.525652.

- [349] S. Shukla, E. Brinley, H.J. Cho, S. Seal, Electrospinning of hydroxypropyl cellulose fibers and their application in synthesis of nano and submicron tin oxide fibers, *Polymer (Guildf)*. 46 (2005) 12130–12145. doi:10.1016/j.polymer.2005.10.070.
- [350] L. Francis, A. Balakrishnan, K.P. Sanosh, E. Marsano, Characterization and tensile strength of HPC-PEO composite fibers produced by electrospinning, *Mater. Lett.* 64 (2010) 1806–1808. doi:10.1016/j.matlet.2010.05.043.
- [351] M.J. Nozal, J.L. Bernal, L. Toribio, M.T. Martín, F.J. Diez, Development and validation of an LC assay for sumatriptan succinate residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 285–291. doi:10.1016/S0731-7085(02)00336-9.
- [352] A. Femenía-Font, V. Merino, V. Rodilla, A. López-Castellano, High-performance liquid chromatographic determination of sumatriptan after *in vitro* transdermal diffusion studies., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 621–6. doi:10.1016/j.jpba.2004.11.029.
- [353] J. Hu, Y. Zhao, C. Ma, W. Wang, D. Xing, L. Du, Acid Hydrolytic Method for Determination of Ginkgo Biloba Total Flavonoids in Rat Plasma by HPLC for Pharmacokinetic Studies, *Tsinghua Sci. Technol.* 15 (2010) 452–459. doi:10.1016/S1007-0214(10)70087-0.
- [354] A.M. Al-Ghananeem, A.H. Malkawi, P.A. Crooks, Effect of pH on sublingual absorption of oxycodone hydrochloride., *AAPS PharmSciTech.* 7 (2006) E23. doi:10.1208/pt070123.
- [355] S. Xu, W.-G. Dai, Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations., *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 36–43. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.013.
- [356] D.-G. Yu, L.-M. Zhu, C.J. Branford-White, J.-H. Yang, X. Wang, Y. Li, et al., Solid dispersions in the form of electrospun core-sheath nanofibers., *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 3271–80. doi:10.2147/IJN.S27468.



## 8. Seznam prací

### Publikace:

**Vrbata P.**, Berka P., Stránská D., Doležal P., Lázníček M., **Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption**, Int. J. Pharm. 473 (2014), 407–413.

**Vrbata P.**, Berka P., Stránská D., Doležal P., Musilová M., Čížínská L., **Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen**, Int. J. Pharm. 457 (2013), 168–176.

### Patenty:

Stranska D., Klabanova D., Dolezal P., **Vrbata P.**, Berka P., Musilova M., 2012. Patent č. CZ 303244 B6. **Nosič pro oromukosální, zejména sublingvální aplikaci fyziologicky aktivních látek.**

### Postery:

**Vrbata P.**, Berka P., Stránská D., Doležal P., **Nanofibrous membranes for sublingual administration of sumatriptan**, 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery, 2013, Pisa, Itálie.

Berka P., **Vrbata P.**, Dvořáková P., Spurná M., Doležal P., **Sublingual Permeation of Chromeon 470 Marked Nanoparticles *In Vitro***, 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery, 2013, Pisa, Itálie.

Berka P., **Vrbata P.**, Spurná M., Dvořáková P., Horejšová L., Šašurová M., Krupauerová L., Turnerová L., Doležal P., **Permeation of Dextran and Nanoparticles Through Porcine Sublingual Membrane *In Vitro***, NanoCon 2013, Brno, Česká republika.

**Vrbata P.**, Stránská D., Berka P., Doležal P., **Medicated nanofibre membranes for sublingual drug delivery**, 9th Central European symposium on pharmaceutical technology, 2012, Dubrovnik, Chorvatsko.

### Prezentace:

**Vrbata P.**, Stránská D., Berka P., Doležal P., **Electrospun membranes for improved solubility and bioavailability of poorly soluble drugs**, 3. fakultní postgraduální vědecká konference, 2013, Hradec Králové, Česká republika.

**Vrbata P.**, Stránská D., Berka P., Doležal P., **Nanofibre membranes for sublingual drug delivery**, 2. fakultní postgraduální vědecká konference, 2012, Hradec Králové, Česká republika.

**Vrbata P.**, Stránská D., Berka P., Doležal P. **Nanofibre membranes for drug delivery**, 1. fakultní postgraduální vědecká konference, 2011, Hradec Králové, Česká republika.

## 9. Přílohy

Příloha č. 1 – Publikace: **Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen**

Příloha č. 2 – Publikace: **Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption**

Příloha č. 3 – Poster: **Medicated nanofibre membranes for sublingual drug delivery**

Příloha č. 4 – Poster: **Nanofibrous membranes for sublingual administration of sumatriptan**



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

Pharmaceutical Nanotechnology

## Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen

Petr Vrbata<sup>a</sup>, Pavel Berka<sup>a</sup>, Denisa Stránská<sup>b</sup>, Pavel Doležal<sup>a,\*</sup>, Marie Musilová<sup>a</sup>, Lucie Čížinská<sup>a</sup><sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic<sup>b</sup> Elmarco Ltd. Co., Liberec, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 July 2013

Received in revised form 27 August 2013

Accepted 28 August 2013

Available online xxx

## Keywords:

Electrospinning

Nanofibre

Migraine

Sublingual

Sumatriptan

Naproxen

## ABSTRACT

Sublingual administration of active pharmaceutical substances is in principle favourable for rapid onset of drug action, ready accessibility and avoidance of first pass metabolism. This administration could prove very useful in the treatment of migraines, thus two frequently used drugs were selected for our study.

Sumatriptan succinate, naproxen, and its salt as well as combinations of these were incorporated into nanofibrous membranes via the electrospinning process. DSC measurements proved that the resulted membranes contained non-crystalline drug forms. SEM imaging approved good homogeneity of diameter and shape of the membrane nanofibres.

The nanofibrous membranes always showed the rapid and mutually independent release of the tested drugs.

The drugs exhibited very high differences in sublingual permeation rates *in vitro*, but the rates of both substances were increased several times using nanofibrous membranes as the drug carrier in comparison to drug solutions. The released drugs subsequently permeated through sublingual mucosa preferentially as non-ionized moieties.

The prepared nanofibrous membranes proved very flexible and mechanically resistant. With their drug load capacity of up to 40% of membrane mass, they could be very advantageous for the formulation of sublingual drug delivery systems.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Migraine is a chronic relapsing brain disorder that affects about 12% of the Western population. It occurs as a unilateral headache, often accompanied by other symptoms, including nausea, vomiting, photophobia, and phonophobia, lasting from 4 to 72 h (Arulmozhi et al., 2005). In 15% of cases, a migraine headache is preceded by the aura, a transient neurological dysfunction, which is usually characterized by visual and/or sensory symptoms. Migraine has a very strong social impact, influencing quality of life and work productivity (Ramdan and Buchanan, 2006). Sumatriptan is the most frequently used member of triptans commonly prescribed for the treatment of migraine headaches (with or without aura). Sumatriptan could be also administered together with NSAID naproxen sodium, which brings higher benefits to diminish symptoms of migraine than usage of either of the drugs separately.

Actual dosage forms of sumatriptan are pills (50 and 100 mg), subcutaneous injection (4 and 6 mg), and nasal spray (10 and 20 mg). Succinate salt is well soluble in water, but its bioavailability (BA) after oral administration is only about 14%. Nasal spray administration of a sumatriptan base has a BA of about 16% (Imitrex, 2013). Low BA following oral administration, relatively short half-life, and a requirement for the fast onset of action instigated the research for a new route of administration of this drug.

A sublingual route of administration could be very advantageous in the given case. Although a relatively small surface area and difficulties with the dosage form (permanently washed by saliva, and involuntary swallowing of liquids greater than 200  $\mu$ L) have limited this site for drug administration so far, it possesses many advantageous characteristics. Very thin mucosa (100–200  $\mu$ m), good blood supply, perfect accessibility, non-invasiveness of administration, and potential ease of removal encouraged research efforts in this area. The fast onset of systemic drug action is also very important, and the avoidance of the first-pass metabolism is in many cases essential (Hearnden et al., 2012; Bayrak et al., 2011; Patel et al., 2011a,b). Moreover, this way of administration is also suitable for small children, elderly people, and other patients with swallowing or digestion problems (Patel et al., 2011b).

Abbreviations: SUS, sumatriptan succinate; NAPS, naproxen sodium; NAP, naproxen.

\* Corresponding author. Tel.: +420 495067438.

E-mail address: [dolezal@faf.cuni.cz](mailto:dolezal@faf.cuni.cz) (P. Doležal).

0378-5173/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.085>

Currently, there are several sublingual preparations, mostly based on fast dissolving (disintegrating) tablets, films, wafers, and sublingual sprays commercially available, and new dosage forms are being tested (Patel et al., 2011a; Hearnden et al., 2012).

A relatively new and very promising technology for the formulation of sublingual drug delivery systems is based on the use of electrospun drug loaded nanofibrous membranes (Nagy et al., 2010; Yu et al., 2010a,b; Stranska et al., 2012). Electrospinning is a unique technique for the preparation of ultra-fine fibres with the diameter size going down to nanometres. Although the principle of this procedure has been known for almost a century, it became a topic of great interest in the early 1990s, when Reneker and co-workers demonstrated the possibility of electrospinning a wide range of polymers (Reneker and Chun, 1996; Frenot and Chronakis, 2003).

Nowadays, most of linear synthetic and also natural polymeric compounds can be easily electrospun into nanofibres (Frenot and Chronakis, 2003; Agarwal et al., 2013). A very important moment for further development was the invention of a large-scale production device the Nanospider™ which makes it easier to scale up production for commercial processing (Jirsak et al., 2005). Nevertheless, scaling up production of every individual product is always challenging, especially in pharmaceutical industry.

Nanofibres, or rather nanofibrous membranes, have already found their application in many disciplines. Thanks to their unique properties, namely high surface area to volume ratio, high nanoporosity, high mechanical strength, and structural similarity to an extracellular matrix, they attract a lot of attention within technical disciplines, but also in biomedicine and pharmacotherapy and new dosage formulation types (Agarwal et al., 2013; Leung and Ko, 2011; Nagy et al., 2012).

In the biomedical field, nanofibres find usage in the formation of tissue engineering scaffolds (Cao et al., 2009; Leung and Ko, 2011), wound dressing (Zhang et al., 2009; Leung and Ko, 2011; Sell et al., 2009), vascular grafts (Zhang et al., 2009; Sell et al., 2009), and drug delivery systems (Leung and Ko, 2011; Chakraborty et al., 2009; Meinel et al., 2012). Many kinds of drugs have already been incorporated into the nanofibrous mats and then successfully released from them without a significant loss of their activity. Among low molecular drugs antibiotics (Kenawy et al., 2002; Kim et al., 2004), non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) (Taepaiboon et al., 2006; Kenawy et al., 2007; Huang et al., 2012), vitamins (Taepaiboon et al., 2007; Madhaiyana et al., 2013), chemotherapeutics (Xu et al., 2009), and many others have already been described. Higher molecular compounds, mostly protein based, were also shown to be effectively released from nanofibres (Maretschek et al., 2008; Han et al., 2012).

In our work, we focused on the limits of sublingual administration of sumatriptan and naproxen, in the context of permeability of sublingual mucosa *in vitro*, then on the examination of suitable polymers for co-formulation of both the drug-loaded electrospun membranes and estimation of formulation parameters for release profiles potentially suitable for anti-migraine action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Sumatriptan succinate (SUS) was kindly donated by Teva Czech Industries s.r.o. (Opava, CZ). Naproxen (NAP), naproxen sodium (NAPS) and chitosan (CHI, Mw 60,000–120,000) were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, CZ), polyacrylic acid (PAA, Mw 450,000), poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL, Mw 100,000) were purchased from Scientific Polymer Products (New York, USA), polyvinylalcohol (PVA, type Z 220, viscosity of 4 wt% water solution at 20 °C

11.5–15 mPa s) from Nippon Gohsei (Düsseldorf, GE). Acetic acid, formic acid, phosphoric acid, and potassium dihydrogen phosphate were supplied by Penta Chemicals (Prague, CZ).

The aqueous solutions were prepared with purified water. All the chemicals were used as received without further purification.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Formulation of drug loaded electrospun membranes

The nanofibrous mats were produced by electrospinning from polymer solutions using Nanospider™ technology (Jirsak et al., 2005).

Chitosan was dissolved in a mixture of acetic acid and water 2:1 in a concentration of 2.25%; PVA was dissolved in a water:phosphoric acid mixture (99.3:0.7) in a concentration of 11%; PAA was dissolved in a 0.1 M sodium chloride solution in a concentration of 6% with the addition of  $\beta$ -cyclodextrin 1.2% (as a cross-linking agent); PCL was dissolved in a mixture of acetic acid: formic acid (2:1) in a concentration of 12%. The active substances were added in concentrations ranging from 5% to 30% related to the mass of the polymer in the solution for electrospinning.

All the chemicals were stirred until homogenous solutions were obtained, and then poured into the container of an electrospinning device. Spinning electrode was in a shape of wire, electrospinning is nozzle free. After the application of a high voltage, nanofibres were formed and then collected on a spunbond textile covering the collector plate. Speed of spunbond movement through the device determines nanofibrous layer thickness (g/m<sup>2</sup>). In the case of water-soluble polymers (PVA, PAA) cross-linking was performed. After electrospinning process the membranes were thermally treated in a drying oven at 130 °C for 15 min in the case of PVA and at 140 °C for 20 min in the case of PAA.

#### 2.2.2. Characterization

The morphology of prepared nanofibrous membranes was evaluated by scanning electron microscopy – NOVA NanoSem 230 (FEI, USA) with maximal resolution up to 1.3 nm at 30 kV and magnification up to 1,000,000 times.

The differential scanning calorimetry (DSC) analyses were carried out using a 200 F3 MAJA calorimeter (NETZSCH, Germany). Samples were heated at speed 5 °C/min from 20 °C to 200 °C. The nitrogen gas flow rate was set at 40 mL/min.

#### 2.2.3. Drug release evaluation

Drug release measurements were conducted in a water bath under a constant temperature (36.5 ± 0.5 °C) and permanent stirring (magnetic bar; 200 rpm). Pieces of membrane 5 cm × 4 cm (20 cm<sup>2</sup>) were precisely weighed and then placed inside vials. The vials were filled with 20 mL of a pre-tempered phosphate buffered solution of pH 7.4 (PBS) as an acceptor phase, and placed inside the water bath. The samples of the acceptor phase (0.6 mL) were withdrawn in pre-determined time intervals (5, 10, 15, and 30 min, 1, 2, 4, 8, and 24 h) and the pertinent volume was replaced with a fresh buffer.

#### 2.2.4. *In vitro* permeation experiments

*In vitro* drug permeation experiments were performed using a porcine sublingual mucosa. The basic principles were derived from analogical experiments used in transdermal permeations, previously described in detail (Patel et al., 2011a).

Pieces of mucosa were obtained from the lower side of fresh porcine tongues (supplied from a local slaughterhouse) by surgically removing the muscle and connective tissues. After preparation, large pieces of obtained mucosa were stored in a 0.9% sodium chloride solution with the addition of sodium azide (0.002%). The processed sublingual membranes were about 0.4 mm



Fig. 1. Diffusion and permeation cell.

in thickness. They were cut into pieces (2 cm × 2 cm) and fixed between a donor and an acceptor compartment of diffusion cells (Fig. 1). The actual area exposed for permeation was 2 cm<sup>2</sup>. The PBS (pH 7.4) was used as an acceptor phase. Permeation was conducted in a water bath – temperature (36.5 ± 0.5 °C) and stirring with magnetic bar.

*In vitro* permeation of SUS, NAP and NAPS was evaluated using the donor solutions (PBS, pH 6.8, 0.5 mL) with selected concentrations (1%, 3%, 6% for SUS; 1%, 2%, 3%, 10% for NAPS) and the tested nanofibrous membranes. Samples (0.6 mL) of the acceptor phase were withdrawn in pre-determined time intervals (15, 30 min, 1, 2, 4, 6, and 8 h) and replaced with a fresh buffer. The samples were briefly stored in a refrigerator until HPLC determination of investigated substances was performed. All drug release measurements were performed in triplicate, and in the case of *in vitro* sublingual permeation experiments, four replicates were performed. The values presented below are calculated as the means with their standard errors of the means (SEM).

The stability pre-tests of the drugs were carried out in artificial saliva (pH 6.8) and an isotonic phosphate buffer (pH 7.4). Low stability of the drugs in one of these mediums would be very limiting for potential use. The obtained results showed no significant decrease in the concentration of the drugs during a 24 h period.

#### 2.2.5. HPLC analysis

Drug concentrations in the samples of the acceptor phase were determined using HPLC set Agilent Technologies 1200 (USA) equipped with an auto sampler ALS1329A, UV/VIS detector VWD G1414B, and an isocratic pump G1310A.

**2.2.5.1. Sumatriptan.** The mobile phase was a mixture of ammonium phosphate (0.05 M) and acetonitrile (84:16, v/v), pH was adjusted to 3.0 with the addition of 0.1 M phosphoric acid. The flow rate was set at 1.5 mL/min. The method of Nozal et al. (2002) was modified to avoid interference from skin residues at the retention time of sumatriptan at 227.4 nm; the detection wavelength was set at 282.7 nm (Femenia-Font et al., 2005). Separation was carried out at 30 °C with the use of 250 mm × 4.6 mm, a reverse-phase column packed with 5 μm C18 silica particles (Zorbax Eclipse XDB C18).

**2.2.5.2. Naproxen.** The mobile phase was a mixture of potassium dihydrogen phosphate (0.01 M; pH adjusted to 2.5 with the addition of 0.1 M phosphoric acid) and acetonitrile (55:45, v/v). The flow

rate was set at 1.5 mL/min. Separation was carried out at 25 °C, on a 150 mm × 4.6 mm, reverse-phase column packed with 5 μm C18 silica particles (Zorbax Eclipse XDB C18). The detection wavelength was set at 230 nm.

#### 2.2.6. Data treatment

The primary data from HPLC assay of the samples were further corrected for sampling and replacement of the pure acceptor phase. The amounts of the drug passed through the 1 cm<sup>2</sup> of sublingual mucosa were obtained. The cumulative amount of the drug vs. time dependence was used to calculate the pertinent slope values of the linear part of the concerned dependence with linear regression. The values obtained were understood as the individual flux values  $J$  [μg/cm<sup>2</sup>/h] of the pseudosteady state permeation. The flux values means and standard error of the means (SEM) (number of replicates  $n = 4$ ) were calculated.

### 3. Results and discussion

In this paper, we focused on membranes ensuring longer contact time of the drug with absorption mucosa using a non-soluble (removable) membrane. Membrane prevents the leaking of a drug to an oral cavity and swallowing the drug, whilst masking the unpleasant taste.

#### 3.1. Scanning electron microscopy

The prepared nanomembranes were analyzed by scanning electron microscope for average fibre diameter and uniformity of the membrane fibres. This characterization confirmed that the diameters of all the membrane nanofibres were within the nanometre scale and of good shape and diameter uniformity (Fig. 2). It can be concluded that incorporation of the drugs into the nanofibrous membranes brought no free particles of the drugs, neither on the surface of nanofibres, nor particles larger than nanofibre diameter embedded within the mass of the fibres. It is important as evidence of well-tuned electrospinning parameters that make it possible to obtain fibres without loss of the drug, and with good shape homogeneity. Very similar images were also obtained for all other prepared membranes.

#### 3.2. Differential scanning calorimetry (DSC)

The physical state of the carrier polymers and the incorporated drugs was investigated by DSC measurements. The DSC thermograms of chosen samples are shown in Figs. 3–5. The thermogram of crystalline naproxen exhibits a strong endothermic peak at 157.1 °C, while no melting peak was present on thermograms of nanofibrous mats containing 5% or 30% of incorporated naproxen. This result proves that naproxen in the tested nanofibrous mats is present in an amorphous state, or more likely, homogeneously dispersed in the polymer matrix of filaments. Moreover, no glass transition peak of carrier polymer was found. This finding is also important, because polymer crystallinity plays an important role in interactions with water, and therefore also drug release (Natu et al., 2010).

Similar results were concluded from measurements with sumatriptan succinate. The crystalline form of sumatriptan succinate provided an endothermic peak at 169.7 °C, no melting peak or glass transition peak were found on the other thermograms.

#### 3.3. Release of the drugs from nanofibrous membranes

Release characteristics of the investigated drugs were tested and evaluated by the complete immersion of the mats in the release medium.

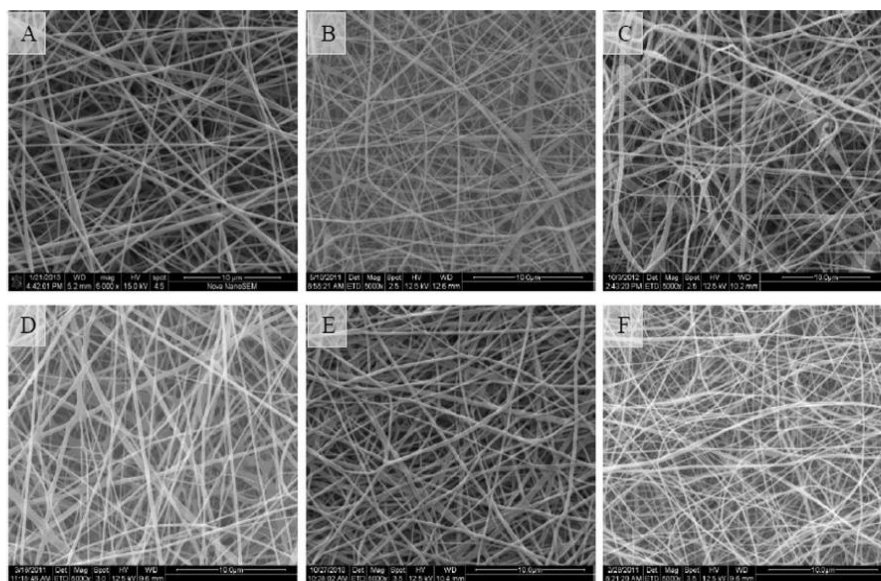


Fig. 2. SEM images of the prepared membranes. A: Chitosan - blank; B: chitosan - containing SUS (5%); C: chitosan - containing NAP (5%); D: PVA - blank; E: PVA - containing SUS (5%); F: PVA - containing NAP (5%).

Several different polymers with expected fast drug release were chosen. The polymer selection was further influenced by the intended purpose of their use in the sublingual dosage form. Bioadhesivity and biocompatibility of polymers were therefore important.

The amounts of the incorporated drugs ranged from 5% to 30% of mass of the polymer in an electrospinning solution. The influence of drug concentrations in the nanofibres on the release profiles of the drugs was also evaluated, and is discussed later.

The release of SUS from three different hydrophilic polymers – PVA, CHI, and PAA was tested. In all of the cases, burst release of the drug was observed with more than 90% of the total releasable amount of the drug being dissolved in an acceptor phase within the first 10 min of the experiments (Fig. 6). The amount of the

drug released then remained at the same level for up to a further 24 h. The release of NAP from three hydrophilic (CHI, PVA, PAA) and one hydrophobic polymer (PCL) was tested. All of the polymers provided burst release of naproxen. Similarly to sumatriptan, more than 90% of the releasable drug was dissolved in the acceptor phase within 10 min (Fig. 7). Interestingly, the membranes made of hydrophobic PCL also showed a very fast release of NAP. All of the membranes under investigation showed suitable drug release for formulation of a sublingual dosage form for whose requirement of fast drug release is of great importance (Hearnden et al., 2012).

Under the given conditions, the release profiles of NAP and NAPS from electrospun mats did not show any evident differences, although the solubility and rate of dissolution of the crystalline form of the given substances in the acceptor medium used

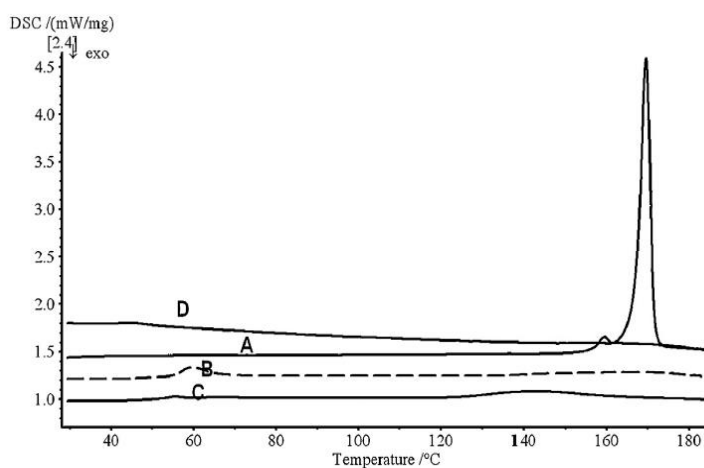


Fig. 3. DSC profiles of A: sumatriptan succinate (crystalline powder); B: PVA + sumatriptan suc. 20% (nanofibrous membrane); C: PVA (nanofibrous membrane without drug); D: PVA (powder).

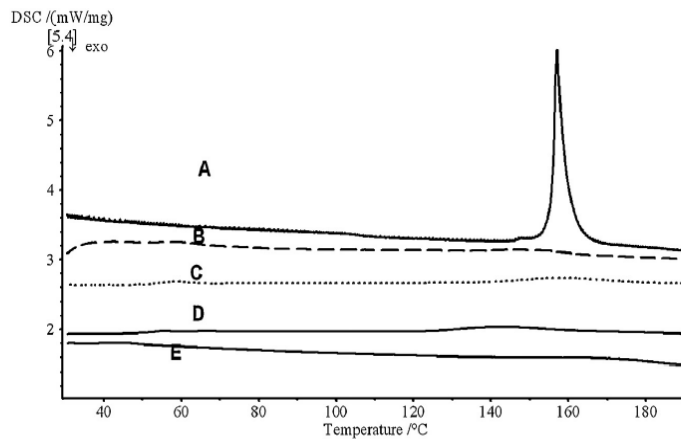


Fig. 4. DSC profiles of A: naproxen (crystalline powder); B: PVA + naproxen 30% (nanofibrous membrane); C: PVA + naproxen 5% (nanofibrous membrane); D: PVA (nanofibrous membrane without drug); E: PVA (powder).

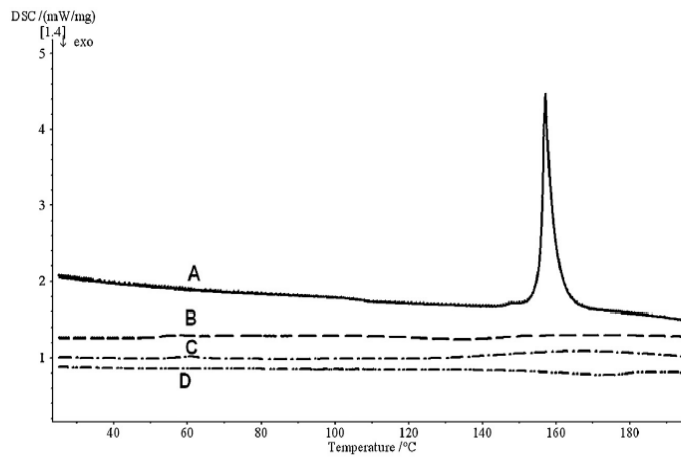


Fig. 5. DSC profiles of A: naproxen (crystalline powder); B: chitosan + naproxen 5% (nanofibrous membrane); C: chitosan (nanofibrous membrane without drug); D: chitosan (powder).

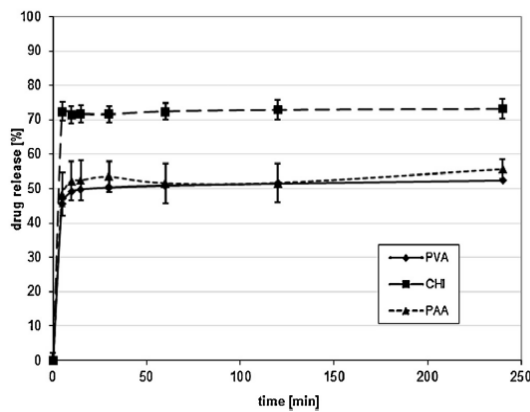


Fig. 6. The release profiles of sumatriptan succ. from nanofibrous membranes containing 5% of the drug made of polyvinylalcohol (PVA), chitosan (CHI), and polyacrylacrylate (PAA) (n=3; mean ± SEM).

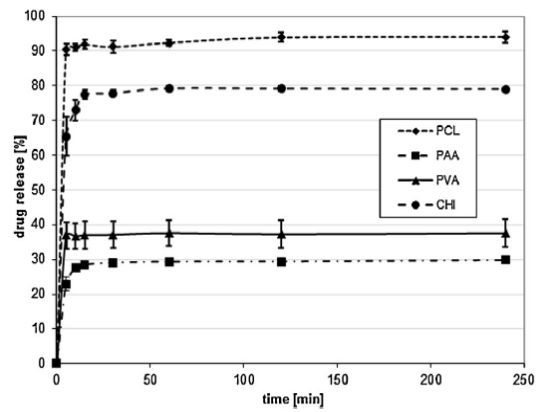


Fig. 7. The release profiles of naproxen from nanofibrous membranes containing 5% of the drug made of polyvinylalcohol (PVA), chitosan (CHI), polyacrylacrylate (PAA), and poly-ε-caprolacton (PCL) (n=3; mean ± SEM).



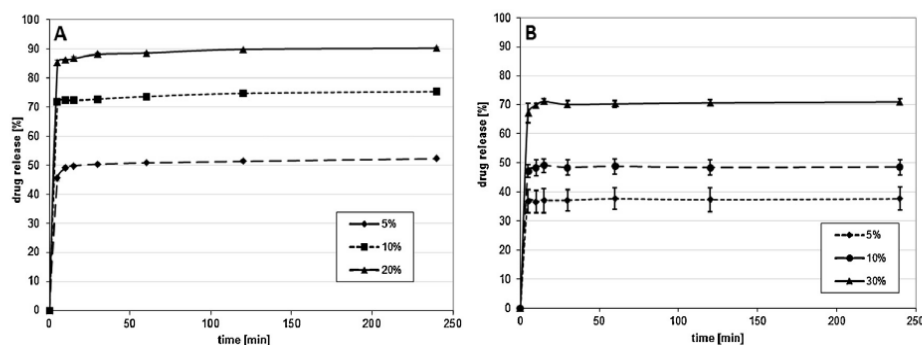


Fig. 8. A: Release of sumatriptan succinate from PVA nanofibrous membranes containing 5%, 10%, or 20% of the drug incorporated. B: Release of naproxen from PVA nanofibrous membranes containing 5%, 10%, or 30% of the drug incorporated.

differs greatly. It seems to be an indirect evidence of the fact that drug incorporation into nanofibres by the electrospinning process has brought dramatic changes in solubility properties, and that an initial difference of the drug solubilities is levelled in direction to higher solubility.

In most cases, 40–80% of the theoretically calculated amount of the drugs loaded in nanofibrous membranes were released, varying with the polymer used. Differences between the amounts of drugs incorporated and released were probably caused by different solubility of the polymeric nanofibrous membranes in the acceptor phase.

Srikar et al. (2008) assumed that substances (dyes in their study) might only be released from the available surface layers of the polymer, including surfaces of nanopores, whereas the drug inside the polymer bulk will not be released at all. The results of our experiments corroborate this assumption, because in no experiment was complete release of the incorporated drugs from membranes insoluble in the acceptor phase achieved.

This assumption also correlates with other findings that higher percentages (not only amounts) of the drugs were released from the nanofibrous mats containing higher levels of the drug per mass of polymer (Fig. 8). When a higher level of a drug is incorporated, a higher proportion of the drug is likely to be deposited next to the fibre surfaces, and is therefore available for release. The membranes highly soluble in acceptor phase allowed almost complete release of the drugs theoretically incorporated into the membranes.

Further reduction in the amount of the drugs released was probably caused by cross-linking of polymer chains. Cross-linking agents could bind incorporated drugs to the polymeric chains, rendering the drug un-releasable, and thus reducing the total amount of drug available. Theoretically, the bonding of drug molecule to polymer chains can form new, barely soluble molecules. The reduction was most apparent in the case of PAA, where the released drug in some cases represented only about 30% of the incorporated amount, while the amount of drug released from non-cross-linked nanofibrous mats reached almost the entire incorporated drug.

In the case of simultaneous release of two different drugs, when both of the drugs were incorporated either in one single nanofibrous layer or in multilayered electrospun membrane separately, the release of one drug did not influence the release of the other (Fig. 9).

In the experiments dealing with maximal drug load capacity, the maximal level of drug incorporated in nanofibrous membranes using this electrospinning method was found to be around 40% of the membrane mass. With further increase in a drug concentration the electrospinning process was disturbed and structural

defects multiplied (detected by SEM) or the process was completely disrupted.

#### 3.4. Permeation of the drugs

Permeation of both the drugs through a porcine sublingual mucosal membrane was tested using drug solutions at first, because sublingual permeability of neither SUS nor NAP had already been sufficiently explored.

Sumatriptan succinate is a hydrophilic substance. Although its molecular weight is relatively low, it exerted slow and incomplete permeation through the sublingual mucosa. For instance, usage of saturated solutions (30 mg/0.5 mL, pH 7.4) as donors yielded only about 0.1 mg of SUS totally found in the acceptor phase (20 mL) within 8 h, e.g. only 0.33% of the drug loaded in a donor compartment.

Because of very slow permeation (pH 7.4 donor), the influence of ionization of SUS (the  $pK_a$  values are 4.21, 5.67, 9.63, >12) on permeation rate was explored. Permeation was evaluated using donor solutions of pH values 3.9, 7.4, 12.0. The highest concentrations in the acceptor phase and highest pseudosteady state fluxes were obtained at pH 12.0, where sumatriptan occurs mostly in the unionized form as a sumatriptan base. The lowest permeation rate was found with donors of pH 3.9, where the sumatriptan succinate molecule is fully ionized (Fig. 10 and Table 1). It is in good agreement with the theory of passive permeation through most biological membranes. Results of a similar character were obtained

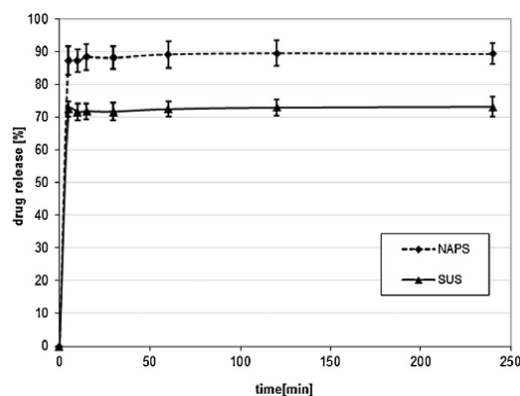


Fig. 9. Simultaneous release of naproxen sodium and sumatriptan succinate from chitosan nanofibrous membranes ( $n=3$ ; mean  $\pm$  SEM).

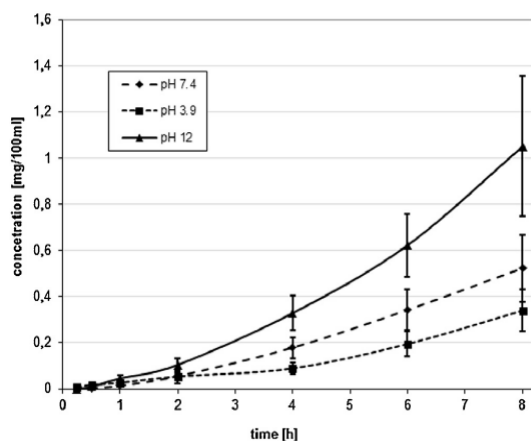


Fig. 10. Permeation of sumatriptan through a porcine sublingual membrane using donor solutions (6%, 0.5 mL) of three different pH (3.9, 7.4 and 12.0).

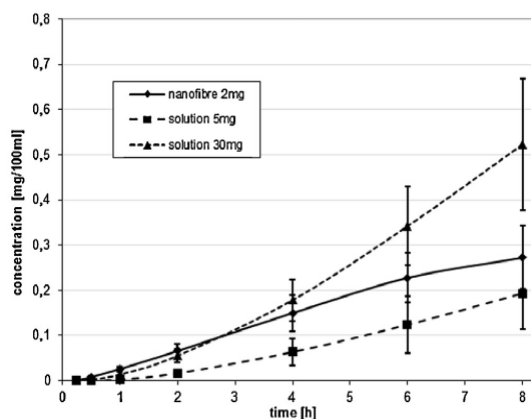


Fig. 11. Permeation of sumatriptan through a porcine sublingual membrane. Donors: PVA nanofibrous membrane 2 mg, solution 1% (sol 5 mg), solution 6% (sol 30 mg).

in a study with nicotine, where the differences of permeation rates at various pH values (expressed as cumulative amounts) were even more significant (Chen et al., 1999).

The nanofibrous PVA membranes containing 20% of SUS were placed on the sublingual mucosa as the donor samples, and concentrations of the permeated drug in acceptor compartments were measured. The results showed (Fig. 11) that permeation from the nanofibrous donor was much faster compared to the solution containing 5 mg of the drug in 0.5 mL of donor (e.g. 1%), although the amount of the drug in the solution was more than 2 times higher than in the nanofibrous membranes. Moreover, within the initial 2 h period, SUS permeation from nanofibres was even faster than

**Table 1**  
The sublingual permeation flux values.

Sample (SUS)	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	Sample (NAPS)	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )
Nano PVA – 2 mg	$4.39 \pm 0.56$	Nano PCL 5 mg	$180.59 \pm 14.05$
Sol pH 7.4 – 5 mg	$2.71 \pm 1.00$	Sol 5 mg	$77.30 \pm 16.56$
Sol pH 12 – 30 mg	$13.47 \pm 3.47$	Sol 10 mg	$185.95 \pm 19.40$
Sol pH 7.4 – 30 mg	$10.32 \pm 2.72$	Sol 16 mg	$521.26 \pm 14.03$
Sol pH 3.9 – 30 mg	$6.43 \pm 2.47$	Sol 50 mg	$2277.31 \pm 41.71$

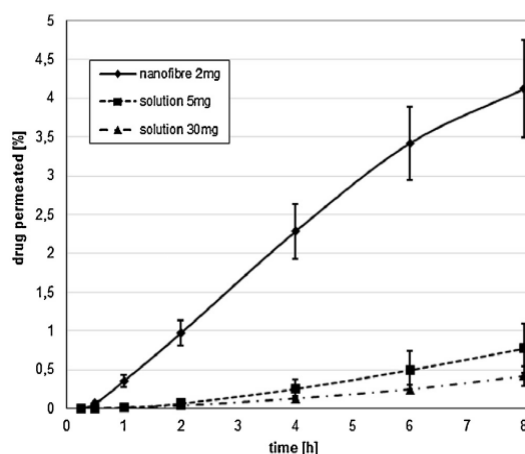


Fig. 12. Amounts of sumatriptan permeated. Donors: PVA nanofibrous membrane 2 mg, solution 1% (sol 5 mg), solution 6% (sol 30 mg, pH 12).

from the saturated solution. This finding can be explained by a much higher concentration of the drug presented at the very large interface of nanofibre/mucosa. It is possible to imagine an exposed mucosal layer that is fully saturated with the drug released from the nanofibres, and an immediate replacement of permeated-off drug from nanofibrous storage. This situation is quite different in comparison with the drug solution donor sample. Nanofibres probably served as a reservoir for surface facilitated drug release supplying the carrier/mucosa interface with a higher efficiency than was the case with solutions.

As results in Fig. 12 show the transmucosal drug permeation was increased about 5 times when the drug is loaded in nanofibrous membranes, compared to the highly concentrated solutions used as a donor. The increase in released and subsequently permeated drug amounts in percentages of initially loaded amounts is substantial from a practical point of view.

We consider the necessary permeated dose of SUS should reach at least 4 mg (or rather 6 mg) of the drug. It represents an equivalent of a subcutaneously administered dose of SUS with a bioavailability of about 96% (Imitrex, 2013).

Thus, if the permeated amount of SUS from the nanofibrous donor was about 4% of the loaded dose, then about 100 mg of SUS would have to be administered (on 20 cm<sup>2</sup>, which is the estimated area size of the sublingual mucosa available for administration, and also the size of the intended membrane formulation). This requirement could be technologically realizable. For instance, to obtain 100 mg of API for delivery the nanomembrane weight would have to be about 250 or 300 mg of nanofibres made of one or more polymers. The membrane would have to be produced of a high drug load and a high mass per area (g/m<sup>2</sup>). The membranes could be layered and then pressed to fix them. This reservoir would be covered by an impermeable layer on one side. We also take into account a possible addition of an adhesive at the edges of a final preparation to ensure a good and long term contact at a place of absorption.

Further improvement could be achieved by the use of a sumatriptan base for the formulation of drug loaded nanofibrous membranes, because this form of the drug is more permeable across the sublingual membrane, as illustrated in Fig. 10. Penetration enhancers are another applicable possibility to improve the permeation rate. They can be directly incorporated into electrospun membranes, and released simultaneously with a drug affecting its permeation.

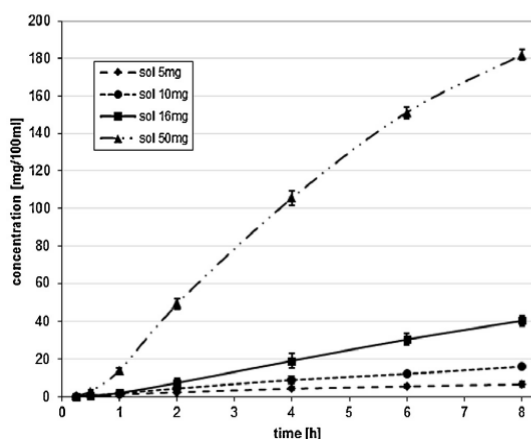


Fig. 13. Permeation of naproxen through a porcine sublingual membrane using graduated concentrations of donor solutions (0.5 mL) – 1%, 2%, 3.2% and 10%.

Permeation of *naproxen* and *naproxen sodium* from the concentrated donor solutions through porcine sublingual mucosa showed very good results for both the drugs. The free acid, but also the sodium salt, permeated through the mucosa surprisingly quickly, thus high amounts of the drugs in the acceptor phase were detected.

Solubility of the salt form in an aqueous medium is several times higher, and could therefore be administered in much higher concentrations and amounts, and was predominantly used for the experiments.

The increment in concentration of the drug administered in a donor solution on the mucosa increased the permeation rate even more than proportionally, and the highest drug permeation was found using a saturated drug solution (Figs. 13 and 15), as was expected. In the case of the saturated donor solution (10%), more than 70% of the total amount of the drug permeated during 8 h of the experiment.

However, when nanofibrous membranes (CHI, PCL) containing 30% NAP were used as a donor, good contact with the absorption mucosa was achieved, and NAP permeated very quickly and more effectively than from the tested solutions. The permeated amount of NAP reached almost identical values from nanofibrous membranes as from donor solutions containing a two times higher amount of the drug. Thus, permeation of NAP from the electrospun membranes was more than 2 times higher in comparison to the solution with the same amount of the drug (Fig. 14).

It is apparent, by comparing permeability of NAP and SUS that less polar units of NAP permeate through a sublingual membrane more freely than polar SUS. Molecular weights of both drugs are very similar (230 NAP vs. 295 SUS), however there are significant differences in the polarity of the molecule ( $\log P$  3.18 NAP vs. 0.93 SUS) that probably cause the differences in the drug permeation extensions. The results show that permeation through nonpolar routes of this very thin mucosal membrane probably prevails. Naproxen permeated amounts were 35–75% of the administered dose, and in the case of sumatriptan, the pertinent values were around 0.5–4.5% of the dose.

It is important to note that the increase of the drug permeation is much more evident for sumatriptan, which passes reluctantly, than naproxen, which has lower relative increase due to its already high permeation level. Thus, usage of nanofibrous membranes could be more favourable for the drugs with slow permeation of mucosal barriers.

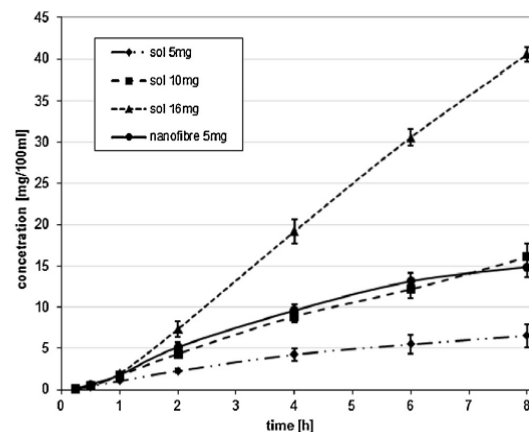


Fig. 14. Permeation of naproxen through a porcine sublingual membrane using 3.2% solution (sol 16 mg), 2% solution (sol 10 mg), 1% solution (sol 5 mg) and nanofibrous membrane 5 mg (PCL).

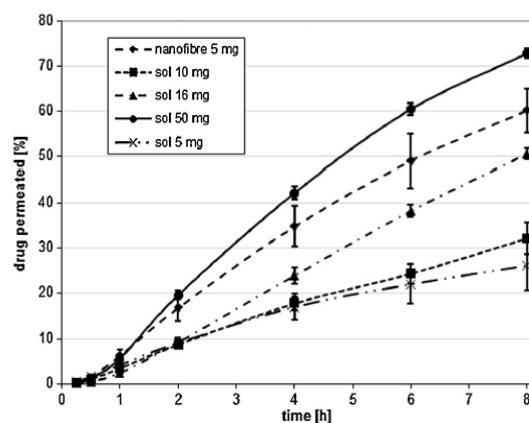


Fig. 15. Amounts of naproxen permeated through porcine sublingual membrane using 10% solution (sol 50 mg), 3.2% solution (sol 16 mg), 2% solution (sol 10 mg), 1% solution (sol 5 mg) and nanofibrous membrane 5 mg (PCL).

#### 4. Conclusions

Sumatriptan succinate, naproxen and its sodium salt, as well as their combination were successfully incorporated into nanofibrous membranes via electrospinning manufacturing technology. The membranes obtained showed very good nanofibre diameters and shape homogeneity without any crystal moieties within nanofibrous masses.

The membranes showed very fast and mutually independent release of sumatriptan succinate, naproxen and naproxen sodium from either hydrophilic PVA, PAA, and chitosan nanofibres, or a hydrophobic PCL nanofibrous carrier.

The used drugs exerted very high differences in *in vitro* sublingual permeation, but in both cases, it was several times increased using nanofibrous membranes as the drug carrier in comparison to the drug solutions as donors. As the drugs permeated preferentially as non-ionized moieties, therefore we would recommend to prepare nanofibrous membranes containing both the drugs in non-ionized forms.

The membranes prepared were very flexible and mechanically resistant. Having a drug load capacity of up to 40% of the

membrane mass, they could be very advantageous for the formulation of sublingual drug delivery systems.

### Acknowledgements

The study was supported by the Grant No. SVV 267 001 of the Ministry of Education of the Czech Republic and No. 530812/2012 of Grant Agency of Charles University.

### References

- Agarwal, S., Greiner, A., Wendorff, J.H., 2013. Functional materials by electrospinning of polymers. *Prog. Polym. Sci.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001>.
- Arulmozhi, D.K., Veeranjanyulu, A., Bodhankar, S.L., 2005. Migraine: current concepts and emerging therapies. *Vascul. Pharmacol.* 43, 176–187.
- Bayrak, Z., Tas, C., Tasdemir, U., Erol, H., Ozkan, C.K., Savaser, A., Ozkan, Y., 2011. Formulation of zolmitriptan sublingual tablets prepared by direct compression with different polymers: in vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78, 499–505.
- Cao, H., Liu, T., Chew, S.Y., 2009. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 1055–1064.
- Chakraborty, S., Liao, I.-Ch., Adler, A., Leong, K.W., 2009. Electrohydrodynamics: a facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 1043–1054.
- Chen, L.-L.H., Chetty, D.J., Chien, Y.W., 1999. A mechanistic analysis to characterize oromucosal permeation properties. *Int. J. Pharm.* 184, 63–72.
- Femenia-Font, A., Merino, V., Rodilla, V., Lopez-Castellano, A., 2005. High-performance liquid chromatographic determination of sumatriptan after in vitro transdermal diffusion studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 621–626.
- Frenot, A., Chronakis, I.S., 2003. Polymer nanofibres assembled by electrospinning. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8, 64–75.
- Han, N., Johnson, J., Lannutti, J.J., Winter, J.O., 2012. Hydrogel–electrospun fiber composite materials for hydrophilic protein release. *J. Control. Release* 158, 165–170.
- Hearnden, V., Sankar, V., Hull, K., Vidović Juras, D., Greenberg, M., Kerr, R., Lockhart, P.B., Patton, L.L., Porter, S., Thornhill, M.H., 2012. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 16–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.008>.
- Huang, L.-Y., Branford-White, Ch., Shen, X.-X., Yu, D.-G., Zhu, L.-M., 2012. Time-engineering biphase drug release by electrospun nanofiber meshes. *Int. J. Pharm.* 436, 88–96.
- Imitrex® – Product Monograph, 2013. Glaxo Smith Kline Inc. <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Imitrex.pdf> (10.7.13).
- Jirsak, O., Sanetnik, F., Lukas, D., Kotek, K., Martinova, L., Chaloupek, J., 2005. U.S. Patent No. WO 205024101.
- Kenawy, E.R., Bowlin, G.L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D.G., Sanders, E.H., Wnek, G.E., 2002. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *J. Control. Release* 81, 57–64.
- Kenawy, E.-R., Abdel-Hay, F.I., El-Newehy, M.H., Wnek, G.E., 2007. Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. *Mater. Sci. Eng. A* 459, 390–396.
- Kim, K., Luu, Y.K., Chang, C., Fang, D.F., Hsiao, B.S., Chu, B., Hadjiargyrou, M., 2004. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J. Control. Release* 98, 47–56.
- Leung, V., Ko, F., 2011. Biomedical applications of nanofibers. *Polym. Adv. Technol.* 22, 350–365.
- Madhaviyana, K., Sridharb, R., Sundarrajnab, S., Venugopala, J.R., Ramakrishna, S., 2013. Vitamin B<sub>12</sub> loaded polycaprolactone nanofibers: a novel transdermal route for the water soluble energy supplement delivery. *Int. J. Pharm.* 444, 70–76.
- Maretschek, S., Greiner, A., Kissel, T., 2008. Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. *J. Control. Release* 127, 180–187.
- Meinel, A.J., Germershaus, O., Luhmann, T., Merkle, H.P., Meinel, L., 2012. Electrospun matrices for localized drug delivery: current technologies and selected biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81, 1–13.
- Nagy, Z.K., Nyúl, K., Wagner, I., Molnár, K., Marosi, G., 2010. Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of Donepezil HCl. *Express Polym. Lett.* 4, 763–772.
- Nagy, Z.K., Balogh, A., Vajna, B., Farkas, A., Patyi, G., Kramarics, A., Marosi, G., 2012. Comparison of electrospun and extruded Soluplus®-based solid dosage forms of improved dissolution. *J. Pharm. Sci.* 101, 322–332.
- Natu, M.V., de Sousa, H.C., Gil, M.H., 2010. Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers. *Int. J. Pharm.* 397, 50–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.045>.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Toribio, L., Martín, M.T., Diez, F.J.J., 2002. Development and validation of an LC assay for sumatriptan succinate residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals. *Pharm. Biomed. Anal.* 30, 285–291.
- Patel, V.F., Liu, F., Brown, M.B., 2011a. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J. Control. Release* 153, 106–116.
- Patel, P., Makwana, S., Jobanputra, U., Ravat, M., Ajmera, A., Patel, M., 2011b. Sublingual route for the systemic delivery of ondansetron. *Int. J. Drug Dev. Res.* 3, 36–44, <http://www.ijddr.in/Documents/2/5.pdf>
- Ramdan, N.M., Buchanan, T.M., 2006. New and future migraine therapy. *Pharmacol. Ther.* 112, 199–212.
- Reneker, D.H., Chun, I., 1996. Nanometre diameter fibres of polymer produced by electrospinning. *Nanotechnology* 7, 216–223.
- Sell, S.A., McClure, M.J., Garg, K., Wolfe, P.S., Bowlin, G.L., 2009. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 1007–1019.
- Srikar, R., Yarin, A.L., Megaaridis, C.M., Bazilevsky, A.V., Kelley, E., 2008. Desorption-limited mechanism of release from polymer nanofibers. *Langmuir* 24, 965–974.
- Stranska, D., Klabanova, D., Dolezal, P., Vrbata, P., Berka, P., Musilova, M., 2012. CZ Patent No. 303244 B6.
- Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., Supaphol, P., 2006. Drug loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* 17, 2317–2329.
- Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., Supaphol, P., 2007. Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofibers mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 387–397.
- Xu, X., Chen, X., Wang, Z., Jing, X., 2009. Ultrafine PEG–PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro cytotoxicity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 18–25.
- Yu, D.G., Gao, L.-D., White, K., Branford-White, Ch., Lu, W.-Y., Zhu, L.-M., 2010a. Multicomponent amorphous nanofibers electrospun from hot aqueous solutions of a poorly soluble drug. *Pharm. Res.* 27, 2466–2477.
- Yu, D.-G., Yang, J.-M., Branford-White, Ch., Lu, P., Zhang, L., Zhu, L.-M., 2010b. Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. *Int. J. Pharm.* 400, 158–164.
- Zhang, X., Reagan, M.R., Kaplan, D.L., 2009. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 988–1006.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

Pharmaceutical nanotechnology

## Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption

Petr Vrbata<sup>a</sup>, Pavel Berka<sup>a</sup>, Denisa Stránská<sup>b</sup>, Pavel Doležal<sup>a,\*</sup>, Milan Lázníček<sup>c</sup><sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech republic<sup>b</sup> Elmarco Ltd.Co., Liberec, Czech Republic<sup>c</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 May 2014

Received in revised form 10 July 2014

Accepted 11 July 2014

Available online 24 July 2014

## Keywords:

Electrospinning

Diosmin

Nanofibre

Solubility

Oral bioavailability

## ABSTRACT

A nanofibrous membrane carrier for nearly water insoluble drug diosmin was formulated. The aim of this study was to evaluate the drug release and dissolution properties in an aqueous buffer of pH 7.8, and to compare the suitability of the drug carrier with the available drug forms and screen diosmin absorption extent.

The membranes were produced from HPC/PVA/PEO-drug water solutions and then evaluated by SEM and DSC measurements. The results showed that diosmin was incorporated within the nanofibers in an amorphous state, and/or as a solid dispersion. The results of *in vitro* release experiments except a very fast release of the drug, followed by the formation of an over saturated solution and partial precipitation of the drug (a "spring" effect). The enormous increases in dissolution of the drug from a nanofibrous carrier, compared to a micronized and crystalline form, was achieved. The *in vivo* bioavailability study carried out on rats showed higher initial drug plasma levels and higher AUC values after administration of the nanofibrous drug formulation, compared to the micronized form. The results of the study demonstrated that the improvement of the diosmin *in vitro* dissolution also brought the enhanced *in vivo* absorption extent of the drug.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Solubility is a crucial limiting characteristic for many potentially efficient drugs, because poor dissolution in an aqueous medium leads to low and variable bioavailability (BA) following oral intake, and incomplete attainment of the required therapeutic concentration in the target tissue. Recently, about 40% of drugs being used, and 90% being developed, are hydrophobic, and thus minimally soluble in water (Babu and Nangia, 2011; Yu et al., 2010). Approaches to increase the solubility and absorption extent of poorly water-soluble drugs are therefore of great importance for drug formulation development.

The most commonly used method for improving solubility is the formation of salts, but this approach has many limitations, and cannot be used for non-ionisable compounds. Further employed methods include chemical ones, e.g. pro drug formulation, complexation and physico-chemical ones e.g. particle size reduction (micro, nano sizing), micellization, use of solubilizers, solid dispersion formulations (hot melts, spray drying) (Huang and Dai, 2014; Linn et al., 2012; Merisko-Liversidge et al., 2003), and the

recently intensively studied electrospinning (Ignatious et al., 2010; Nagy et al., 2012; Yu et al., 2010).

Electrospinning (ES) is a simple, broadly applicable method, using electrostatic force to form polymeric fibres with a diameter size in the nanometer scale (Rutledge and Fridrikh, 2007). The formulated nanomaterial is endowed with several advantageous properties, primarily a great surface area to volume ratio, high mechanical strength, high porosity, and structural similarity to an extracellular matrix (Chakraborty et al., 2009).

The enormous surface area, compared to volume, pre-determines nanofibrous materials for the formulation of drug release carriers. Nanofibres proved to be suitable for embedding drugs, as a lot of them have been successfully incorporated and released from nanofibrous mats forming oral (Yu et al., 2009), sublingual (Vrbata et al., 2013), transdermal (Madhaiyan et al., 2013), vaginal (Huang et al., 2012), or local (Chen et al., 2012) drug delivery systems. Moreover, high molecular weight substances, such as proteins (Charemsriwilaiwat et al., 2012), DNA (Kim and Yoo, 2010), and also living cells (Townsend-Nicholson and Jayasinghe, 2006) were electrospun and released from the fibres, preserving their biological activity and/or viability.

Over the last few years, it has been proved that substances incorporated inside nanofibrous materials by ES process are in non-crystalline, i.e. in an amorphous state or molecularly

\* Corresponding author. Tel.: +420 495067438; fax: +420 495518002.  
E-mail address: [dolezal@faf.cuni.cz](mailto:dolezal@faf.cuni.cz) (P. Doležal).

dispersed, probably due to the very fast evaporation of solvents during the ES process (Ignatiou et al., 2010; Nagy et al., 2012; Verreck et al., 2003; Vrbata et al., 2013; Yu et al., 2010, 2009). Also, new possibilities were demonstrated for preparing structured nanofibers using coaxial ES process (Yu et al., 2012, 2011). Moreover, to upscale production to an industrial level, thanks to several types of mass production devices, have been shifting nanofibre based products closer to commercial processing (Persano et al., 2013).

Diosmin (Fig. 1) is a naturally occurring member of the flavonoid family. It is mostly derived from hesperidin, gathered from citrus rinds. A combination of micronized diosmin with hesperidin is used in the treatment of venous diseases (haemorrhoidal disease, chronic venous insufficiency, lymphoedema, and varicose veins). Diosmin also exhibits anti-inflammatory, free-radical scavenging, and anti-mutagenic properties (Diosmin, 2004).

Pharmacokinetics of diosmin as a nearly water insoluble compound includes transformation to its aglycone diosmetin by bacteria inside the intestine, followed by rapid absorption and distribution throughout the body (Diosmin, 2004; Serra et al., 2008). Diosmin itself was not detected in the systemic circulation, and probably does not permeate the gastrointestinal barrier (Serra et al., 2008).

The previous studies verified that the micronization process improved the extent of diosmin/diosmetin absorption (Garner et al., 2002). A further decrease in particle size or increase in dissolution of this poorly water soluble substance could probably lead to increased BA.

Hydroxypropyl cellulose (HPC) was selected as a carrier polymer because it is a well-accepted polymer for pharmaceutical use and is soluble in water. The polymer mixture in our study was based on experimental findings with the ES processing of hydroxypropyl cellulose, when the addition of polyethylenoxide (PEO) resulted in high nanofibre yield and low fibre diameter (Francis et al., 2010). The addition of well water soluble and well spinnable polymer polyvinyl alcohol (PVA) to the HPC/PEO polymer system was used to additionally improve fibre formation and the dissolution of drugs from the polymeric carrier.

HPC has been also reported to work as a precipitation inhibitor in supersaturated solutions (Warren et al., 2010) which might be favourable in a dissolution of poorly soluble drugs from nanofibrous carrier.

The main task of this study was to prepare diosmin-loaded nanofibrous mats by ES from aqueous solutions, to evaluate the dissolution of the drug from such a formulation, and compare it with currently commercially available diosmin preparations.

A pilot in vivo experiment performed on rats was intended to screen the BA of the prepared diosmin formulation.

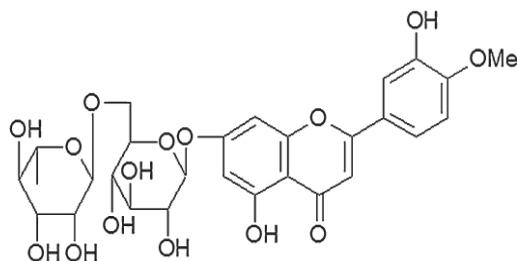


Fig. 1. Structure of diosmin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Diosmin was purchased from Sigma–Aldrich (Prague, CZ), and Diosmetin from Abcam Biochemicals (Cambridge, UK). Polyethylenoxide (PEO, Mw 400,000) was purchased from Scientific Polymer Products (New York, USA), hydroxypropyl cellulose (HPC, Mw 100,000) from Acros Organics (Pardubice, CZ), polyvinylalcohol (PVA, type Z 220, viscosity of 4 wt% water solution at 20 °C 11.5–15 mPa s) from Nippon Gohsei (Düsseldorf, GE). Potassium hydroxide (KOH), hydrochloric acid, phosphoric acid, ammonium, sodium hydrogen phosphate, and sodium dihydrogen phosphate were supplied by Penta Chemicals (Prague, CZ). Methanol and acetonitrile for HPLC were supplied by Fisher Scientific (Pardubice, CZ). The aqueous solutions were prepared with purified water.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Preparation of electrospun membranes

The nanofibrous mats were produced by electrospinning from aqueous polymer solutions, using Nanospider™ technology (Jirsak et al., 2005).

The ES solution consisted of hydroxypropyl cellulose (HPC), polyvinyl alcohol (PVA), and polyethylenoxide (PEO) in the ratio of 45:47.5:7.5. All the polymers used were separately dissolved in purified water, and then mixed together to form a clear viscous solution and the final concentration of polymers in the solution was 10% (4.5% HPC, 4.75% PVA and 0.75% PEO).

Diosmin was dissolved in a concentrated solution of KOH, and then added into the above mentioned polymer solution in the concentrations of 15, 23, and 30 wt% related to the mass of polymers. Highly concentrated solutions of diosmin were additionally sonicated to achieve the complete dissolution of diosmin.

A rotating metal cylinder immersed inside the electrospinning solution was used as a spinneret. The distance between the collector and the cylinder surface was set to 14 cm. After the application of a high voltage (60 kV), nanofibres were formed from the liquid surface, drawn up, and collected on a spunbond textile covering the collector plate. The nanofibrous layer thickness was determined by the speed of the spunbond textile movement, and 3 thicknesses (approx. 5, 10, 20 g/m<sup>2</sup>) for each diosmin concentration were prepared.

#### 2.2.2. Characterization

The morphology of the prepared nanofibrous membranes was evaluated by scanning electron microscopy using a NOVA Nano-Sem 230 (FEI, USA), with a maximal resolution of up to 1.3 nm at 30 kV, and magnification of up to 1,000,000 times.

The differential scanning calorimetry (DSC) analyses were carried out using a 200 F3 MAJA calorimeter (NETZSCH, Germany). Samples were heated at the pace of 10 °C/min from 25 °C to 300 °C. The nitrogen gas flow rate was set to 40 mL/min.

#### 2.2.3. Drug release experiments

The drug release experiments were conducted in a water bath, under a constant temperature (36.5 ± 0.5 °C), and permanent stirring (magnetic stirring bars, 200 rpm). The pieces of membranes (approx. 5 mg) were precisely weighed and placed inside vials. The vials were filled with 10 mL of temperate acceptor phase (phosphate buffer pH 7.8), and placed inside the water bath. Samples of the acceptor phase (0.6 mL) were taken in predetermined time intervals, filtered using a 220 nm filter, and the withdrawn volume was replaced with a fresh buffer. The samples

were briefly stored in a refrigerator until the HPLC determination of the diosmin content.

All measurements were performed in triplicate, and the presented values were calculated as the means and their standard deviations.

#### 2.2.4. Drug determination

The concentrations of the monitored drugs in the samples were determined using an HPLC set Agilent 1200 series from Agilent Technologies (USA), equipped with an isocratic pump G1310A, an ALS1329A auto sampler, and a VWD G1414B UV-vis detector.

Diosmin Prior to the analysis, the samples were mixed (1:1) with KOH (0.1 mol/L) to prevent drug crystallization during the analysis.

The mobile phase used was a mixture of water and methanol (51:49, V/V). The separation was carried out at 35 °C on a reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm), packed with 5 μm C18 silica particles (Zorbax Eclipse Plus C18). The isocratic mobile phase flow was optimized to 1.3 mL per minute, the injected volume was 20 μL, and the detection wavelength was set to 270 nm.

Diosmetin The method for evaluation of the drug plasma levels was derived from a published study with similar flavonoids (Hu et al., 2010). In short: a 200 μL plasma sample, 100 μL hydrochloric acid (10 mol/L), and 200 μL methanol were accurately added to a test tube. The tube was sealed with a lid, and vortexed for 30 s. The mixture was hydrolysed at 90 °C for 120 min, then cooled to room temperature, and 50 μL of ammonia (15 mol/L) was added to terminate the reaction. The mixture was extracted with 4 mL of methanol, vortexed for 2 min, sonicated for 30 min, and then centrifuged at 3000 rpm for another 20 min (all steps at room temperature). The supernatant (3.5 mL) was withdrawn and evaporated to dryness, and the obtained residue was dissolved in 400 μL of methanol, vortexed for 2 min, and then centrifuged at 5000 rpm for 10 min. Finally 40 μL of the supernatant was injected into the HPLC system for the analysis.

The mobile phase consisted of acetonitrile and sodium dihydrogen phosphate (0.02 mol/L) in the ratio of 35:65 (V/V), pH was adjusted to 2.0 with phosphoric acid. Separation was carried out on a reverse-phase column (150 mm × 4.6 mm), packed with 5 μm C18 silica particles (Zorbax Eclipse XDB C18). The detection wavelength was set to 351 nm.

#### 2.2.5. Pilot in vivo bioavailability test

2.2.5.1. *Animals.* Animal studies were conducted using male and female Wistar rats (BioTest, Konarovice, Czech Republic) weighing 300–350 g. Before the experiment, the rats were maintained in standard animal facilities that complied with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for

Experimental and Other Scientific Purposes. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, in accordance with the rules of the State Central Committee for Animal Protection of the Czech Republic. The animals were fasted overnight before the experiment (to empty the bowels), but had free access to water.

2.2.5.2. *Pharmacokinetic analysis.* Pharmacokinetic studies were performed in six animals. Rats were anaesthetized with pentobarbital (50 mg/kg intraperitoneally) and diosmin formulations under study (either the aqueous suspension of micronized diosmin or the nanofibrous diosmin form) were administered to animals orally with cannula in the dose of 3.5 mg of diosmin. Rats were then fixed to the operating table and the carotid artery was cannulated for repeating blood collection. During the experiment, the cannula was rinsed with about 50 IU of heparin in saline immediately after taking blood sample. At selected times after dosing, blood samples (approximately 0.6 mL) were withdrawn from the artery by means of cannula into glass tubes containing dried heparin and the plasma was immediately separated by centrifugation for 1 min at 3000 rpm. The plasma samples were then assayed for the drug concentration.

2.2.5.3. *Pharmacokinetic parameters.* Diosmetin plasma concentrations in each time interval were expressed as means ± standard deviations and the differences between both diosmin formulations were statistically evaluated by the *t*-test. The plasma concentration data of diosmetin for the individual rats were curve-fitted by a non-linear last-square regression to calculate the basic pharmacokinetic parameters of both the diosmin formulations.

The maximum plasma concentrations ( $C_{max}$ ) and time to reach them ( $t_{max}$ ) were obtained directly from the graph of plasma concentration–time dependence. The area under the curve (AUC) values were calculated for each animal in the time period 0.25–2 h.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Scanning electron microscopy

The nanofibrous membranes were prepared with three different drug concentrations, and in each concentration 3 different thicknesses of nanofibrous layer were formulated by ES. The fibrous mats were analysed by the scanning electron microscope (SEM) for average fibre diameter and uniformity of the membrane fibres. The measurement confirmed that the diameters of the membrane nanofibres were within the nanometre scale, and of a good shape and fibre of diameter homogeneity (Fig. 2).

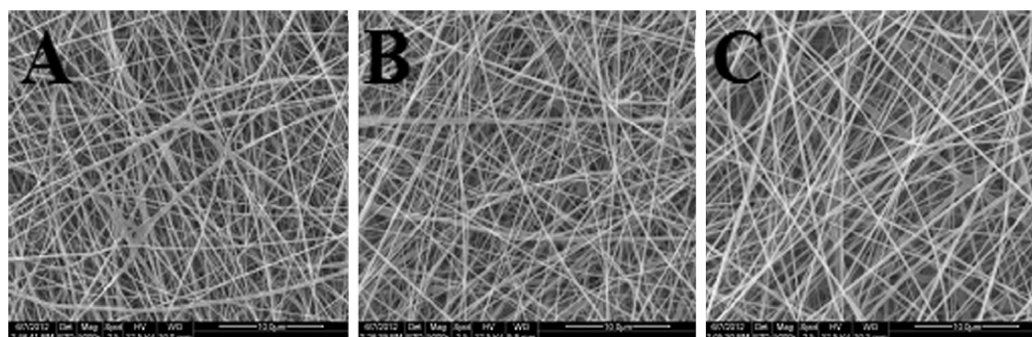


Fig. 2. SEM images of the prepared nanofibrous membranes containing: A: 15% of diosmin; B: 23% of diosmin; C: 30% of diosmin.

Regular morphology of nanofibres shown by SEM indicates a successful encapsulation of the drug without any damaging of smooth nanofibre surfaces.

With the increase of the drug concentration and nanofibrous layer thickness, structural defects (thicker-connected fibres) were observed. The highest concentration of diosmin within the nanofibres was found to be around 30% of the membrane mass in the case of the polymers used. Above this concentration value, the drug was hardly soluble in the liquid polymer system, and the solution was highly viscous and difficult to electrospin.

### 3.2. DSC

The physical state of the carrier polymers and the incorporated drug were investigated by the DSC measurement. The thermogram of crystalline diosmin exhibits a strong endothermic peak at 268 °C, while no melting peak of the drug was found on the thermograms of the nanofibrous membranes (Fig. 3). It proves that no crystalline form of diosmin is present in the nanofibres. The drug is probably present in an amorphous state, and/or as a solid dispersion. Both of these possibilities are usually considered to be advantageous for enhancement of the drug solubility.

### 3.3. Release of diosmin from nanofibrous membranes

The release of diosmin content was conducted in a phosphate buffer of pH 7.8 to simulate an intestinal environment, where most of the drug is absorbed (Serra et al., 2008). The different approach was chosen comparing a recent study dealing with nanoparticles containing diosmin, where the “artificial” pH 12 was used for dissolution experiments (Freag et al., 2013), and our obtained data has a better correlation to the in vivo situation.

Diosmin showed very fast drug release from the water soluble nanofibrous carrier, reaching the highest concentrations of the dissolved drug within the initial 5–10 min of the experiments.

The highest amount of the drug dissolved was achieved with mats containing 30% of the drug incorporated, where up to 75% of the drug loaded by ES was detected in the acceptor phase.

The release curve shapes were unaffected, neither by the concentration of the drug incorporated, nor by the nanofibrous layer thickness (experimental scale: 5–20 g/m<sup>2</sup>). The amounts of diosmin released and subsequently dissolved in the acceptor also differed only by a few percent when comparing membranes with various concentrations of the drug loaded (Fig. 4). The finding is important for further formulation of delivery systems, because the data obtained showed that higher drug concentration resulted in

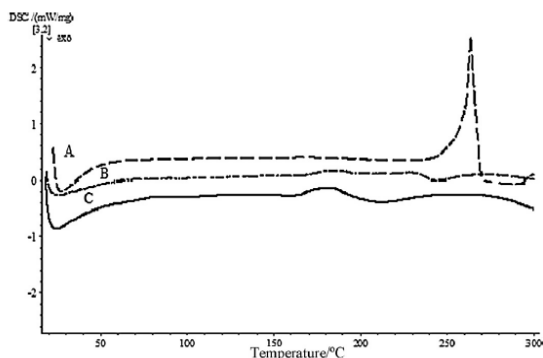


Fig. 3. DSC profiles of A: diosmin powder; B: nanofibrous membrane containing 15% of diosmin; C: nanofibrous membrane containing 30% of diosmin.

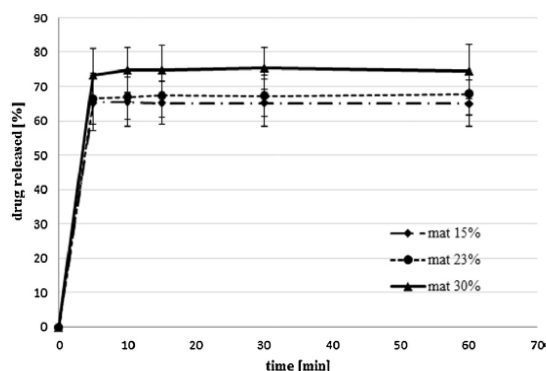


Fig. 4. Release of diosmin from nanofibrous membranes containing 15, 23 or 30% of the drug incorporated.

the same or a higher dissolution extent, and the increase in nanofibrous layer thickness did not affect the dissolution rate.

The first release experiments showed that shortly after the immersion of membranes, highly oversaturated solutions of diosmin were obtained, which started to precipitate after 10–15 min, and thus the concentration of the dissolved drug decreased. The situation was assessed as an example of a “spring” effect, which is typical with fast formation of a supersaturated aqueous solution, and almost immediate precipitation of the drug (its short-lived metastable form) (Babu and Nangia, 2011; Xua and Dai, 2013). HPC used in the formulation works also as a precipitation inhibitor (Warren et al., 2010) and probably contributes to delay the diosmin precipitation. Further improvement can be achieved by addition of another drug precipitation inhibitor (e.g. cyclodextrins, PVP) to the nanofibrous formulation at electrospinning (Xua and Dai, 2013) (Fig. 5).

To overcome the experimental limitation and to maintain sink conditions, three quarters of the acceptor phase volume were withdrawn and replaced with fresh medium after 5 min of the experiment (this step was taken into account for further data treatment).

The released drug under in vivo conditions in the gastrointestinal tract would be dispersed to higher volumes, then continuously aglyconated and absorbed. That is why the above mentioned oversaturation and drug precipitation is not expected to play a significant role as for in vitro conditions.

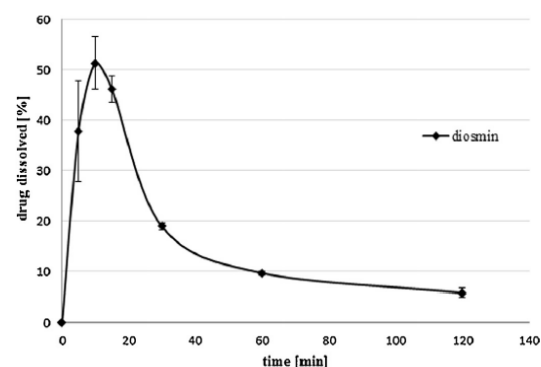


Fig. 5. Release of diosmin from nanofibrous membranes (a “spring” effect).



From the point of a view of drug delivery formulation, it would be favourable to release diosmin directly inside an intestine to obtain direct contact of the drug with the absorption area. The highly alkaline conditions of the drug–polymer solution used for ES (diosmin is soluble in alkaline pH) allow to add or exchange polymer, for instance for cellulose acetate phthalate, or hydroxypropyl cellulose phthalate, that would improve membranes in the term of solubility at the specific pH, and so the possibility to target the delivery of diosmin directly to a small intestine.

The nanofibrous drug carriers might also be incorporated in tablets or included inside hard capsules with enteric coatings, to form a final oral delivery system with advanced dissolution properties.

### 3.3.1. Dissolution of diosmin from three different drug formulations

For the purpose of comparing of in vitro dissolution of diosmin, three different forms were tested—powdered drug, micronized diosmin powder (commercially available tablets), and diosmin loaded nanofibrous membranes.

The results obtained in vitro showed a great increase in the dissolution rate and extent of diosmin using the nanofibrous membrane carrier. The differences were clearly visible during a dissolution experiment, as documented in Fig. 6. The dissolution medium with a diosmin nanofibrous membrane donor become transparent yellowish in a minute, whilst the vials with the content of micronized and powdered diosmin seemed to be white due to suspended undissolved diosmin particles.

The lowest (almost undetectable) concentration of the dissolved drug was obtained by measuring the powdered drug, the micronized diosmin form showed a very light improvement in dissolution, i.e. below one percent of the drug administered was dissolved. On the contrary, the nanofibrous membrane carrier provided about 70% of the incorporated drug dissolved in the release medium (Fig. 7).

Such a high improvement in drug dissolution was achieved by a combination of physico-chemical factors increasing the drug solubility. The surface-to-volume ratio comes clearly in first place. The second, and probably more important, factor is the non-crystalline state of diosmin present inside nanofibres.



Fig. 6. Visible differences in the macroscopic appearance of the tested diosmin samples in the buffer medium pH 7.8; vials with the content of diosmin dissolved from nanofibrous membrane are transparent – yellowish (in the front and right side), versus vials with only suspended (undissolved) white diosmin particles of both the powders tested.

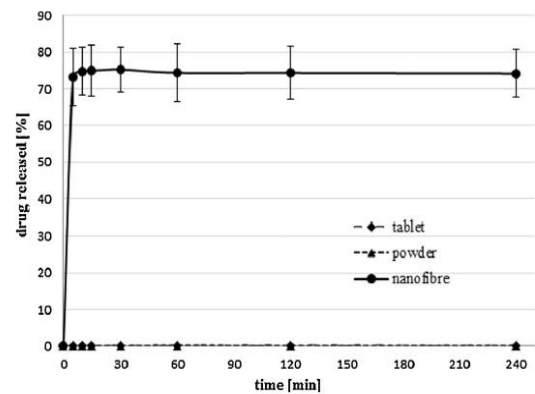


Fig. 7. Comparison of diosmin dissolution from 3 different formulations – powdered drug, micronized form, and nanofibrous membranes.

In agreement with previous theoretical descriptions (Verreck et al., 2003; Yu et al., 2009) the existence of a drug in an amorphous state and/or molecularly dispersed in polymer nanofibres is realized. The concept of nanofibres seems to be not only an advantageous combination of both the characteristics mentioned above. Another added value is connected with protection of the drug substance in thermodynamically unstable amorphous state against agglomeration and crystallization. Moreover, such a solid in solid disperse nanofibrous system makes possible fast and extended solvent reach to a drug in the course of the first phase of dissolution. Electrospinning allowed combining these solubility enhancing factors in a one-step process, leading to an enormous dissolution improvement.

The dissolution tests were also performed with higher drug amounts and a greater volume (250 mL) of the dissolution medium to verify the obtained data with the same outcomes as previously described.

### 3.4. In vivo bioavailability study

A pilot oral bioavailability study carried out on rats was performed primarily to obtain the first opinion on generally known differences between positive in vitro dissolution results obtained for low soluble drugs, followed by disappointment from

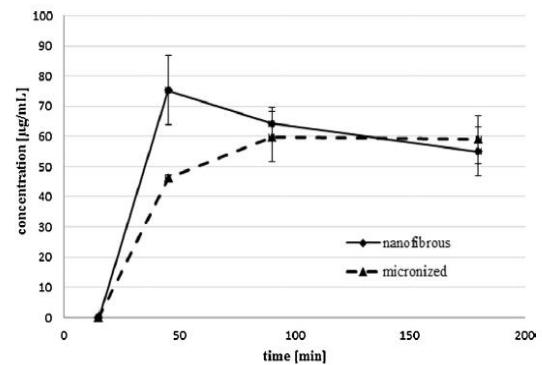


Fig. 8. Diosmin plasmatic concentrations. After administration of single dose (3.5 mg) of micronized X nanofibrous diosmin forms. (Graph constructed with initial 15 min lag time) We must keep in mind the preliminary character of these results, however, all the mentioned values have signalled an improvement in oral drug absorption, and encourage further BA experiments.

**Table 1**  
The results of the in vivo bioavailability experiment.

Diosmin	$t_{max}$ (min)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$AUC_{15-180\text{ min}}$	$C_{45\text{ min}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Nanofibrous	45	75.2 $\pm$ 11.4	160.6 $\pm$ 6.8	75.2 $\pm$ 11.4
Micronized	90	59.9 $\pm$ 8.4	140.4 $\pm$ 15.2	46.1 $\pm$ 1.3

consequent bioavailability measurements. The situation was described many times, recently for example for nanocrystals of itraconazole (Sarnes et al., 2014).

The results of the in vivo experiment showed the higher initial plasma levels using nanofibrous diosmin membranes, compared to the micronized form of the drug (Fig. 8). The maximal plasma concentration ( $C_{max}$ ) was statistically different only 45 min after the administration, and was significantly higher in the case of nanofibrous carrier. The cumulative absorption extent was also slightly improved by the use of nanofibrous drug form (in the period of the experiment). The results are summarized in Table 1.

The obtained high initial plasma levels of the drug would be very favourable for other drugs where a rapid onset of drug action is desired (e.g. anti-migraine, painkillers). In the case of diosmin, more important is the achieved higher absorption extent. The analytical method used, allowed to quantify the total amount of diosmetin absorbed by the animals (dissolved in plasma, and also bound to plasmatic proteins), showing much higher diosmetin concentrations than in previously published literature (Kanaze et al., 2004; Spanakis et al., 2009) (due to high plasma proteins bonding and metabolism). The method was for the first time adopted for diosmin–diosmetin determination and seems very promising for quantification of diosmin–diosmetin bioavailability.

We must keep in mind the preliminary character of these results, however, all the mentioned values have signalled an improvement in oral drug absorption, and encourage further BA experiments.

#### 4. Conclusions

In the study, diosmin-loaded nanofibrous membranes were formulated by an industrial scale electrospinning method from aqueous polymer–drug solutions. The drug was incorporated inside the polymeric nanofibers without any crystalline phase, an amorphous form or a solid non-crystal homogeneous dispersion of the drug was prepared.

Very fast release of the drug from the nanofibrous carrier was obtained as expected. Neither the increase in nanofibrous layer thickness nor the drug concentration inside fibres did affect the dissolution rate.

Under conditions simulating intestinal fluids with a pH 7.8, the dissolution rate and extent of diosmin was increased by orders of magnitude with the use of the nanofibrous form comparing to a powdered drug as well as a commercially available micronized form.

The bioavailability experiment showed higher initial drug plasma levels, and a higher absorption extent of the drug following oral administration.

Nanofibrous carriers formulated by electrospinning proved a great potential for the improvement of the solubility, and absorption extent of poorly water soluble drugs.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Marie Musilová and Mrs. Jarmila Hoderová for their help during the experiments and Dr. Pavel Hoder for his initiative impulses. The authors are also very thankful for financial support of the study by Grant SVV 260 062 of

the Ministry of Education of the Czech Republic and No. 530812/2012 of Grant Agency of Charles University.

#### References

- Babu, N.J., Nangia, A., 2011. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 11, 2662–2679 doi:http://dx.doi.org/10.1021/cg200492w.
- Chakraborty, S., Liao, I.-C., Adler, A., Leong, K.W., 2009. Electro hydrodynamics: a facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 1043–1054 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.013.
- Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., 2012. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. *Int. J. Pharm.* 427, 379–384 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.010.
- Chen, D.W., Liao, H.-Y., Hsu, Y.-H., J.-Y. Liu S.-J., Chen, J.-K., Ueng, S.W.-N., 2012. Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. *Int. J. Pharm.* 430, 335–341 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.010.
- Diosmin, 2004. *Altern. Med. Rev.* 9, 308–311.
- Francis, L., Balakrishnan, A., Sanosh, K.P., Marsano, E., 2010. Characterization and tensile strength of HPC–PEO composite fibers produced by electrospinning. *Mater. Lett.* 64, 1806–1808 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2010.05.043.
- Freag, M.S., Elnaggar, Y.S.R., Abdallah, O.Y., 2013. Development of novel polymer-stabilized diosmin nano suspensions: in vitro appraisal and ex vivo permeation. *Int. J. Pharm.* 454, 462–471 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.039.
- Garner, R.C., Garner, J., V. Gregory, S., Whattam, M., Calam, A., Leong, D., 2002. Comparison of the absorption of micronized (daflon 500mg) and non-micronized C-diosmin tablets after oral administration to healthy volunteers by accelerator mass spectrometry and liquid scintillation counting. *J. Pharm. Sci.* 91, 32–40.
- Hu, J., Zhao, Y., Ma, C., Wang, W., Xing, D., Du, L., 2010. Acid hydrolytic method for determination of Ginkgo biloba total flavonoids in rat plasma by HPLC for pharmacokinetic studies. *Tsinghua Sci. Technol.* 15, 452–459 doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1007-0214(10)70087-0.
- Huang, C., Soenen, S.J., van Gulck, E., Vanham, G., Rejman, J., Van Calenberghe, S., Vervaeet, C., Coenye, T., Verstraelen, H., Temmerman, M., Demeester, J., De Smedt, S.C., 2012. Electrospun cellulose acetate phthalate fibers for semen induced anti-HIV vaginal drug delivery. *Biomaterials* 33, 962–969 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.004.
- Huang, Y., Dai, G., 2014. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharm. Sin.* B 4, 18–25 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2013.11.001.
- Ignatious, F., Sun, L., Lee, C.-P., Baldoni, J., 2010. Electrospun nanofibers in oral drug delivery. *Pharm. Res.* 27, 576–588 doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11095-010-0061-6.
- Jirsak, O., Sanetnik, F., Lukas, D., Kotek K., Martinova, L., Chaloupek, J., 2005. A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. WO2005024101
- Kanaze, F.I., Bounartzi, M.I., Niopas, I., 2004. A validated HPLC determination of the flavone aglycone diosmetin in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* 18, 800–804 doi:http://dx.doi.org/10.1002/bmc.391.
- Kim, H.S., Yoo, H.S., 2010. MMPs-responsive release of DNA from electrospun nanofibrous matrix for local gene therapy: in vitro and in vivo evaluation. *J. Control. Release* 145, 264–271 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.006.
- Linn, M., Collnot, E.-M., Djuric, D., Hempel, K., Fabian, E., Kolter, K., Lehr, C.-M., 2012. Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 336–343 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.11.025.
- Madhaiyan, K., Sridhar, R., Sundarajan, S., Venugopal, J.R., Ramakrishna, S., 2013. Vitamin B12 loaded polycaprolactone nanofibers: a novel transdermal route for the water soluble energy supplement delivery. *Int. J. Pharm.* 444, 70–76 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.040.
- Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., Cooper, E.R., 2003. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18, 113–120 doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(02)251-8.
- Nagy, Z.K., Balogh, A., Vajna, B., Farkas, A., Patyi, G., Kramarics, A., Marosi, G., 2012. Comparison of electrospun and extruded Soluplus®-based solid dosage forms of improved dissolution. *J. Pharm. Sci.* 101, 322–332 doi:http://dx.doi.org/10.1002/jps.22731.
- Persano, L., Camposo, A., Tekmen, C., Pisignano, D., 2013. Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: a review. *Macromol. Mater. Eng.* 298, 504–520 doi:http://dx.doi.org/10.1002/mame.201200290.
- Rutledge, G.C., Fridrikh, S.V., 2007. Formation of fibers by electrospinning. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1384–1391 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.020.
- Sarnes, A., Kovalainen, M., Häkkinen, M.R., Laaksonen, T., Laru, J., Kiesvaara, J., Ilkka, J., Oksala, O., Rönkkö, S., Järvinen, K., Hirvonen, J., Peltonen, L., 2014. Nanocrystal-based per-oral itraconazole delivery: superior in vitro dissolution enhancement versus Sporanox® is not realized in in vivo drug absorption. *J. Control. Release* 180, 109–116 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.02.016.
- Serra, H., Mendes, T., Bronze, M.R., Simplicio, A.L., 2008. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flava-

- ones. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 4009–4018 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.01.028>.
- Spanakis, M., Kasmaš, S., Niopas, I., 2009. Simultaneous determination of the flavonoid aglycones diosmetin and hesperetin in human plasma and urine by a validated GC/MS method: in vivo metabolic reduction of diosmetin to hesperetin. *Biomed. Chromatogr.* 23, 124–131 doi:<http://dx.doi.org/10.1002/bmc.1092>.
- Townsend-Nicholson, A., Jayasinghe, S.N., 2006. Cell electrospinning: a unique biotechnique for encapsulating living organisms for generating active biological microthreads/scaffolds. *Biomacromolecules* 7, 3364–3369 doi:<http://dx.doi.org/10.1021/bm060649h>.
- Verreck, G., Chun, I., Rosenblatt, J., Peeters, J., Dijk, A., Van Mensch, J., Noppe, M., Brewster, M.E., 2003. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J. Control. Release* 92, 349–360 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)342-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(03)342-0).
- Vrbata, P., Berka, P., Stránská, D., Doležal, P., Musilová, M., Čížinská, L., 2013. Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *Int. J. Pharm.* 457, 168–176 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.085>.
- Warren, D.B., Benameur, H., Porter, C.J.H., Pouton, C.W., 2010. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: a mechanistic basis for utility. *J. Drug Target.* 18, 704–731 doi:<http://dx.doi.org/10.3109/1061186X2010.525652>.
- Xu, S., Dai, W.-G., 2013. Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. *Int. J. Pharm.* 453, 36–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.013>.
- Yu, D.-G., Shen, X.-X., Branford-White, C., White, K., Zhu, L.-M., Bligh, S.W.A., 2009. Oral fast-dissolving drug delivery membranes prepared from electrospun polyvinylpyrrolidone ultrafine fibers. *Nanotechnology* 20, 55–104 doi:<http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/20/5/055104>.
- Yu, D.-G., Branford-White, C., White, K., Li, X.-L., Zhu, M., 2010. Dissolution improvement of electrospun nanofiber-based solid dispersions for acetaminophen. *AAPS PharmSciTech* 11, 809–817 doi:<http://dx.doi.org/10.1208/s12249-010-9438-4>.
- Yu, D.-G., Zhu, M., Branford-White, C.J., Yang, J.-H., Wang, X., Li, Y., Qian, W., 2011. Solid dispersions in the form of electrospun core-sheath nanofibers. *Int. J. Nanomed.* 6, 3271–3280 doi:<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S27468>.
- Yu, D.-G., Yu, J.-H., Chen, L., Williams, G.R., Wang, X., 2012. Modified coaxial electrospinning for the preparation of high-quality ketoprofen-loaded cellulose acetate nanofibers. *Carbohydr. Polym.* 90, 1016–1023 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.036>.

## MEDICATED NANOFIBRE MEMBRANES FOR SUBLINGUAL DRUG DELIVERY

P. Vrbata<sup>1</sup>, D. Stránská<sup>2</sup>, P. Berka<sup>1</sup>, P. Doležal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Technology. <sup>2</sup>Elmarco Ltd. Co., Liberec, Czech Republic

### INTRODUCTION

Sublingual administration rises in importance recently mostly because of many advantages connected with this place. The most common sublingual dosage forms are fast disintegrating sublingual tablets, sprays and gels. Nowadays, there are already available several new oral strips and sublingual wafers for systemic administration of drugs under the tongue. [1]

Nanofibres as fibres with diameter in sub-micrometer scale possess several unique and potentially advantageous properties for drug delivery. Among them namely great surface area to volume ratio could be the most promising for improvement of drug release. [3]

Nanofibre membranes are formed mostly by randomly oriented nanofibres and could be easily created by electrohydrodynamic process of electrostatic spinning. [2] During electrospinning nanofibres are created from solution or melt of polymer by applying high voltage to syringe or depot with polymer fluid. Nanofibres are created by evaporation of solvent during the flight to an oppositely charged collector. [2]

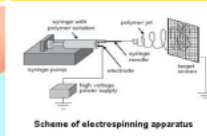
The aim of presented work is focused on employing of free liquid electrospinning technology (Nanospider™) for formulation of drug loaded nanofibre membranes usable for sublingual drug administration. The objective was to estimate the drug load capacity of nanofibre membranes produced from 3 different polymers and the release profiles of chosen drugs.

Fig. 1 Sublingual administration



- very thin mucosa
- good blood supply
- no first pass metabolism
- fast onset of action
- well accessible
- non-invasive

Fig. 2 Electrospinning—basic arrangement



Scheme of electrospinning apparatus

- fast, versatile technique
- usable for most of polymers
- easy to scale up (Nanospider™)
- great surface area to volume ratio
- amorphous state of nanofibres
- high mechanical strength

### MATERIALS AND METHODS

Sumatriptan succinate was donated from Teva pharmaceuticals, naproxen, naproxen sodium, polyacrylic acid (PAA) and polyvinylalcohol (PVA) was from Sigma Aldrich (CZ), caffeine was purchased from Dr. Kulich Pharma (CZ), poly(lactic acid) (PLA) from NatureWorks LLC (USA), polycaprolactone (PCL) from Scientific Polymer Products (USA) and chitosan from Fortis (CZ). All the chemicals were of pharmaceutical grade.

**Preparation of drug loaded nanofibre membranes** The nanofibre membranes were produced by electrospinning from polymer/drug solutions using the Nanospider™ allowing production of sufficient material quantities.

The aqueous solutions were prepared with purified water.

**Drug release** from medicated nanofibre membranes were conducted in a water bath under constant temperature (36.3±0.3°C) and permanent stirring. Pieces of unwoven textile 4x4cm were precisely weighed and placed inside vials 20mL in volume. Vials were filled with temperate buffer and placed inside a water bath.

**Drug permeation tests** were performed using porcine sublingual membrane obtained from fresh porcine tongue by surgical removing of muscles and connective tissue. The pieces of membrane 2x2cm (about 0.2mm in thickness) were cut and fixed between donor and acceptor compartment of Franz diffusion cells. Isonic phosphate buffer pH 7.4 was used as an acceptor phase. Drug permeation was evaluated from their saturated solutions and nanofibre membranes.

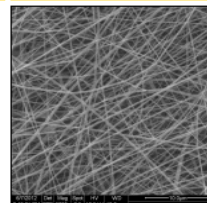
Samples of acceptor phase (0.3mL) were withdrawn in suitable time intervals, replaced with fresh buffer and then stored in a fridge until determination by HPLC (Agilent Technologies 1200).

All measurements were done in triplicate and in the cases of permeation experiments four replicates were performed.

Fig. 3 Formation of nanofibres by Nanospider



Fig. 4 SEM image of prepared nanofibre membrane



### Experimental steps:

1. Time-release data of caffeine, as a model drug, for several chosen polymers were evaluated.
2. The polymers showing suitable drug release profile and polymer formulation properties were then used for preparation of drug loaded membranes with sumatriptan succinate and/or naproxen sodium.
3. The membranes were evaluated for *in vitro* drug release and drug permeation using porcine sublingual membrane.

### RESULTS AND DISCUSSION

1. Very fast release profiles of caffeine from 3 (PAA, PVA, chitosan) of tested polymeric nanofibre membranes were obtained. About 90% of released drug was released within 10 minutes.
2. Maximum load capacity of drug in the membranes was found to be ca. 40 % of dry membrane weigh.
3. In most of cases about 30 % to 80 % of loaded drug was released.
4. The permeation tests showed faster onset of drug sublingual membrane permeation from the nanofibre membranes than using the saturated solution of sumatriptan succinate. Otherwise the release profiles proceeded similarly.

**Note:** In case of simultaneous release of naproxene and sumatriptane, best results were achieved when each drug was separated in own nanofibre layer of multi-layered nanofibre membrane.

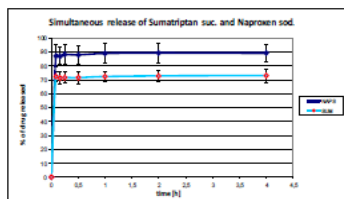


Fig. 6. The simultaneous release profiles of sumatriptan succinate and naproxene sodium from a multilayered chitosan nanofibre membrane

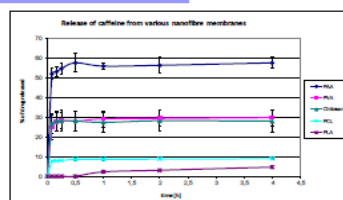


Fig. 5. The release of caffeine from nanofibre membranes containing caffeine electrospun from 3 different polymers

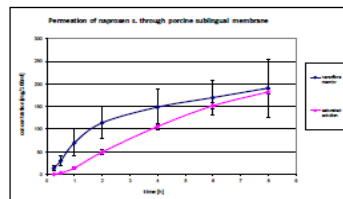


Fig. 7. The comparison permeation profiles of naproxen sodium through porcine sublingual membrane using a nanofibre membrane containing drug and a saturated drug solution. The values for a nanofibre membrane are scaled for the same initial dose.

### REFERENCES

- [1] Narang N. et al. (2011) Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3, 48-52
- [2] Frenot A. et al. (2003) Polymer nanofibres assembled by electrospinning. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 8, 64-75
- [3] Leung V. et al. (2011) Biomedical applications of nanofibers. *Polym. Adv. Technol.* 22: 350-365

### Acknowledgments

The study was supported by the grants No. SVV 263 001 of the Ministry of Education of the Czech Republic, No. MPO TFP-FR-TL/0436 of the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic and Zentiva Group, o.s. Prague.

### CONCLUSION

The prepared nanofibre membranes were smooth and flexible, applicable without mechanical resistivity and they possessed the drug release profiles in a range interesting for practical use.

These membranes showed a great potential and could be accepted as new drug delivery systems for oromucosal, especially sublingual systemic administration.

# Nanofibrous membranes for sublingual administration of sumatriptan



P. Vrbata,<sup>1</sup> D. Stránská,<sup>2</sup> P. Berka,<sup>1</sup> P. Doležal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Technology, <sup>2</sup>Elmarco Ltd. Co., Liberec, Czech Republic

## Introduction

Nanofibres as fibres with diameter size in sub-micron scale possess several unique and potentially advantageous properties. The most important ones for drug delivery are great surface area to volume ratio, high mechanical strength and amorphous state of electrospun nanofibres. [1]

Nanofibres could be easily fabricated by electro-hydrodynamic process - electrospinning. It is a fast, versatile technique usable for most polymers. During electrospinning nanofibres are created from solutions or melts of polymers by applying high voltage to syringe or depot with polymer fluid. Nanofibres formulate by evaporation of solvent during the flight to an oppositely charged collector, where they are collected and form nanofibrous membrane (Fig. 1). [2]

Recently many types of drugs were already incorporated and released from nanofibres without significant loss in their activity including also high molecular protein based substances.

Sublingual administration (Fig. 2) increases in importance mostly because of many advantages connected with this site (very thin mucosa, good blood supply, no first pass metabolism, fast onset of action, great accessibility, non-invasiveness). Furthermore, sublingual administration is very suitable for small children, elderly people and other patients with swallowing and digestion problems. [3] Sublingual dosage forms are mostly based on fast dissolving systems predominantly tablets, but several new products (i.e. wafers) were developed recently.

The aim of presented work is focused on employing of free liquid electrospinning technology (Nanospider<sup>TM</sup>) for formulation of drug loaded nanofibrous membranes usable for sublingual drug delivery of active pharmaceutical ingredients. Sumatriptan succinate as a potent anti-migraine drug was selected for the

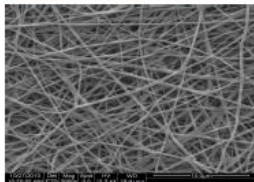


Fig. 1. SEM image: nanofibrous membrane



Fig. 2. Sublingual administration—conventional dosage form

## Materials and methods

Sumatriptan succinate was kindly donated by Teva pharmaceuticals, chitosan (CHI, Mw 60,000-120,000) were purchased from Sigma Aldrich (Frague, CZ), polyacrylic acid (PAA, Mw 430,000), was purchased from Scientific Polymer Products (New York, US), polyvinylalcohol (PVA, type 2 220, viscosity of 4% water solution at 20°C 11.3–13 mPa.s) from Nippon Gohsei (Düsseldorf, GE).

The drug loaded nanofibrous membranes were produced by electrospinning process from homogenous polymer - drug solutions using the Nanospider<sup>TM</sup> (Fig. 3) device allowing production of sufficient material quantities [4].

The drug release from medicated nanofibrous membranes were conducted in a water bath under constant temperature (36.5±0.3°C) and permanent stirring. Pieces of mats 3 × 4cm were precisely weighted and placed inside vials 20mL in volume. Vials were fulfilled with temperate buffer (PB, pH 7.4) and placed inside the water bath.

The drug permeation tests were performed using porcine sublingual membrane obtained from fresh porcine tongue by surgical removing of muscles and connective tissues. The pieces of processed membrane were cut and fixed between donor and acceptor compartments of diffusion cells (Fig. 4). isotonic phosphate buffer pH 7.4 was used as an acceptor phase. Drug permeation was evaluated from the drug solutions and selected nanofibrous membranes.

Samples of acceptor phase (0.6 mL) were withdrawn in suitable time intervals and volume replaced with fresh buffer. The samples were shortly stored in a fridge until HPLC determination (Agilent Technologies 1200) for sumatriptan content.

All measurements were done in triplicate and in the cases of the permeation experiments four replicates were performed. The values presented are calculated as the means and their standard error of the means.



Fig. 3. Formation of nanofibres by the Nanospider



Fig. 4. Permeation experiment

## Results and discussion

Homogeneous nanofibrous membranes containing sumatriptan succinate in amorphous state made of three different polymers were successfully prepared.

The structure and homogeneity of prepared membranes was verified using scanning electron microscopy (SEM) and differential scanning calorimetry (DSC).

Very fast release of sumatriptan succinate from prepared nanofibrous mats was obtained. All of the available amount of the drug was released within 10 minutes of the experiments. In the most of cases from about 50 % to 80 % of loaded drug was released from water insoluble membranes.

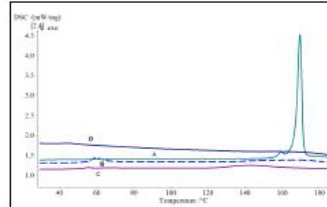


Fig. 5. DSC profiles of A: Sumatriptan succinate (crystalline powder), B: Nanofibrous membrane [PVA- sumatriptan 20%], C: Nanofibrous membrane (PVA), D: PVA powdered

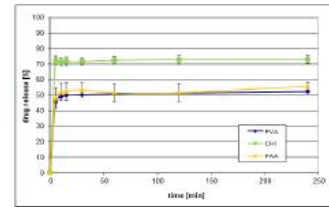


Fig. 6. Release of sumatriptan succinate from three different polymer nanofibrous membranes

Sumatriptan sublingual membrane permeation was tested with donor solutions with ascending concentrations of the drug and nanofibrous membranes. Slow and incomplete permeation of sumatriptan through porcine sublingual mucosa was observed using drug solutions.

Improvement in drug permeability using nanofibrous membranes as the donor was achieved. The permeation tests showed faster onset of drug sublingual membrane permeation from the nanofibrous membranes than using the saturated solution of sumatriptan succinate and the drug permeability increased several times comparing with drug solutions.

Permeation tests were conducted also with frozen sublingual mucosa showing much higher permeation rate of sumatriptan through such treated membrane.

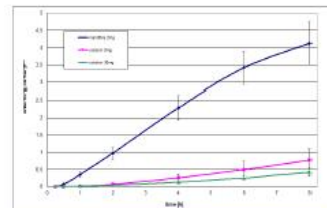


Fig. 7. Percentage amounts of SUS permeated using nanofibrous mat and solutions as sumatriptan donors.

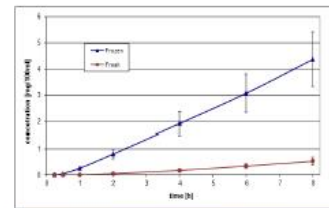


Fig. 8. Comparison in permeation rate of sumatriptan using frozen vs. fresh porcine sublingual membrane

## Conclusions

The prepared nanofibrous membranes were smooth and flexible, applicable without mechanical resistivity. The obtained release profiles of the drug from polymers tested fitted greatly for sublingual dosage form.

Sumatriptan permeation rate was improved several times with the use of nanofibrous membrane as the drug donor.

These membranes showed a great potential and could be accepted as new advantageous drug delivery systems for oromucosal, especially sublingual systemic and/or local drug administration.

### Acknowledgments

The study was supported by the grant GAUK 330812/2012 of the Grant Agency of Charles University in Prague and the project PRV00K 210/11/1111-2.

## References

- [1] Ignatious F., Sun L., Lee Ch-P., Baldoni J., Electrospun Nanofibers in Oral Drug Delivery, Pharm. Res. 27 (2010) 276-288
- [2] A. Frenot, I. S. Chronakis, Polymer nanofibres assembled by electrospinning, Curr. Opin. Colloid. Interface Sci. 8 (2003) 64–73
- [3] Heamdiin V. et al., New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease, Adv. Drug Deliv. Rev. 64 (1) (2012) 16-28
- [4] Jirsa O., Sanetrik F., Lukas D., Kotek K., Martihova L., Chloupek J., U.S. patent No. WO20024101 (2005)