

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE**



**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

**LIBERÁCIA KYSELINY LISTOVEJ Z MIKROVLÁKIEN  
NA BÁZE KYSELINY HYALURONOVEJ**

Autor: Mgr. Erik Köszegy

Obor: Farmaceutická technologie

Konzultant: doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

2018

## Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpal pri spracovávaní tejto práce, sú uvedené v zozname použitej literatúry a riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Bratislave dňa

Mgr. Erik Koszegy

## Podakovanie

Na úvod tejto práce by som chcel veľmi poďakovať doc. PharmDr. Zdeňke Šklubalovej, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu, cenné rady, pripomienky a podporu pri spracovávaní tejto rigoróznej práce, spoločnosti Contipro Biotech s.r.o., ktorá mi poskytla potrebné vybavenie a zázemie.

Ďalej by som rád poďakoval Ing. Jiřímu Běťákovi a Tomášovi Pituchovi za technickú pomoc v práci s dip-coating zariadením a za ich cenné rady a postrehy pri príprave mikrovlákien.

# Obsah

1 Abstrakt .....	6
2 Abstract .....	7
3 Zadanie .....	8
4 Zoznam symbolov a skratiek .....	9
5 Úvod.....	10
6 Teoretická časť.....	11
6.1 Biodegradabilné polymérne implantáty.....	11
6.1.1 Implantáty v liečbe nádorových ochorení.....	14
6.1.2 Implantáty v liečbe ostatných ochorení .....	17
6.2 Kyselina hyaluronová.....	18
6.3 Mikrovlákna .....	21
6.3.1 Mikrovlákna založené na HA .....	22
6.4 Vlákna pre medicínske textílie a biotextílie .....	23
6.5 Mokrú zvlákňovanie ( <i>wet spinning</i> ) .....	24
6.6 Metóda povrstvovania ( <i>dip-coating</i> ).....	25
6.7 Kyselina listová .....	30
6.8 Testovanie disolúcie .....	32
6.9 Disolúcia z polymérov.....	34
7 Experimentálna časť .....	39
7.1 Použité suroviny .....	39
7.2 Použité prístroje .....	39
7.3 Použité metódy.....	40
7.3.1. Príprava záterovej disperzie .....	40
7.3.2 Reologické vlastnosti disperzií.....	40
7.3.3. Povrchová úprava vlákna pred nanosením disperzie.....	41
7.3.4. Povrstvovanie vlákien záterovou disperziou.....	41
7.4 Výber modelovej liečivej látky.....	42

7.5 Chromatografická analýza .....	42
7.6 Príprava disolučného média .....	43
7.7 Disolučný test .....	44
7.8 Výpočet množstva FA vo vzorke .....	45
8 Výsledky .....	46
8.1 Reologické vlastnosti disperzií.....	46
8.2 Disolúcia vlákien povrstvených jednou vrstvou kyseliny listovej.....	46
8.2.1 Reprodukovateľnosť disolúcie vlákien povrstvených jednou vrstvou kyseliny listovej .....	48
8.3 Disolúcia vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej .....	49
8.3.1 Reprodukovateľnosť disolúcie vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej .....	51
8.4 Disolúcia vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej a jednou ochrannou vrstvou .....	52
8.5 Disolúcia vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej a dvoma ochrannými vrstvami.....	54
8.6 Porovnanie reprodukovateľnosti disolúcie vlákien povrstvených jednou vrstvou kyseliny listovej.....	55
8.7 Porovnanie reprodukovateľnosti disolúcie vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej.....	56
9 Diskusia .....	58
9.1 Príprava disperzie .....	58
9.2 Príprava záterovej disperzie .....	58
9.3 Príprava vlákien .....	60
9.4 Disolúcia .....	63
9.5 Obsah kyseliny listovej vo vlákne .....	64
10 Závety .....	66
11 Referencie.....	67

# 1 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Kandidát: Erik Koszegy

Konzultant: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Ing. Jiří Běťák, Contipro Biotech s.r.o.

Názov rigorózneho práca: Liberácia kyseliny listovej z mikrovlákien na báze kyseliny hyaluronovej

V tejto experimentálnej práci boli použité mikrovláka z natívneho hyaluronanu, ktoré boli povrstvené kyselinou listovou s využitím metódy „dipcoating“. Kyselina listová bola v odstupňovaných koncentráciách pridávaná do povrstvovacej zmesi, založenej na báze hydrofobizovanej kyseliny hyaluronovej. Boli skúmané reologické vlastnosti týchto záterových zmesí a ich adhézia na povrch vlákien, aby bolo možné pripraviť vláka s čo možno najviac homogénnou vrstvou aktívnej látky. Uvoľňovanie kyseliny listovej (1-3%) z mikrovlákien do simulovanej krvnej plazmy bolo sledované v časových intervaloch 0,5 až 168 hodín (7 dní) pri teplote 37°C. Bez ohľadu na koncentráciu kyseliny listovej vo vláka, minimálne 90% účinnej látky vo vláka sa uvoľnilo do 24 hodín. Napriek použitiu hydrofobizovaného derivátu kyseliny hyaluronovej, uvoľňovanie aktívnej látky bolo veľmi náhle s uvoľnením 40 – 80% celkového množstva vo vláka sa uvoľnilo v priebehu prvých 30 minút. Bez ohľadu na koncentráciu kyseliny listovej vo vláka, minimálne 90% účinnej látky vo vláka sa uvoľnilo do 24 hodín.

## 2 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Candidate: Mgr. Erik Koszegy

Consultant: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Ing. Jiří Běťák, Contipro Biotech s.r.o.

Title of Thesis: Liberation of folic acid from microfibers based on hyaluronic acid

In this experimental thesis, microfibers made of native hyaluronan were used. Those fibers were coated with folic acid using dip-coating technology. Graduated concentrations of folic acid were added to the coating suspensions based on the hydrophobic hyaluronic acid. The rheological properties of coating mixtures and their adhesion to the fiber surface was examined, to enable a preparation of fibers with the highest possible surface layer homogeneity. Liberation of folic acid (1-3%) from microfibers to the solution of simulated blood plasma was examined within 7 days in time intervals from 0.5 to 168 hours at 37°C. Despite using hydrophobized derivative of hyaluronic acid, liberation of the active ingredient was fast with 40 – 80% of the total amount was released from the surface of the fibers within the first 30 minutes. Each type of coated fiber released at least 90% of the active ingredient within the first 24 hours regardless the folic acid concentration.

### 3 Zadanie

Predmetom tejto rigorózneho práce bolo v teoretickej časti popísať využitie biodegradabilných implantátov, možnosti ich praktického využitia a poukázať na ich využitie v rôznych oblastiach medicíny v súčasnej praxi. Ďalej sú podané základné informácie o kyseline hyaluronovej a kyseline listovej, výrobe mikrovlákien, povrstvovacej metóde dip-coating a disolúcii z polymérov.

Ciele experimentálnej časti tejto práce boli:

1. štúdium reologických vlastností disperzií pripravených z hydrofobizovaného derivátu kyseliny hyaluronovej a kyseliny listovej
2. príprava mikrovlákien povrstvených touto disperziou s použitím metódy „dip-coating“
3. skúmanie uvoľňovania kyseliny listovej z povrchu pripravených vlákien v určených časových intervaloch
4. Štúdium vplyvu hydrofóbneho poťahu na vrstve s liečivom na profil uvoľňovania liečiva



## 4 Zoznam symbolov a skratiek

API		aktívna farmaceutická ingrediencia
c	(mol.l <sup>-1</sup> )	koncentrácia
CMC	(mol.l <sup>-1</sup> )	kritická micelárna koncentrácia
Da		Dalton
DNA		deoxyribonukleová kyselina
FA		kyselina listová
FDA		Food and drug administration
GIT		gastrointestinálny trakt
HA		kyselina hyaluronová
HPMA		hydroxypropyl merkapturová kyselina
MW	(Da)	molekulová hmotnosť
NMP		N-metyl-2-pyrolidín
PDLLA		poly –DL– mliečna kyselina
PEG		polyetylénglykol
PLGA		poly mliečna-co-glykolová kyselina
r	(m)	polomer
RNA		ribonukleová kyselina
SBP		simulovaná krvná plazma
SC		subkutánný
SDS		dodecylsulfát sodný
UDP-GlcNAc		uridín difosfát – N-acetyl-D-glukozamin
η	(Pa.s)	viskozita
σ	(N.m <sup>-1</sup> )	povrchové napätie
τ	(Pa)	šmykové napätie

## 5 Úvod

Kyselina hyaluronová je biodegradabilný polymér, ktorý sa v praxi používa na urýchlenie hojenia rán a tiež je súčasťou očných, nosných, dermálnych, subkutánných a intraartikulárnych prípravkoch. Natívny hyaluronan sa v tele rýchlo vstrebáva a degraduje, preto sa v súčasnosti vyvíjajú tiež hydrofóbne deriváty, ktoré by spomalili degradáciu hyaluronovej matrice a umožnili lepšiu kontrolu liberácie inkorporovanej aktívnej látky.

Táto práca popisuje metódu inkorporácie kyseliny listovej do vlákna z natívneho hyaluronanu, prípravu týchto vlákien a hodnotenie liberácie aktívnej látky. Na povrch natívneho vlákna bola pomocou metódy povrstvovania (dip-coating) nanášaná suspenzia hydrofobizovaného derivátu hyaluronanu obsahujúca kyselinu listovú ako modelovú liečivú látku v odstupňovaných koncentráciách 1%, 1,5%, 2%, 2,5% a 3%.

## 6 Teoretická časť

### 6.1 Biodegradabilné polymérne implantáty

Medicínske implantáty sú prostriedky alebo tkanivá, ktoré sú umiestené dovnútra alebo na povrch tela. Mnohé implantáty sú protetika s účelom nahradiť chýbajúce časti tela. Ďalšie implantáty uvoľňujú do tela liečivé látky, monitorujú životné funkcie alebo poskytujú podporu orgánom a tkanivám. Niektoré implantáty sú vyrobené z kože, kosti, alebo iných telových tkanív. Ďalšie sú vyrobené z kovov, plastov, keramiky alebo iných materiálov. Implantáty sú do tela vložené buď permanentne alebo môžu byť z tela odstránené ak už nie sú potrebné. Napríklad stenty alebo bedrové implantáty sú používané ako permanentné implantáty. Na druhej strane, implantabilné chemoterapeutické porty alebo skrutky používané pri zrastaní zlomených kostí môžu byť odstránené po určitej dobe, keď už nie sú potrebné. (FDA, 2015)

Pri vývoji parenterálnych systémov s kontrolovaným uvoľňovaním aktívnej látky bolo používané široké spektrum biodegradabilných polymérov. Parenterálne biodegradabilné polyméry môžu byť klasifikované do dvoch skupín v závislosti na ich pôvode – prírodné a syntetické biodegradabilné polyméry. Prírodné polyméry sú normálne biokompatibilné a biodegradabilné (Pillai & Panchagnula, 2001)

Od päťdesiatych rokov 20. storočia bola väčšina implantátov vyrábaná z nebiodegradovateľných, inertných polymérov, ako je napríklad silikónová pryž, polyakrylamid a kopolyméry poly(etylén-vinyl acetát) kopolyméry. Tieto implantáty však mali niekoľko zásadných nevýhod (Hillery & Lloyd, 2003):

- Po uvoľnení liečiva musia byť chirurgicky odstránené
- Vo vode rozpustné alebo vysoko ionizovateľné liečivá a makromolekuly, ako napríklad peptidy a proteíny, majú zanedbateľný prechod cez hydrofóbne membrány
- je zložité dosiahnuť všestranné uvoľňovanie liečiva, keďže to je liberované najmä samotnými vlastnosťami použitého polyméru

Tieto obmedzenia viedli k vývoji biodegradabilných polymérnych implantátov. Po umiestnení do tela by si biodegradabilné implantáty mali zachovať svoje mechanické vlastnosti až kým už nie sú potrebné a potom sú degradované, absorbované a exkretované z tela nezanechávajúc žiadne stopy. Doba, pri ktorej si polymér zachováva svoje zamýšľané funkcie je najdôležitejšou vlastnosťou polymérov pre medicínske použitie. Aby bol polymér úspešne použitý, musí sa charakterizovať a kontrolovať čas, po ktorý si polymér zachováva svoju funkciu, doba po ktorej sa polymér v tele rozloží a aké degradačné produkty z neho vzniknú. Kvôli tomu je dôležité rozumieť aj degradačným mechanizmom. Hlavné degradačné mechanizmy polymérov sú v medicínskych aplikáciách veľmi podobné, no kvôli rôznym procesným podmienkam a použitému prostrediu sa líšia v kinetike. (Middleton & Tipton, 2000)

U polymérov používaných v biomedicínskych implantátoch sa uplatňujú štyri základné mechanizmy degradácie: hydrolýza (reakcia s vodou v tkanivách), oxidácia (oxidanty produkované tkanivami), enzymatická degradácia a fyzikálna degradácia (bobtnanie a mechanické príčiny rozpadu). (Göpferich, 1996)

Oxidatívna degradácia je dôsledkom ochrannej reakcie organizmu, kedy bunky imunitného systému vytvárajú látky s oxidačným účinkom, ktoré difundujú do implantátu a rozkladajú ho. Enzymatická degradácia je tiež dôsledkom ochrannej reakcie proti implantovaným materiálom, ktoré sú pre telo často cudzie. Kolagén, polysacharidy (teda aj kyselina hyaluronová), niektoré polyestery, syntetické polykarbonáty a proteíny sú degradované hlavne týmto procesom. Enzýmy sú normálnou súčasťou každého človeka, preto kvôli prítomnosti individuálnych rozdielov medzi jedincami sa môže výsledná degradácia líšiť v závislosti na pacientovi. Fyzikálna degradácia je hlavne dôsledkom mechanického pôsobenia, napríklad pohyb pri zvýšenom tlaku, treniu, bobtnaniu a podobne.

Najviac študovaným degradačným mechanizmom je hydrolýza, ktorá sa u biodegradabilných polymérov uplatňuje veľmi často. Ide o reakciu chemických väzieb v polymérnych reťazcoch s molekulami vody, ktoré rezultujú do vzniku kratších reťazcov. Chemická reaktivita polymérnych väzieb, rýchlosť difúzie reaktantov a produktov vrátane vody, polymérne väzby, ióny v testovacom médiu

a termodynamické interakcie medzi polymérom a vodou ovplyvňujú hydrolýzu polyméru. (Lyu & Untereker, 2009), (Wise, 2000), (Leja & Lewandowicz, 2010)

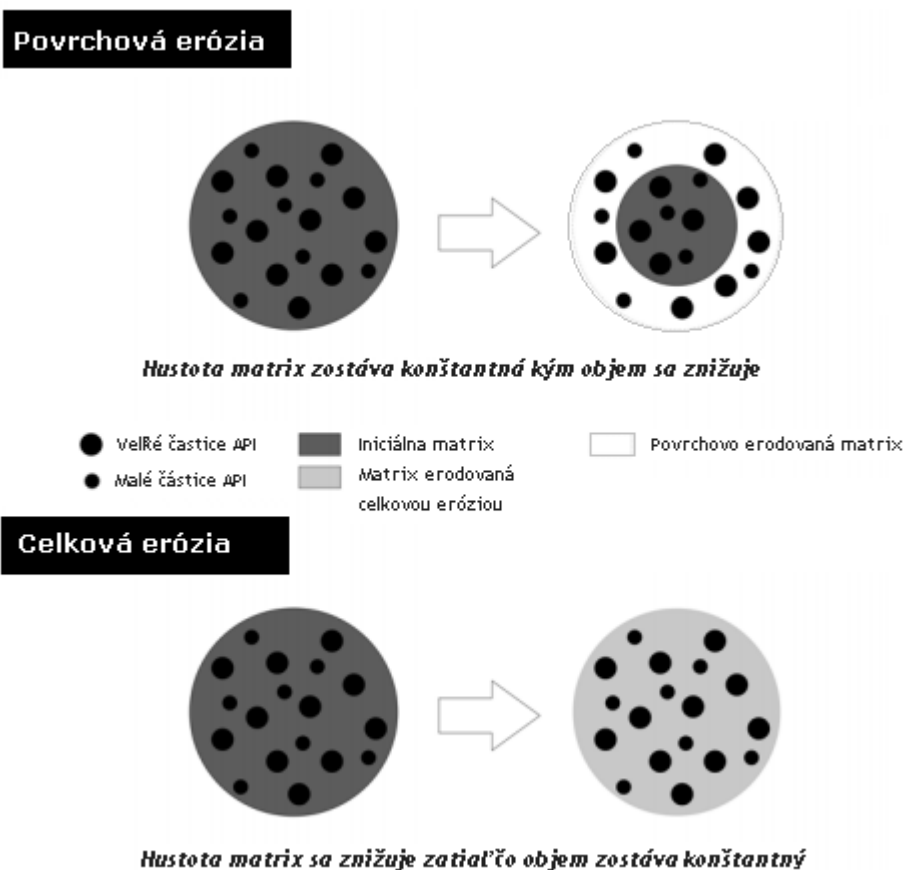
Degradácia polymérov však môže prebiehať viacerými mechanizmami súčasne. Príkladom sú proteíny ako albumín, ktoré nie sú iba rozpustné vo vode, ale sú tiež degradované špecifickými enzýmami. Preto by polyméry, použité pre biodegradabilné implantáty, mali byť rozpustné vo vode a/alebo odbúrateľné vo vode. (Markus & McClintock, 1967)

Resorpčný proces biomateriálov je klasifikovaný podľa ich erózneho mechanizmu na celkovú eróziu a povrchovú eróziu. Pri celkovej erózii (bulk erosion), je celá polymérna matrica subjektom pre chemické alebo enzymatické reakcie. Voda rapídne difunduje do polymérnych štruktúr, a celá polymérna matrica zväčšuje svoj objem v dôsledku bobtnania. Pretože rýchlosť difúzie vody do substrátu je v tomto prípade vyššia ako rýchlosť hydrolýzy, výsledkom tohto procesu je penetrácia vody do substrátu, a hydrolýza z vnútra polymérnej matrice smerom von. Ako resorpčný proces pokračuje v čase, pre celkovo erodovateľné polyméry je charakteristická náhla strata štrukturálnej integrity. Tento proces je tiež nazývaný homogénna erózia.

Pri povrchovej erózii dochádza k hydrolýze v povrchových oblastiach polyméru, ktoré sú najviac vystavené reakčnému médiu. Erózia preto začína na povrchu a postupne postupuje smerom do vnútra implantátu, vrstva po vrstve. Kvôli rozdielom v tempe degradácie medzi povrchom a centrom polymérnej matrice, býva tento mechanizmus označovaný tiež ako heterogénna erózia. Aktívna látka homogénne distribuovaná na povrchu erodovanej matrice, ktorej plocha sa významne nemení s časom (aspoň po určitú dobu) a u ktorej sú zmeny mechanických vlastností a redukcie objemu rovnomernejšie, vykazuje kinetiku nultého rádu, teda konštantné uvoľňovanie. (Siegel & Rathbone, 2012) Z tohto dôvodu sú povrchovo erodované polyméry ideálnymi kandidátmi pre vývoj systémov s postupným uvoľňovaním aktívnej látky.

Zvláštny typ erózie je enzymatická erózia, keďže enzýmy nemajú schopnosť difundovať, ale zvyšujú rýchlostnú konštantu hydrolýzy. Heterogénna degradácia substrátu hydrolýzou je v prítomnosti enzýmov zvýšená v závislosti na hydrolytickej

konštante a koeficiente difúzie. V tomto prípade sa pri degradácii uplatňujú oba mechanizmy hydrolýzy. (Vieira, Vieira, & Ferra, 2011) (Gajjar & King, 2014)



Obrázok 1: Diagram povrchovej a celkovej erózie v matrixových systémoch (Holowka, 2014)

### 6.1.1 Implantáty v liečbe nádorových ochorení

Implantáty môžu byť používané pri systémovej terapii alebo pre lokálny terapeutický efekt. Pre systémovej terapeutický efekt sú implantáty podávané obvykle subkutánne (SC), zatiaľ čo implantáty so zamýšľaným lokálnym účinkom sú umiestnené do špecifických častí tela, kde má aktívna látka pôsobiť. (Shi & Li, 2005) Selekcia biodegradabilných polymérov pre kontrolované uvoľňovanie aktívnej látky je veľmi

dôležitá pre prekonanie možných obmedzení ako je toxicita polyesterov ktoré nie sú biokompatibilné a lokálna iritácia po ich podaní. (Edlund & Albertsson, 2002)

V porovnaní s injekčnými preparátmi, farmaceutické implantáty poskytujú kontrolované a cielené uvoľňovanie liečiva v dostatočne vysokých dávkach v zamýšľanom mieste účinku. Taktiež implantáty väčšinou znižujú toxicitu typicky asociovanú so systémovým podaním konkrétneho liečiva. (Dash & Cudworth, 1998)

V súčasnosti je jednou z najúspešnejších možností liečby solídnych tumorov chirurgická resekcia, ktorá je nasledovaná adjuvantnou chemoterapiou a radiačnou terapiou. Mnoho tumorov reaguje veľmi dobre na túto liečebnú stratégiu, no mnohí pacienti nemôžu chirurgickú operáciu tumoru podstúpiť. Intravenózne podávanie chemoterapeutík u týchto tumorov má obmedzenú efektivitu. Keďže len malá časť systémovej cirkulácie sa dostáva priamo do nádoru, len časť celkovej dávky dosiahne cieľové tkanivá. (Dowell & Sancho, 2000)

Alternatívnou k chirurgickej resekcii sú minimálne invazívne techniky s lokálnou deštrukciou nádoru. Medzi tieto techniky patrí termálna ablácia (Chu & Dupuy, 2014) a kryoablácia napríklad u nádorov pľúc (Niu, Xu, & Mu, 2012), pečene (Adam & Hargreaves, Percutaneous cryosurgery of irresectable liver tumors, 2001) alebo mozgu (Tacke & Speetzen, 2001). Ďalšie metódy sú neustále vyvíjané – rádiovlnová a mikrovlnná ablácia (Saldanha & Khiatani, 2010), alebo chemická ablácia (Hines-Peralta & Liu, Chemical Tumor Ablation with Use of a Novel Multiple-tine Infusion System in a Canine Sarcoma Model, 2006).

V posledných rokoch sa do popredia začali dostávať tiež implantáty obsahujúce cytostatiká, ktorých zamýšľané umiestnenie je buď priamo do tumoru alebo do tkanív v blízkosti tumoru. Tieto implantáty obsahujú chemoterapeutické liečivá používané pri liečbe karcinómu prostaty (Merrick & Wallner, 2003) alebo mozgových nádorov (Guerin & Olivi, 2004). Klinicky overeným a FDA schváleným polymérom implantátom je Gliadel, ktorý je vyrobený z polyanhydridového kopolyméru a obsahuje 7,7 g karmustínu v jednej kapsule. Tento implantát má vzhľad tablety a

používa sa pri liečbe maligného gliómu, kedy sa niekoľko implantátov vloží počas chirurgickej resekcie do mozgovej kavity, kde liečivo pôsobí lokálne. (Perry & Chambers, 2007) (Guilford Pharmaceuticals Inc., 2001)

Ďalším FDA schváleným implantátom je Vantas, hydrogélový implantát vyrobený zo sieťovaného kopolyméru hydroxypropyl metakrylátu a 2-hydroxy metakrylátu obsahujúci 50 mg histrelin acetátu. Ide o nebiodegradovateľný, permanentý implantát, indikovaný pre liečbu metastatického karcinómu prostaty. Liečivo sa uvoľňuje po dobu dvanástich mesiacov. (Valera Pharmaceuticals, Inc., 2006) Nevýhodou nebiodegradovateľných implantátov je nutnosť druhej operácie na ich odstránenie z organizmu.

Príkladom biodegradovateľného implantátu je Zoladex používaný pri liečbe karcinómu prostaty, prs alebo ďalších indikáciách. Implantát je zložený z kopolyméru kyseliny mliečnej a glykolovej v pomere 95:5 (Polyglaktin), ako účinnú látku obsahuje goserelin acetát v množstve 3,6 mg alebo 10,8 mg. Implantát obsahuje rovnaký diel polyméru s nízkou a vysokou molárnou hmotnosťou a v závislosti na obsahu uvoľňuje liečivo po dobu 1 alebo 3 mesiacov (AstraZeneca Pharmaceuticals, 2011).

V nasledujúcej tabuľke sú zobrazené niektoré z bežne používaných implantátov pri liečbe nádorových ochorení. Väčšina z nich je založená na kopolymére kyseliny mliečnej a glykolovej.

*Tabuľka 1: Komerčné biodegradabilné produkty používané pri liečbe nádorových ochorení (Shuwisitkul, 2011), (Wolinsky & Colson, 2012), (Weinberg & Blanco, 2008)*

<b>Produkt</b>	<b>Liečivo</b>	<b>Forma</b>	<b>Indikácia</b>	<b>Nosič</b>
Profact Depot	Buserelin	Pevný implantát	Karcinóm prostaty	PLGA
Zoladex	Goserelin	Pevný implantát	Karcinóm prostaty	PLGA
Gliadel	Karmustin	Targeting, pevný implantát	Maligný glióm	Polifeprosan 20
Vantas	Histrelin	Pevný implantát	Karcinóm prostaty	HPMA
OncoGel	Paklitaxel	Injekčný implantát	Karcinóm pažeráka, nádory mozgu	PLGA-PEG-PLGA
Eligard	Leuproliid	Injekčný implantát	Karcinóm prostaty	PLGA



### 6.1.2 Implantáty v liečbe ostatných ochorení

V súčasnosti sa používajú polymérne implantáty v oftalmológii (intraokulárne implantáty), v liečbe stenóz, prevencii pooperačných adhézii, s kontracepčnými a antibiotickými účinkami.

Vývoj očných implantátov nadobudol väčší význam so stúpajúcou incidenciou chorôb zadného segmentu oka. Korneálny epitel a spojivka poskytujú nielen ochranu pre nebezpečnými xenobiotikami, ale tiež zabraňujú prieniku liečiv do zadného segmentu, čo významným spôsob sťažuje dosiahnutiu minimálnej terapeutickej koncentrácie. (Lee & Hughes, 2010) Biodegradabilné implantáty prekonajú bariéru medzi krvou a sietnicou, čím umožňujú liečivám dosiahnuť terapeutickú koncentráciu v požadovanom mieste, spolu s predĺženým uvoľňovaním, čím sa redukuje riziko vzniku nežiadúcich účinkov, ktoré sú často pozorované pri použití intravitreálnych injekcií alebo systémovom podaní. (Silva, Fialho, Siqueira, Jorge, & Cunha, 2010)

V súčasnosti používaný Ozurdex je biodegradabilný implantát, ktorý je indikovaný pri poruchách zraku, ktoré sú zapríčinené diabetickým alebo oklúznym makulárnym edémom. Ide o injekčný implantát, aplikovaný intravitreálne, ktorý je zložený z PLGA. Obsahuje 0,7 mg dexametazónu, ktorý je postupne uvoľňovaný po dobu 4 až 6 týždňov. (Allergan, Inc, 2015) (FDA, 2014)

Ďalším v praxi používaným implantátom je Surodex, biodegradabilný implantát založený na báze PLGA, ktorý sa používa pri liečbe pooperačných zápalov šedého zákalu. Obsahuje 60 µg dexametazónu, ktorý je uvoľňovaný po dobu 7-10 dní kinetikou nultého rádu. (Haghjou & Soheilian, 2011) Podľa klinickej štúdie, ktorá porovnávala tento implantát s konvenčnou liečbou 0,1 % dexametazónových očných kvapiek, implantát vykazoval vyšší protizápalový efekt. (Tan & Chee, 2001)

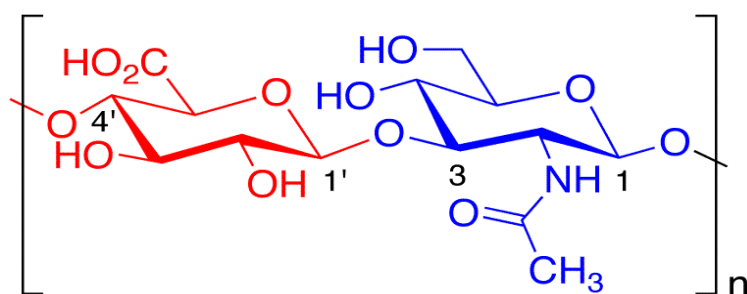
Antibiotické implantáty sú využívané predovšetkým v zubnom lekárstve, často ako prevencia pooperačných infekcií, ale taktiež u chronických infekcií. Predoperačné aj pooperačné použitie implantátov je kombinované s orálnou administráciou antibiotík, pretože vtedy implantáty vykazujú vyššiu účinnosť. (Asenjo-Lobos & Jofre,

2015) Príkladom je subgingiválny implantát Atridox, ktorý obsahuje doxycyklín v 10% koncentrácii a používa sa pri liečbe chronickej periodontitídy. Nosným polymérom je 36,7% PLA rozpustený v 63,3% N-metyl-2-pyrolidínu (NMP) a účinná látka je uvoľňovaná po dobu 7 dní. (Holban & Grumezescu, 2016) "

Ďalší prístup pre kontrolované uvoľňovanie antibiotík je založený na povrstvovaní implantátov. Tento spôsob sa uplatňuje hlavne pri implantácii zdravotníckych prostriedkov do tela u ortopedických pacientov a pacientov po nehodách, aby sa minimalizovala možnosť vzniku infekcií. Pre tieto účely sa zariadenia môžu povrstvovať antibiotikami alebo antiseptikami. Príkladom takého prístupu je povrstvenie titánových drôtikov gentamicínom v koncentrácii 10%. Polymérny nosič bol založený na poly(D,L - mliečnej kyseline, PDLLA). (Vester & Wildemann, 2010).

## 6.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je prirodzene sa vyskytujúci lineárny mukopolysacharid prirodzene sa vyskytujúci v živých organizmoch. HA bola objavená v roku 1934 Karlom Meyerom a Johnom Palmerom. Polysacharid hyaluronan je polyanión s disacharidovou štruktúrou, ktorý je zložený z pravidelne sa opakujúcich jednotiek D-glukuronovej kyseliny a N-acetyl-D-glukosamínu, ktoré sú spojené  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) a  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glykozidickými väzbami a má dôležité biologické funkcie nielen u baktérií, ale aj u vyšších zvierat, vrátane človeka (Necas, Bartosikova, Brauner, & Kolar, 2008).



*Glucuronic Acid N-Acetyl-D-glucosamine*

Obrázok 2 Kyselina hyaluronová (Denninger & Reiser, 2008)

V ľudskom tele sa HA vyskytuje vo forme soli, hyaluronanu sodného, a vo vyšších koncentráciách sa nachádza najmä v synoviálnej tekutine, pupočnej šnúre, očnom sklovci, spojivových a nervových tkanivách, extracelulárnej matrixi a v koži. Takmer polovica z celkového množstva HA sa nachádza v koži, z toho najväčšia časť HA je lokalizovaná v intracelulárnom priestore, kde môže dosahovať koncentráciu až 2,5 g/l. Významé množstvá HA možno nájsť aj v obličkách, pľúcach, mozgu a vo svaloch. Bolo dokázané, že v priemernom ľudskom tele o hmotnosti 60 kg je 12 g kyseliny hyaluronovej a hodnoty molekulových hmotností in vivo kolísajú v rozmedzí od 4000 do 20 000 000 Da. (Edwards & Fantasia, 2007), (Fraser, Laurent, & Lurent, 1997)

Medzi biologické funkcie HA patrí udržiavanie viskoelasticity spojivových tkanív, očného sklovca, synoviálnej tekutiny, kontrola hydratácie tkanív a transportu vody, supramolekulárne zloženie proteoglykanov v extracelulárnej matrixi, má úlohu mediátora na mnohých bunkových receptoroch, hraje dôležitú úlohu pri mitóze, migrácii fibroblastov dôležitých pri hojení rán, rozvoji nádorových buniek a metastáz a v zápalových procesoch. (Balazs et al., 1986; Toole et al., 2002; Turley et al., 2002; Hascall et al., 2004).

Hyaluronan je hygrokopická látka, patrí medzi jedné z najviac hydrofilných látok v prírode, viaže na seba množstvo vody (jeden gram HA dokáže absorbovať až 6000 gramov vody), lubrikuje pohyblivé časti tela ako sú spoje, chrupavky a svaly, a chráni bunky pred účinkami vysychania (Samal & Dubruel, 2014)

V tele sa HA podieľa na rôznych dôležitých biologických procesoch súvisiacich s vedením nervových vzruchov, hojením rán, stimuluje diferenciáciu a proliferáciu endoteliálnych buniek, kontroluje objem tekutín v extracelulárnej matrixi a zvyšuje množstvo lymfocytov v mieste zápalu. HA sa vyznačuje silnou interakciou s endocytickými receptormi, hlavne s CD44 a RHAMM (Misra, Hascall, Markwald, & Ghatak, 2015).

Biologická dôležitosť, fyzikálne vlastnosti, biokompatibilita a neimunogenita kyseliny hyaluronovej ju robia veľmi zaujímavým biopolymérom pre farmaceutické, biomedicínske a veterinárne využitie. V roku 2003 bola HA vo forme gélu prvý krát

schválená FDA pre injekčné použitie na vyplňovanie stredne hlbokých a hlbokých vrások a nazolabiálnych rýh (FDA, 2015).

V súčasnosti sa HA používa predovšetkým parenterálne, najmä jej okulárne a nazálne použitie je široko rozšírené. Okrem týchto spôsobov podania je možné HA podať aj inými cestami, napríklad intravenózne, dermálne, subkutánne, intraartikulárne a perorálne. (Yu-Jin, Termsarasab, & Dae-Duk, 2010)

Roztoky hyaluronanu majú unikátne reologické vlastnosti, sú nezvyčajne klzké a veľmi hydrofilné. V roztoku sú polymérne reťazce usporiadané do rozťahnutej náhodnej špirály. Tieto reťazce sa potom vo veľmi nízkych koncentráciách zapletajú náhodne medzi sebou. Pri vysokých koncentráciách vykazujú roztoky HA extrémne vysokú viskozitu závislú na šmykovej rýchlosti. Svojimi reologickými vlastnosťami patrí hyaluronan do skupiny pseudo-plastických materiálov. 1% roztok hyaluronanu je pri normálnych podmienkach želatinózna hmota, ale pod tlakom sa stáva menej viskóznou, viac roztekavú a roztierateľnú, takže je možné takýto roztok bez problémov vpichnúť do tela podkožnou ihlou. (Hollinger, 2005)

Hyaluronan má široké spektrum medicínskych aplikácií – roztoky hyaluronanu sú excelentné lubrikanty, ktoré umožňujú tkanivám a orgánom klzať a trieť sa medzi sebou po svojich povrchoch. HA preparáty sú teda často aplikované do tkanív s cieľom podporiť hojenie a redukovať potenciálnu tvorbu postoperačných adhézií. Jednou z jeho najdôležitejších biologických úloh je poskytnutie prospešného efektu pri hojení rán na koži a v očiach (Kogan, Šoltés, Stern, & Gemeiner, 2007), (USA Patent č. US 20140343013 A1, 2014).

Industriálna výroba HA je založená na dvoch hlavných procesoch: extrakcii zo živočíšnych tkanív (kohútich hrebienkov, sinoviálnej tekutiny krávy) a bakteriálnou produkciou zo *Streptococcus* sp, najmä *Streptococcus zooepidemicus* (Kotra, Venkateswarulu, & Babu, 2013) alebo nepatogénnych mikroorganizmov (*Bacillus subtilis* (Chien & Lee, 2007), *Lactococcus lactis* (Chien & Lee, 2007), *Agrobacterium* sp. (Mao & Chen, 2007) *Enterococcus faecalis* a *Escherichia coli* (Yu & Stephanopoulos, 2008). Obe technológie poskytujú HA s vysokými molekulovými hmotnosťami  $M_w \geq 1 \times 10^6$  Da a polydisperzným indexom v rozmedzí od 1,2 do 2,3.

Využitie nachádzajú najmä v biomedicínskych a kozmetických aplikáciách. (Boeriu, Springer, & Kooy, 2013)

Proces výroby HA extrakciou zo živočíšnych tkanív hral dôležitú úlohu v produkcii najmä komerčných produktov, ale je technicky zastaraný a technicky limitovaný, pretože pri extrakcii dochádza k nevyhnutnej degradácii hyaluronanu. Biotechnologický proces sa vyvíjal predovšetkým posledné dve desaťročia dvadsiateho storočia použitím skupín A a C streptokokov. Táto technológia mikrobiálnej fermentácie poskytuje HA s vysokou  $M_w$  a čistotou, s nižšími výrobnými nákladmi a znečisťovaním životného prostredia. Napriek tomu, výroba HA zo *Streptococcus* sp. čelí čoraz väčším obavám kvôli faktu že streptococcus je patogénny a riziku kontaminácie bakteriálnymi proteínmi, endotoxínmi, nukleovými kyselinami a ťažkými kovmi (Widner, Behr., Von Dollen, & Tang, 2005) (Liu, Liu, & Li, 2011).

Najnovšia technológia výroby HA je založená na polymerizácii UDP – GlcNAc monomérov pomocou HA syntázy. Využitie enzymatického procesu HA syntázy je veľmi všestranné a umožňuje produkciu vysokých molekulových hmotností HA v konštantnej kvalite ( $M_w \leq 2500$  kDa), s definovanou dĺžkou reťazcov, nízkym polydisperzným indexom (1,01 – 1,20) a bez rizika kontaminácie. Takýto takmer monodisperzný hyaluronan bol získaný enzymatickou polymerizáciou použitím rekombinantnej *Pasteurella multocida* HA syntázy, no možno použiť aj *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus uberis* (DeAngelis, 2008) (Declèves, a iní, 2012)

### **6.3 Mikrovlákná**

Prírodné biopolyméry majú jedinečné biokompatibilné a biodegradabilné vlastnosti, ktorými poskytujú radu možností využitia vo farmaceutických a biomedicínskych aplikáciách. Spracovávané do rôznych foriem sa používajú pre kontrolované uvoľňovanie aktívnych látok, v tkanivovom inžinierstve k regenerácií (tkanív, kostí, kože, chrupaviek), k adhézii a fixácii tkanív, k udržiavaniu tvaru (stenty) a prevencii adhézií, ako dočasná náhrada tkanív (napríklad endokrania) a ku kontrole rôznych biologických funkcií (Masakazu & Ikada, 2004).

Ako už bolo spomenuté, hyaluronan je prírodný polysacharid, ktorý je možné vďaka svojej chemickej štruktúre spracovávať do rôznych foriem, čím vytvára širokú škálu možností jeho využitia. Umožňuje formovať nanočastice s rozsiahlym povrchom, mikrovlákná spracovávané do textílií, hydrogély s rôznymi mechanickými charakteristikami obsahujúce magnetické alebo luminiscenčné častice a micely schopné obsiahnuť množstvo hydrofóbných substancií (Gajjar & King, Resorbable Fiber-forming Polymers for Biotextile Applications, 2014), (Contipro Group, 2011).

### **6.3.1 Mikrovlákná založené na HA**

Vláknó vyrobené z kyseliny hyaluronovej alebo z jej farmaceuticky akceptovanej soli, ktoré má vlastnosti textilného vlákna nebolo popísané až do roku 2009, kedy boli pomocou metódy „wet spinning“ pripravé vlákna z HA , kyseliny octovej a vody. Táto príprava vlákna HA pozostáva z nasledujúcich krokov: (Patent č. WO2009050389 A2, 2009)

1. Príprava vodného roztoku kyseliny hyaluronovej alebo jej soli, najmä sodnej soli, kde koncentrácia kyseliny hyaluronovej je vyššia ako 0,8 hmotnostných percent. Preferovaná koncentrácia je v rozmedzí od 1% do 2 %.
2. Extrúzia roztoku HA cez zvlákňovaciú dýzu do koagulačného roztoku
3. Formovanie vlákna v koagulačnom roztoku zloženého z kyseliny octovej a vody, kde koncentrácia kyseliny octovej je vyššia ako 80%, preferovaná koncentrácia je viac ako 90%
4. Rozpínanie vlákna a jeho sušenie, ktoré mu dáva jeho mechanické vlastnosti

Získané vlákno má priemer vyšší ako 100  $\mu\text{m}$  a obsah vody 8 – 12% pri normálnych podmienkach. Vlákna pripravované týmto spôsobom môžu byť použité pre prípravu tkaných a netkaných textílií, no nie sú vhodné pre prípravu pletených textílií kvôli svojej nízkej pevnosti. (Patent č. WO2009050389 A2, 2009)

Novší spôsob prípravy HA vlákne v bol prvý krát použitý a patentovaný firmou Contipro Biotech s.r.o. v roku 2012. (Hrdina, 2013) Základný postup prípravy vlákien je rovnaký, ako v predchádzajúcom prípade:

1. Pripraví sa vodný roztok kyseliny hyaluronovej alebo jej soli o koncentrácii od 0,01% do 8%. Tento roztok obsahuje od 0,001 do 10 N zásady a je miešaný od 20 minút do 10 hodín pri teplote od 18 do 35°C
2. Roztok HA je extrudovaný cez zvlákňovaciu trysku do koagulačného roztoku
3. Vlákno je formované v koagulačnom roztoku, ktorý obsahuje 1 až 99% alkoholu, 1 až 99% kyseliny a maximálne 10% vody
4. Vlákno je premývané vo vymývacom roztoku obsahujúcom alkohol a následne sušené

Zvlákňovací roztok HA obsahuje hyaluronovú kyselinu a/alebo jej soľ a bázu vybranú zo skupiny LiOH, NaOH, KOH, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, LiHCO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub> a KHCO<sub>3</sub>. Koagulačný roztok obsahuje jeden z týchto typov alkoholov - methanol, ethanol, 1-propanol a 2-propanol; a z kyselín buď kyselinu mravčiu, octovú, propionovú, alebo ich zmes. Premývanie vlákien sa koná ponorením vlákien do alkoholového roztoku. Sušenie vlákien prebieha na vzduchu, v atmosfére s dusíkom alebo oxidom uhličitým a trvá od jednej hodiny do piatich dní pri teplote od 20 do 80°C. Počiatočná kyselina hyaluronová a/alebo jej soli (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) majú molekulovú hmotnosť v rozsahu od 100 kDa do 3 MDa určenú metódou SEC-MALLS. (Patent č. WO2012089179 A1, 2012)

Najnovší patent týkajúci sa zvlákňovania kyseliny hyaluronovej bol podaný firmou Contipro Biotech s.r.o. a bol publikovaný koncom roka 2015. Popisuje zvlákňovanie hyaluronanu v polohe 6 N-acetyl-D-glukosamínu s použitím kyseliny mliečnej v koagulačnom roztoku. (Patent č. WO2014082610 A1, 2015)

#### **6.4 Vlákna pre medicínske textílie a biotextílie**

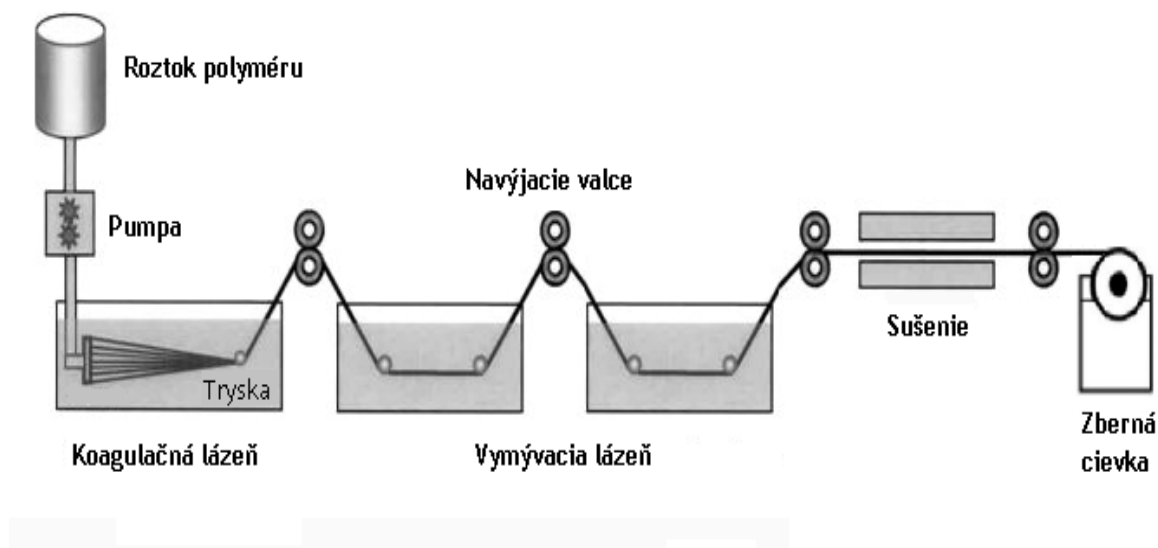
Medicínske textílie sú produkty a prostriedky, ktoré majú široké spektrum využitia v medicíne, od krytia rán a bandáži až po technologicky vyspelejšie aplikácie ako tkanivové scaffoldy, biotextílie a vaskulárne implantáty. Všetky biomedicínske produkty, ktoré sú založené na textíliách sú zložené z monofilových alebo multifilových štruktúr vyrobených buď zo syntetických alebo prírodne sa vyskytujúcich polymérov. Väčšina textílií pre biomedicínske použitie vyrábaných zo

syntetických polymérov zvyčajne obsahuje aditíva ako farbivá, stabilizátory, antioxidanty a antistatické látky. Niektoré z týchto zložiek často nie sú vhodné pre takéto aplikácie a musia byť pred použitím odstránené. (Weinberg & King, 2009)

Oba typy polymérnych vlákien používaných v biomedicíne môžu byť vytvorené niekoľkými odlišnými procesmi. Výber vhodného procesu prípravy vlákien závisí na štruktúre a fyzikálnych vlastnostiach spracovaného polyméru. Extrúzia monofilov a multifilov je v praxi najčastejšie dosahovaná metódami ako „melt spinning“, „dry spinning“, „elektrospinning“ a „wet spinning“. (Azimi & Nourpanah, 2014)

### 6.5 Mokré zvlákňovanie (*Wet spinning*)

HA patrí medzi biopolyméry, ktoré sa nedajú spracovávať metódou tavenia (melt spinning), pretože nie sú tavitelné - bod tavenia hyaluronanu je vyšší ako teplota, pri ktorej dochádza k jeho dekompozícii. (USA Patent č. US 7692000 B2, 2010) Na prípravu vlákien založených na HA sa preto používa metóda mokrého zvlákňovania (wet spinning). Princíp metódy je znázornený na obrázku 3. (Vehviläinen, Kamppuri, Grönqvist, & Rissanen, 2015)



Obrázok 3: Diagram mokrého zvlákňovania (Chung, Kang, Kwon, Shin, & Lee, 2007)



Mokrú zvlákňovanie je najstaršou metódou zvlákňovania polymérov. Pre hyaluronan bola vyvinutá v rokoch 1960 – 1970 na prípravu tenkých filmov s orientovanou štruktúrou. (Rupprecht, 1979) Pri mokrom zvlákňovaní je roztok polyméru pumpovaný určenou intenzitou cez zvlákňovacie trysku, ktorá je kompletne ponorená do koagulačného roztoku. Pri koagulácii dochádza k fázovej separácii jednofázového roztoku polyméru na pevný polymér a rozpúšťadla polyméru. Roztok polyméru koaguluje okamžite po tom, ako sa dostane zo zvlákňovacej trysky do styku s koagulačným roztokom. Vznikajúce koagulované vlákna sú ťahané navíjacou cievkou a vedené cez rozťahovaciu zónu a vymývacie roztoky. Vlákna sú potom navíjané na zbernú cievku buď ako jedno nekonečné vlákno alebo ako staplové vlákna, kedy je spriadacie vlákno strihané na požadovanú dĺžku. Vlákna sú v poslednom kroku sušené do konečnej podoby. (Vehviläinen) (Wilkes, 2001)

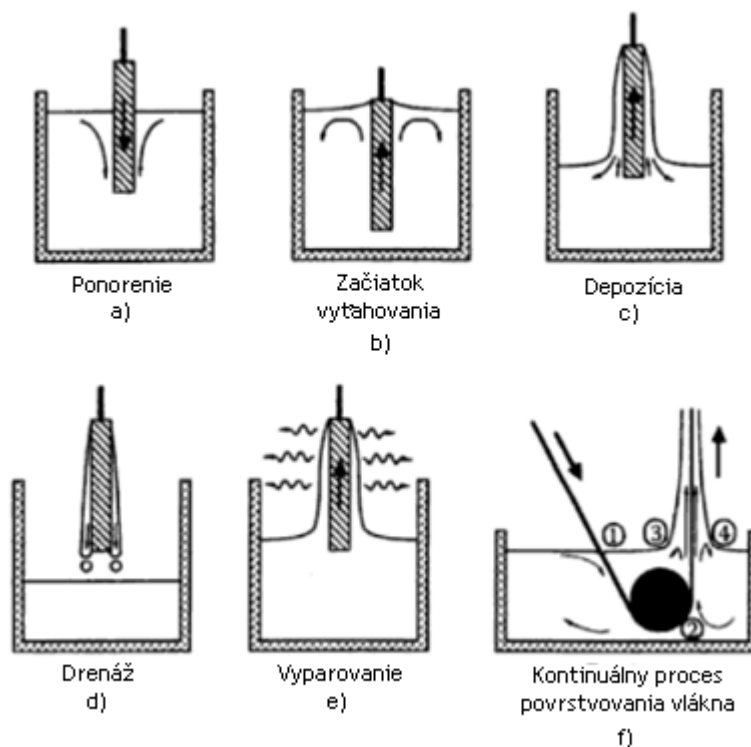
Extrúzia roztoku polyméru môže prebiehať priamo cez trysku do koagulačného roztoku, alebo prechodom cez krátky úsek vzduchu Táto metóda sa nazýva zvlákňovanie z roztoku za sucha (dry-jet wet spinning). (USA Patent č. US3767756 A) Wet spinning sa často používa na produkciu vlákien z prírodných polymérov so silnými medzireťazcovými silami, ktoré sú dôsledkom prítomnosti hydroxyl, acetamido a amino skupín, čo im zvyšuje teplotu tavenia nad ich teplotu degradácie. Medzi takéto polyméry patrí napríklad chitín, chitosan a kyselina hyaluronová. (Reis & Tuzlakoglu, 2004)

## **6.6 Metóda povrstvovania (*dip-coating*)**

Dip coating je proces, pri ktorom je substrát ponorený do tekutého média a vyťahovaný definovanou rýchlosťou pri kontrolovanej teplote a atmosférických podmienkach, ktoré ovplyvňujú proces vyparovania rozpúšťadla, čo vedie k vytvoreniu tenkej vrstvy na povrchu substrátu. (Attia, Wang, & Wu, 2002) V medicínskych aplikáciách sa dip coating najčastejšie používa na povrstvovanie katétrov, stentov, šicích nití a zdravotníckych prostriedkov pre krytie rán, ktoré obsahujú aktívne látky ako striebro, trombolýtika, antibiotiká, antikoagulantia, protizápalové látky a antiseptiká. (Lambert, Tang, & Rogers, 2001)

Dip coating možno rozdeliť na päť základných krokov: ponorenie, začiatok vyťahovania (start-up), depozícia, drenáž a vyparovanie. Pri použití prchavých rozpúšťadiel, ako napríklad alkohol, sa vyparovanie sa spravidla odohráva pri start-upe, depozícii a drenáži. Pri kontinuálnom dip coatingu je proces jednoduchší, pretože separuje fázu ponorenia od ostatných krokov a fázu drenáže “skrýva” v nanášanej vrstve.

V prvej fáze je substrát ponorený do roztoku povrstvovacieho materiálu pri definovanej rýchlosti. V start-up fáze zostáva chvíľu substrát v roztoku a začína byť vyťahovaný, čím sa na povrchu substrátu vytvára tenká vrstva povrstvovacieho roztoku (depozícia). Prebytočný roztok odtečie alebo odkvapká. Nakoniec sa po vyparení rozpúšťadiel na substráte vytvorí tenký povrchový film nanášaného roztoku. Všetky kroky procesu sú zobrazené na obrázku 4. (Brinker & Scherer, 1990) (Rahaman, 2006)



Obrázok 4: Fázy procesu povrstvovania substrátu (a-f). a) ponorenie, b) začiatok vyťahovania vlákna, c) depozícia, d) drenáž, e) vyparovanie, f) schéma kontinuálneho procesu povrstvovania (Scriven, 1988)

Problematika hrúbky nanášanej vrstvy bola detailne skúmaná začiatkom štyridsiatych rokov Landauom, Levichom a Derjaguinom, ktorí zistili, že hrúbka vrstvy nanesej na substráte závisí na rýchlosti vyťahovania substrátu z povrstvovacej kvapaliny ( $U$ ) a geometrii substrátu pri nízkych hodnotách ( $< 10^{-3}$ ) kapilárneho čísla  $C = \eta U / \gamma < 1$ , kde  $\gamma$  je povrchové napätie a  $\eta$  je viskozita povrstvovacej kvapaliny. (Krochta & Cisneros-Zevallos, 2003)

Celková hrúbka povrchovej vrstvy ( $H$ ) tekutého média, zachytená na substráte, závisí od viacerých faktorov a z fyzikálneho hľadiska je potrebné zahrnúť do rovnice týchto činiteľov: rýchlosť vyťahovania substrátu z kvapaliny ( $U$ ), viskozitu ( $\eta$ ) a hustotu ( $\rho$ ) povrstvovacej kvapaliny, povrchové napätie na rozhraní medzi kvapalnou a plynnou fázou ( $\gamma_{LV}$ ), a gravitačné zrýchlenie ( $g$ ). (Berkenbusch, Cohen, & Zhang, 2008)

$$H = 0,94 \frac{(\eta \cdot U)^{2/3}}{\gamma_{LV}^{1/6} \cdot (\rho \cdot g)^{1/2}} \quad (1)$$

Táto Landau-Levich-Derjaguinova rovnica je veľmi dobre aplikovateľná pre uniformné vrstvy na povrchu substrátov v tvare dosky alebo cylindrických telies, pričom z teoretického hľadiska poskytuje vysokú presnosť predikcie hrúbky povrchovej vrstvy. V skutočnosti je potrebné do úvahy zahrnúť aj geláciu nanášaného média, rýchlosť vyparovania rozpúšťadiel, a vonkajšie faktory, ako sú teplota a atmosférické podmienky počas procesu povrstvovania. (Chengbin, Xiujian, & Haizheng, 2006)

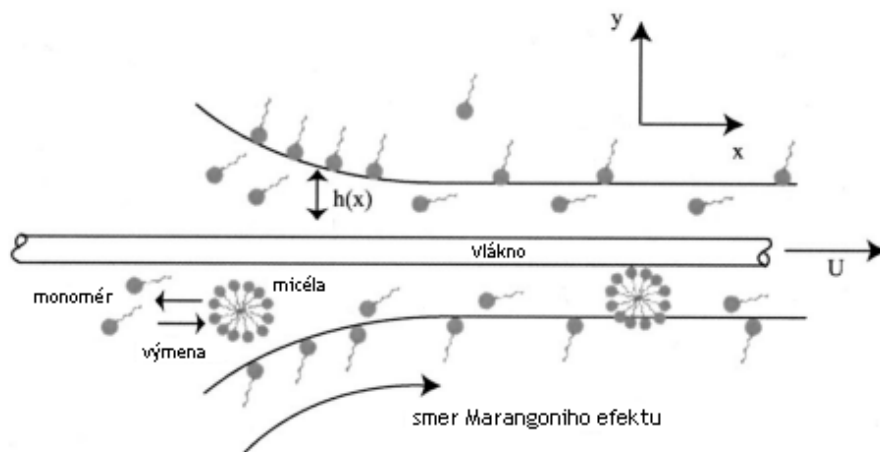
Hlavným cieľom pri povrstvovaní substrátov je dosiahnuť rovnomernú vrstvu na povrchu substrátu a zvýšiť adhéziu medzi substrátom a povrstvovacou kvapalinou. Toto je možné dosiahnuť buď zmenou povrchových vlastností substrátu, alebo vhodnou úpravou zloženia povrstvovacej kvapaliny. V oboch prípadoch dochádza k zmene povrchovej energie a tiež k zmene polarita povrchu pomocou surfaktantov. Surfaktanty sú amfifilné molekuly s hydrofilnými a hydrofóbnymi doménami a sú povrchovo aktívne, takže môžu výrazne ovplyvniť povrchové vlastnosti rozhraní. Prostredníctvom adsorpcie na povrchu redukujú tieto molekuly povrchové napätie. Tradične pri povrstvovaní možno použiť všetky tri typy surfaktantov: anionické

surfaktanty so záporným nábojom, neionické surfaktanty bez elektrického náboja a kationické surfaktanty, ktoré nesú kladný náboj. (Adamson & Gast, 1997) (Scheid, Delacotte, & Dollet, 2010)

Nanášanie surfaktantov na povrch vlákien v rôznych koncentráciách nad a pod kritickou micelárnou koncentráciou (CMC) bolo predmetom skúmania vo viacerých štúdiách. Vo všeobecnosti bolo pozorované, že prítomnosť surfaktantov v roztoku pod CMC zvyšovala adhéziu nanášanej vrstvy k vláknu a tým aj hrúbku povrchového filmu na vlákne v porovnaní s čistým roztokom. (Theander, 2006)

Tento jav je spôsobený Marangoniho efektom, pri ktorom hrá hlavnú úlohu rozdielna koncentrácia surfaktantu medzi meniskom a kontinuálnym filmom nanášanom pozdĺž vlákna. To vedie k zvýšeniu trakcie v smere ťahu vlákna a zhrubnutiu nanášanej vrstvy. Čím vyšší rozdiel je v koncentráciách surfaktantu medzi meniskom a povrchom vlákna, tým vyšší je vplyv Marangoniho efektu, čo pozitívne ovplyvňuje množstvo vrstvy na vlákne.

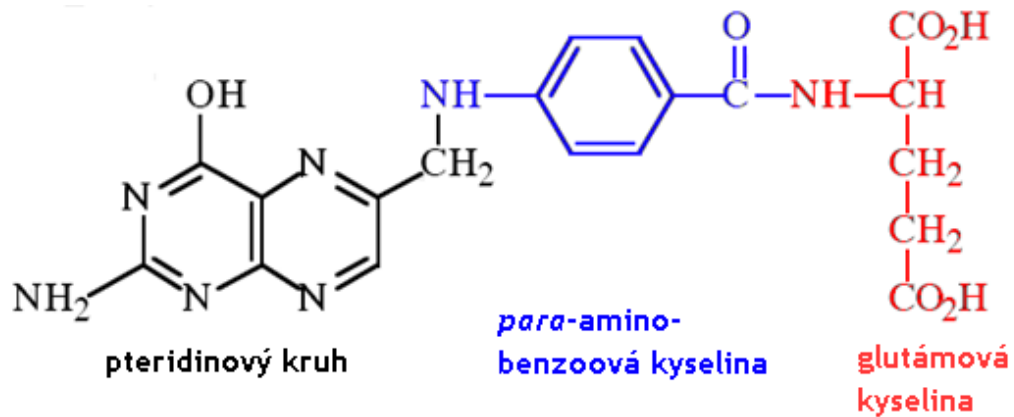
Množstvom surfaktantu nemusí nevyhnutne zvyšovať hrúbku povrchového filmu na substráte. Ak je koncentrácia surfaktantu rovná alebo presahujúca CMC, môže dochádzať k znižovaniu hrúbky nanášanej vrstvy. Tento fakt bol vysvetlený formovaním micél po dosiahnutí CMC, ktoré sú v konštantnej dynamickej rovnováhe s voľnými monomérmi surfaktantu. (Danov, Kralchevsky, & Ananthapadmanabhan, 2014) Micély ktoré sa nachádzajú v blízkosti rozhrania slúžia ako rezervoár voľných monomérov, ktoré sa adsorbujú na povrchu a vytvárajú uniformnejšiu distribúciu surfaktantu v porovnaní s koncentraciami surfaktantu pod CMC. Následne dochádza k redukcii Marangoniho efektu a poklesu hrúbky nanášanej vrstvy. Tento efekt bol pozorovaný pri použití surfaktantov Triton X-100 a dodecyl sulfátu sodného (SDS). (Yang & Mao, 2014) Princíp nanášania vrstvy na vlákno s použitím surfaktantu je zobrazený na obrázku 5.



Obrázok 5: Vlákno prechádzajúce cez tekutú lázeň. Naznačená je prítomnosť surfaktantov na rozhraní, micél a monomérnych jednotiek polyméru. (Shen, Gleason, McKinley, & Stone, 2002)

Hlavnými výhodami metódy je možnosť nanosenia obojstranne tenkej vrstvy na substráty takmer akýchkoľvek tvarov a veľkostí a vďaka jednoduchému nastaveniu parametrov procesu je možné dosiahnuť nanosenie veľmi kvalitnej a uniformnej vrstvy v požadovanej hrúbke. Pri použití tejto metódy je jednoduché udržiavať kontamináciu prostredia a množstvo odpadových produktov na minime, je ekonomicky nenáročná, automatizovateľná s vysokou produkčnou rýchlosťou a efektívnosťou. Medzi nevýhody patrí neustála kontrola viskozity povrstvovacej kvapaliny a hrúbky nanášanej vrstvy, rovnako nie je vhodná pre perforované substráty a predmety s dutinami. (Richardson & Lokensgard, 2004) (Thomas, 1994) (Takahashi & Wada, 1990)

## 6.7 Kyselina listová



Obrázok 6: Kyselina listová (Taylor & May, 2008)

Kyselina listová (FA) je syntetickou formou folátu, esenciálneho vitamínu B, tiež nazývaná pteroylglutámová kyselina alebo vitamín B9. FA je v ľudskom tele konvertovaná na 5-methyltetrahydrofolát, ktorý je formou folátu prirodzene sa vyskytujúceho sa v prírodných zdrojoch, najmä v zelenine, ovocí, strukovinách a obilí. FA sa zúčastňuje na replikácii DNA a RNA pri delení buniek, syntéze, oprave a metylácii DNA, histónov a niektorých proteínov. Jeho nedostatok môže viesť k vývojovým poruchám u vyvíjajúcich sa embryí a k megaloblastickej anémii v akomkoľvek veku. Suplementy s obsahom FA sa používajú v prevencii a liečbe folátovej nedostatočnosti a v prevencii nežiadúcich účinkov v súvislosti s antifolátovou medikáciou. FA sa podáva väčšinou perorálne vo forme tabliet, kapsúl, tiež intravenózne. (Wien, a iní, 2012)

Biologicky aktívnou formou kyseliny listovej je tetrahydrolistová kyselina (THFA), ktorá vzniká dvojstupňovou redukciou folátu pomocou dihydrofolát reductázy. THFA hraje kľúčovú úlohu v transfere jednouhlíkatých funkčných skupín - ako napríklad methyl, methylén a formylových skupín - do esenciálnych substrátov podieľajúcich sa na syntéze DNA, RNA a proteínov. THFA sa tiež zúčastňuje na enzymatických reakciách nevyhnutných pri syntéze purínu, tymidínu a aminokyselín. (Coffey-Vega & Gentili, 2015)

Tehotné ženy sú najrozšírenejšou skupinou v populácii, ktorej sa odporúča pravidelné podávanie FA. Nízky príjem FA (ale nad klinický deficit) počas tehotenstva zvyšuje riziko poruchy vývoja neurálnej trubice u vyvíjajúceho sa embrya. Význam kyseliny listovej v prevencii defektov neurálnej trubice je v súčasnosti jednoznačne dokázaný. Vývoj neurálnej trubice sa u plodu bežne končí do 28. dňa po počatí, teda už v období, keď väčšina žien ešte nevie o tom, že je gravidná. (Kovács, 2008)

Zvýšený príjem FA v tehotenstve sa odporúča jeden mesiac pred plánovaným začiatkom tehotenstva až do konca prvého trimestra. V tomto období je najväčšie riziko poruchy neurálnej trubice. (De-Regil, Fernández-Gaxiola, & Dowswell, 2010) Najnovšie vedecké poznatky ukazujú, že optimálna koncentrácia FA v krvi potrebná k prevencii vrodených porúch je 1000 nmol/l a trvá 12 týždňov, kým je suplementáciou 400 µg FA na deň táto hladina dosiahnutá. (Cawley, Mullaney, McKeating, & Farren, 2015)

Kyseliná listová je ligand s vysokou afinitou k folátovým receptorom, ktoré sú vo vysokej miere vytvárané u niektorých typov rakovinových buniek, napríklad u nádorových buniek vaječníkov a pľúc, no v bežných zdravých bunkách sú neprítomné. (Zorzi, Seijo, & Sanchez, 2015) FA znižuje hladiny homocysteínu, ktorý je často spájaný so vznikom kardiovaskulárnych chorôb, preto bol tiež používaný u pacientov so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych udalostí. Žiadne pozitívne účinky suplementácie FA však u týchto pacientov nedokázali. FA sa tiež zúčastňuje na syntéze nukleotidov a aminokyselín, vrátane metionínu. Pri nedostatku folátu sa syntéza, metylácia a oprava DNA obmedzí a výsledná nestabilita DNA zvyšuje riziko vzniku rakoviny. V posledných rokoch sa preukázalo, že suplementácia FA môže zvyšovať riziko vzniku rakoviny. Štúdie, v ktorých bola FA pacientom podávaná s cieľom redukovať hladiny homocysteínu ako sekundárnu prevenciu kardiovaskulárnych príhod ukazujú, že vysoké hladiny folátu môžu podporovať progresiu preneoplastických a nedagnostikovaných neoplastických lézií. (Cridler, Cordero, Ping Qi, & Mulinare, 2013)

## 6.8 Testovanie disolúcie

Disolúcia je postup, ktorý slúži na zisťovanie množstva aktívnej látky uvoľňovanej z rôznych liekových foriem, použitím známeho objemu disolučného média a stanoveného času. Hlavnou úlohou disolučných testov je získanie informácií o charaktere uvoľňovania aktívnej látky z konkrétnej liekovej formy produktu pri štandardizovaných podmienkach.

Disolučné štúdie hrajú dôležitú úlohu pri rutinnom testovaní kvality produktov, kde je potrebné zabezpečiť adekvátnu liberáciu liečiva s vysokou reprodukovateľnosťou a vo všetkých fázach vývoja nových liečiv. Ide o kľúčové metódy na určovanie fyzikálnych zmien liečiv a ich stability v liečivých prípravkoch. Disolučné skúšky sú oficiálne metódy používané liekopismi pre hodnotenie uvoľňovania liečiv z pevných a polopevných liekových foriem. Medzinárodný liekopis oficiálne udáva košíčkovú a pádlovú metódu ako dve základné metódy využívané pri disolúcii pevných orálnych liekových foriem. Ďalšie dve metódy používané pri disolúcii týchto liekových foriem sú prietoková cela a vratný valec. (WHO, 2015) (Sree Lakshmi & Badarinath, 2013)

Český liekopis v súčasnosti stanovuje disolúciu perorálnych liekových prípravkov v jednom zo štyroch prístrojov – prístroj s košíčkom, pádlom, vratným valcom a prietokovou celou. Pri vykonávaní disolučného pokusu a stanovovaní množstva aktívnej látky je potrebné špecifikovať typ použitého prístroja, zloženie, objem a teplotu disolučného média, rýchlosť otáčania alebo prietok média celou, podmienky priebežného sledovania, metódu a množstvo odoberaného média, časové intervaly v ktorých sa bude vzorka odoberať na analýzu a metódu pomocou ktorej bude analýza prebiehať. V určených časových intervaloch sa vzorky rozpustenej aktívnej látky odoberajú a nahrádzujú sa rovnakým objemom čerstvého média, prípadne sa môže počítať s úbytkom média. Pri použití zariadenia pre automatický odber vzoriek sa disolučné médiu vracia späť a preto ho nie je potrebné dopĺňať. (Český lékopis, 2017)

U disolučných testov liečiv, ktoré budú in vivo vystavené rôznym hodnotám pH, je výhodné používať modifikovanú disolučnú metódu s meniacimi sa hodnotami pH, ktorá presnejšie zohľadňuje podmienky, v ktorých sa liečivo nachádza. Medzi tieto



liečivá patria najmä perorálne podané lieky, ktoré prechádzajú gastrointestinálnym traktom (GIT). Z tohto dôvodu je vhodné upraviť metódu tak, aby napodobňovala zotrúvanie liekovej formy v každej časti GIT a tak lepšie simulovala reálne podmienky. (Dvořáčková, Rabišková, & Bautzová, Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva, 2011)

Disolučné skúšky boli pôvodne vyvinuté pre kvantifikáciu množstva uvoľnenej API z pevných liekových foriem – tabliet a kapsúl - s okamžitých aj postupným uvoľňovaním. Neskôr nadobudla disolúcia širší význam tiež pri testovaní novších a pokročilejších liekových foriem. V súčasnosti sa disolúcia používa pri hodnotení práškov, žuvacích, bukálnych a sublinguálnych tabliet, žuvacích gúm, želatinových kapsúl, čípkov, transdermálnych náplastí, aerosolov, imlantátov, mikročasticových injekčných preparátov a polopevných liekových foriem, ako sú napríklad masti, krémy a gély. Kvôli zásadným rozdielom vo formulácii týchto liekových foriem, ktoré vedú k veľmi rozdielnym fyzikálne-chemickým vlastnostiam s rozdielnym charakterom liberácie API, nie je možné používať jeden hodnotiaci systém, ktorý by bol použitý pre študovanie liberačných vlastností liečiva pre každú liekovú formu. Z tohto dôvodu sa v praxi uplatňujú rozličné aparáty, metódy a techniky, ktoré sú najviac vhodné pre danú liekovú formu, prípadne pre individuálny produkt, a najlepšie zodpovedajú špecifickým vlastnostiam prípravku. (Azarmi, Roa, & Lobenbe, 2007) (Dyas & Shah, 2007)

Vo všeobecnosti, základné princípy disolučných testov pre pevné perorálne liekové formy by mali byť rovnako aplikovateľné aj pre in vitro testy novších a pokročilejších liekových foriem. Primárny cieľ týchto testov je analogický k tomu pre pevné liekové formy – využitie pre biofarmaceutickú charakterizáciu produktu a prostriedok pre zabezpečenie konzistentnej kvality produktu alebo šarže pri použití špecifických kritérií hodnotenia. Kvôli rôznym vlastnostiam týchto liekových foriem a ich miestam aplikácie, je dôležité, aby aparát, zloženie disolučného média, rýchlosť prietoku, pH a teplota boli zvolené vzhľadom na zamýšľaný spôsob použitia. Pri takto zvolených podmienkach musí disolučná metóda poskytovať presné a reprodukovateľné údaje, zaručiť kvalitu hodnoteného produktu a umožniť čo najlepšiu interpretáciu získaných

dát o produkte vo vzťahu k in vivo prostrediu. (Siewert, Dressman, Brown, & Shah, 2003)

## 6.9 Disolúcia z polymérov

V oblasti kontrolovaného uvoľňovania API je znalosť disolúcie aktívnej látky z polyméru veľmi dôležitá. Ideálny systém s kontrolovanou liberáciou API poskytuje liečivo len keď je to nevyhnutné v konkrétnom mieste účinku a dávka API uvoľnená z polyméru je minimálna pre dosiahnutie terapeutického efektu. (Narasimhan & Mallapragada, 1998)

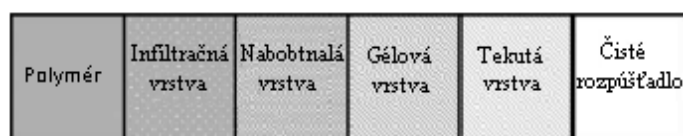
V rámci tohto systému je aktívna látka je rozpustená alebo dispergovaná v polymérnej matrici. Keď je systém v prítomnosti polymérneho rozpúšťadla, dochádza k bobtnaniu a zvyšovaniu mobility API, čo umožňuje jej difundáciu z polymérneho systému do okolitého prostredia. Najnovší vývoj systémov pre kontrolované uvoľňovanie terapeuticky účinných látok naznačuje, že tieto systémy v prostredí in vivo a in vitro nielenže v tele zvyšujú stabilitu ochranou nestabilných liečiv od nepriaznivých podmienok, ale tiež zvyšujú dobu zotrvania liečiva v mieste aplikácie a čas, po ktorý tam liečivo pôsobí v jeho aktívnej forme. Preto vhodnou voľbou polymérneho systému možno poskytnúť API, ktoré by inak kvôli ich nestabilite alebo nízkej biodostupnosti nebolo možné použiť. (Lee & Good, 1987)

Disolúcia liečiva z polyméru je spojená s procesom rozpúšťania polyméru, ktorý zahrňuje dva transportné procesy – difúziu rozpúšťadla a rozpletenie reťazcov polyméru. Keď je nesieťovaný, amorfný polymér v kontakte s termodynamicky kompatibilným rozpúšťadlom, rozpúšťadlo bude difundovať do polyméru. Takto vzniká nabobtnalá, gélu podobná vrstva, ktorá je formovaná s dvoma samostatnými rozhraniami – jedno medzi kryštalickým polymérom a gélovou vrstvou a druhé medzi gélovou vrstvou a rozpúšťadlom. Po čase sa polymér rozpustí, no stáva sa, že polymér praskne a žiadna gélová vrstva sa nevytvorí.

Dva faktory ktoré najviac ovplyvňujú stabilitu polyméru sú jeho schopnosť absorbovať rozpúšťadlo a intenzita difúzie rozpúšťadla do polyméru. Povrchová štruktúra polyméru sa postupne mení, keď sa rozpúšťadlo snaží preniknúť do

polyméru. Pri ďalšej penetrácii solventu, polymér zväčšuje svoju nabobtnalú povrchovú vrstvu, do chvíle, kým sa nedostane do stavu, že je transport makromolekúl z jeho povrchu do rozpúšťadla zastavený. Nakoniec dochádza k desorpcii solvatovaných makromolekúl z polyméru do rozpúšťadla.

Čistý polymér v kryštalickom stave obsahuje určitý voľný objem vo forme kanálikov molekulárnych rozmerov. Prvé penetrujúce molekuly rozpúšťadla infiltrujú polymér cez tieto kanáliky a začínajú difúzny proces bez nutnosti vytvárať nové cesty, ktorými by prenikli dovnútra. Po prieniku rozpúšťadla dochádza k formovaniu systému polymér-rozpúšťadlo a polymér začína bobtnať. Postupne sa vytvára gélová vrstva polyméru, ktorá obsahuje nabobtnalý polymérny materiál a vrstva rozpúšťadla, ktorá prechádza do čistého rozpúšťadla. (Duda, 1985) (Ouano, 1982) (Bonaccorso & Pericet-Camara, 2016)

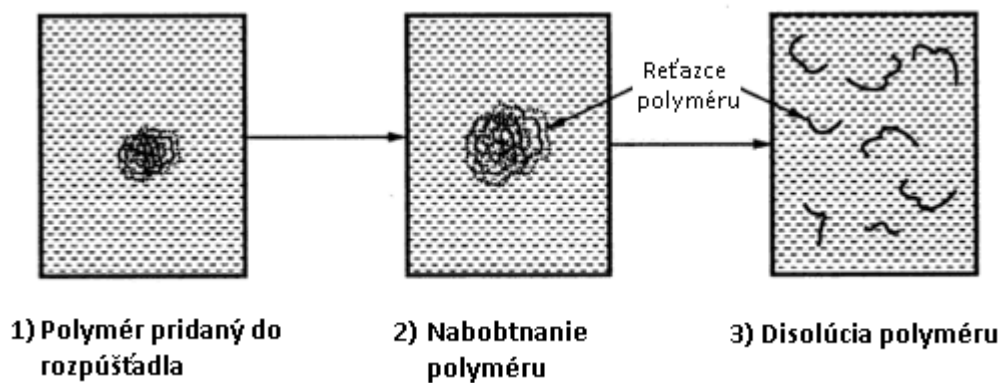


Obrázok 7: Schématické zobrazenie kompozície povrchovej vrstvy (Miller-Chou & Koenig, 2003)

Jeden z hlavných faktorov, ktorý ovplyvňuje rozpustnosť polyméru je molekulová hmotnosť. Je veľmi dobre známe, že rýchlosť rozpúšťania sa spomaľuje s narastajúcou molekulovou hmotnosťou. Disolúcia je kontrolovaná rozpletaním reťazcov polyméru, čo je funkciou molekulovej hmotnosti. Väčšie molekulové hmotnosti väčší stupeň rozpletania a bobtnajú viac ako menšie reťazce pred samotnou disolúciou. Rozpustnosť môže ovplyvniť aj polydisperzný index. Už v roku 1989 boli skúmané vzorky polyméru s rovnakou molekulovou hmotnosťou ale rôznym stupňom polydisperzity a výsledkom bolo, že polydisperzné vzorky sa rozpúšťali dvojnásobne rýchlejšie ako monodisperzné. (Manjkow, Papanu, & Hess, 1987)

Okrem molekulovej hmotnosti, možno disolučný proces ovplyvniť tiež chemickým zložením jednotlivých reťazcov, ich zoskupením, stereochemiou, voľbou vhodného

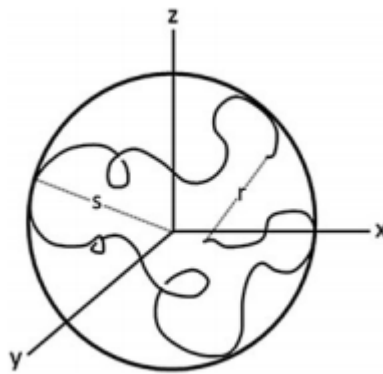
rozpúšťadla, a externých parametrov, ako sú napríklad agitácia a frekvencia miešania, teplota, prítomnosť enzýmov alebo radiácia. (Ueberreiter, 1968)



Obrázok 8: Disolúcia polyméru (George, S.A.Kanavade, Barsode, & Mhaske, 2006)

Obrázok číslo 8 zobrazuje dve základné fázy disolúcie polyméru. V prvej fáze – po pridaní polyméru do rozpúšťadla – difunduje solvent pomaly do polyméru a vytvára nabobtnalý gél. Počas bobtnania, molekuly rozpúšťadla prechádzajú do polymérnej matrice, zatiaľ čo molekuly polyméru zostávajú v polymérnej matrici a neprechádzajú do rozpúšťadla. Tým sa zvyšuje objem polyméru. Ako bobtnanie pokračuje, stále viac a viac polymérnych reťazcov sa oddeľuje z matrice a pomaly sa uvoľňujú do rozpúšťadla, čím nakoniec v druhej fáze vznikne polymérny roztok. (Jail & Kulkarni, 2009) (Teegarden, 2004)

Kvôli Brownovmu pohybu a termodynamickej energii menia molekuly v roztoku neustále svoj tvar. Preto sa veľkosť reťazca nedá presne určiť a vychádza zo štatistických predpokladov a priemerných rozmerov. Ak by bola molekula úplne natiahnutá, jej veľkosť by sa dala jednoducho vypočítať z dĺžok jednotlivých väzieb a ich uhlov. Takýto prípad sa však reálne nevyskytuje, preto sa veľkosť u bežných polymérov vyjadruje strednou vzdialenosťou medzi koncami reťazca,  $r^2$ , a gýračným polomerom z hypotetického centra gravitácie,  $s^2$ . (Su, 2013)

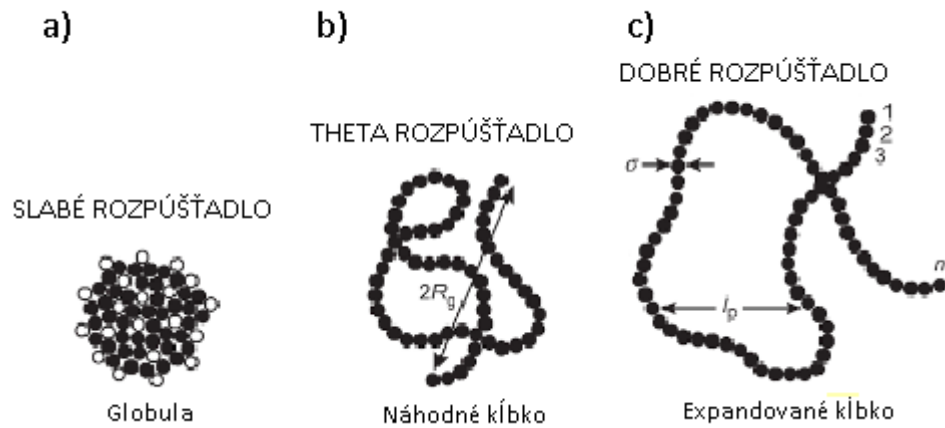


Obrázok 9: Schématické zobrazenie náhodného kĺbka,  $r$  = vzdialenosť oboch koncov reťazca,  $s$  = gyačný polomer (Stevens, 1999)

Tvar molekuly reťazca polyméru je sférický a náhodne usporiadaný do tvaru, ktorý je nazývaný náhodné kĺbko. (Gupta, 2010) Čím vyššia je afinita rozpúšťadla k polyméru, tým väčšie je náhodné kĺbko a tým väčší je aj hydrodynamický polomer (rádius), pretože sa zväčšuje polomer sféry. Ako sa interakcia rozpúšťadlo – polymér znižuje, intramolekulárne sily sa stávajú dôležitejšie, čo vedie k zníženiu hydrodynamického polomeru. (Puskas, 2013)

Veľkosť náhodného kĺbka daného polyméru je závislá na voľbe rozpúšťadla (Obrázok č. 9). Dobré rozpúšťadlo rozpína kĺbko, slabé rozpúšťadlo kĺbko zmršťuje. Medzi týmito dvoma extrémami sa nachádza tzv. theta rozpúšťadlo ( $\Phi$ -rozpúšťadlo). Na reťazec polyméru, ktorý je v  $\Phi$ -rozpúšťadle, pôsobia intermolekulárne a intramolekulárne interakcie rovnakou silou. Takýto solvent je považovaný pre polymér za „ideálny“, pretože tu nie sú žiadne príťažlivé ani odpudivé interakcie medzi jednotlivými segmentami reťazca. V tomto rozpúšťadle neinteragujú reťazce medzi sebou ani pri náhodnom stretnutí a tiež nedochádza k ich vzájomnému pôsobeniu. V dobrom rozpúšťadle sa jednotlivé segmenty reťazca od seba odpudzujú, kĺbko bobtná a rozpína sa. Na druhej strane, v zlých rozpúšťadlách, časti reťazca sa vzájomne priťahujú a kĺbko sa zmršťuje. Ak je interakcia segment-segment príliš silná kvôli iónovým, van der Waalsovým, hydrofóbnym interakciám alebo vodíkovým mostíkom, kĺbko sa zmrští natoľko, že vytvorí kompaktnú štruktúru (napr. globulárne proteíny a DNA). (Cowie, 1991)

Slabé rozpúšťadlo možno premeniť na dobré rozpúšťadlo pridaním nejakých látok alebo zvýšením (alebo znížením) teploty nad (alebo pod) určitú kritickú hodnotu, známu ako theta teplota ( $T_\Phi$  alebo  $\Phi$ ), pri ktorej sa  $\alpha = 1$ . (Gedde, 2013)



Obrázok 10: Rôzne štádiá izolovaného polymérneho reťazca v roztoku, každý reťazec je zložený z  $n$  monomérnych jednotiek o dĺžke  $l$  a šírke  $\sigma$ . (a) globula (b) náhodné kĺbko (c) expandované kĺbko (Israelachvili, 2011)

## **7 Experimentálna časť**

### **7.1 Použité suroviny**

Vlákno z natívneho hyaluronanu, MW 650 kDa – Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, Česká republika

Hydrofobizovaná soľ kyseliny hyaluronovej, MW 83 kDa – Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, Česká republika

Propylenglykol, min. 99,5% – Penta, Praha, Česká republika

Propan-1-ol, p.a., min. 99,5% – Lach:ner, Neratovice, Česká republika

Demineralizovaná voda – Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, Česká republika

Lecitin sójový granulovaný, ≥ 97% – Acros Organics, Fisher Chemicals Co., USA

Chlorid sodný, p.a. – Lach:ner, Neratovice, Česká republika

Hydrogenuhlíčitán sodný, p.a. – Lach:ner, Neratovice, Česká republika

Chlorid draselný, p.a. – Penta, Praha, Česká republika

Hydrogenfosforečnan didraselný trihydrát, ≥ 99% – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Chlorid horečnatý hexahydrát, p.a. – Lach:ner, Neratovice, Česká republika

Trizma base [tris(hydroxymethyl)aminomethane], ≥ 99,9% – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Kyselina chlorovodíková, 37% – Sigma-Aldrich, Praha,

Chlorid vápenatý, p.a. – Penta, Praha, Česká republika

Síran sodný bezvodý, p.a., min. 99% – Lach:ner, Neratovice, Česká republika

Kyselina listová, ≥ 97% – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

### **7.2 Použité prístroje**

Magnetická miešačka MR Hei-Standard – Heidolph Instruments, Schwabach, Nemecko

Analytické váhy Excellence XS 205/XS 204 – Mettler Toledo, Columbus, USA

Zariadenie na dip-coating technológiu – Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, Česká republika

Rotačný reometer AR-G2 – TA Instruments, New Castle, Delaware, USA

Trepačka IKA, priemer 30 mm – IKA Werke GmbH & Co, Staufen, Nemecko

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, Shimadzu LC-20AD prominence – Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonsko

PDA detektor Shimadzu SPD-M20A prominence – Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonsko

Separáčna kolóna LC C-18 Jupiter 4U Proteo 90A, 250 mm x 4,6 mm – Phenomemex, Aschaffenburg, Nemecko

Analytický softvér Shimadzu LabSolutions Multi LC – Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonsko

### **7.3 Použité metódy**

#### **7.3.1. Príprava záterovej disperzie**

Do kádinky o objeme 10 ml bolo navážených 300 mg hydrofobizovaného derivátu kyseliny hyaluronovej. Kádinka bola umiestnená na magnetickú miešačku a pri rýchlosti miešania 100 rpm bolo pridané požadované množstvo kyseliny listovej. Po homogenizácii kyseliny listovej v deriváte HA bol do zmesi za stáleho miešania postupne pridaný propylenglykol v objeme 3 ml, v ktorom sa derivát s kyselinou listovou disperguje. Po dispergácii derivátu HA bol objem propylenglykolu doplnený do celkového množstva 8 ml a pridaná demineralizovaná voda v objeme 2 ml. Zmes v kádinke bola nepretržite miešaná na magnetickej miešačke minimálne 6 hodín tak, aby vynikol polymérny sliz hydrofobizovaného derivátu kyseliny hyaluronovej s kyselinou listovou.

#### **7.3.2 Reologické vlastnosti disperzií**

Boli pripravené disperzie hydrofobizovaného derivátu kyseliny hyaluronovej s kyselinou listovou podľa postupu popísaného v kapitole 6.2 a premerané ich reologické vlastnosti. Merania boli vykonané v usporiadaní kužel-doska použitím rotačného reometru AR-G2 (TA Instruments, USA), pomocou oceľovej geometrie (1° uhol, priemer 60 mm) pri teplote  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Šírka štrbiny bola pri meraní 100  $\mu\text{m}$ , pre-shear trval 30 sekúnd a ekvilibračný čas bol nastavený na 60 sekúnd. Merania prebiehali v rozpätí šmykovej rýchlosti od 0,01 do 5000 1/s. Pri meraní bola



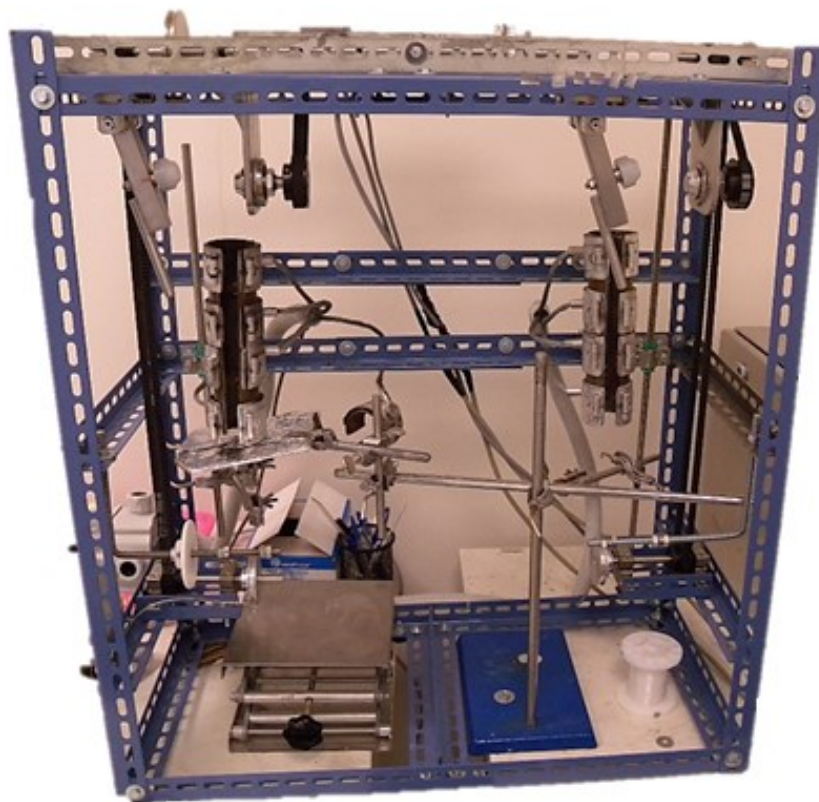
sledovaná závislosť viskozity na šmykovej rýchlosti. Výsledky merania reologických vlastností disperzií sú uvedené na obrázku 12.

### **7.3.3. Povrchová úprava vlákna pred nanosením disperzie**

Všetky vlákna boli pred procesom povrstvovania upravené tak, že na ich povrch bola nanosená vrstva lecitínu (Acros Organics, USA). Pre tento účel bol použitý 0,1% roztok lecitínu v 80% roztoku propylenglykolu. Požadované množstvo lecitínu bolo rozpustené v demineralizovanej vode, ktorá tvorila 20% z celkového množstva objemu roztoku. Kvôli zlej rozpustnosti bol lecitín vo vode trepaný na trepačke až do úplnej dispergácie. Následne bol do zmesi pridaný propylenglykol do celkového objemu.

### **7.3.4. Povrstvovanie vlákien záterovou disperziou**

Nanášanie disperzie na povrch vlákien bolo uskutočnené pomocou prototypového zariadenia na dip-coating technológiu, ktoré bolo vyrobené v Contipro Biotech s.r.o. (Dolní Dobrouč, ČR). Cievka s vláknom, ktoré bolo najskôr povrstvené lecitínom, bola umiestnená do spodného držiaka a vlákno bolo natiahnuté na vrchnú cievku cez dve pipetové špičky (1 ml a 100 µl), ktoré slúžili na orezávanie nadbytočnej poťahovacej disperzie. Tesne pod výhrevné teleso bola umiestnená alobalová fólia, ktorá odrážala teplo a spomaľovala zasychanie disperzie na spodnej kladke. Teplota vo vnútri výhrevného telesa dosahovala približne 230°C a vlákna boli povrstvované rýchlosťou 1,5 m/min.



Obrázok 11: Prototyp stroja použitého na povrstvovanie vlákien

#### **7.4 Výber modelovej liečivej látky**

Ako modelová liečivá látka bola použitá kyselina listová (Sigma-Aldrich, ČR).

#### **7.5 Chromatografická analýza**

Shimadzu LC-20AD Prominence (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonsko) vybavený PDA detektorom Shimadzu SPD-M20A Prominence (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonsko) bol použitý pre chromatografickú analýzu. Chromatogramy boli získané a vyhodnotené softvérom Shimadzu LabSolutions Multi LC.

Disolučné vzorky boli pred nástrekom na chromatografickú kolónu prefiltrované striekačkovými nylonovými filtrami s priemerom 13 mm a veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$ . Na separáciu bola použitá LC kolóna C-18 Jupiter 4U Proteo 90A, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Nemecko) temperovaná na 40°C  $\pm$  0,2°C s použitím octanového pufru a metanolu (10 mM; 2,5 pH) ako mobilnej fáze v gradientovej

elúcii (2-12 min gradient 10% - 75% methanolu). Kyselina listová bola premeraná pri vlnovej dĺžke 283 nm a jej približný retenčný čas bol 9,5 minúty. Objem nástreku na kolónu bol 10  $\mu$ l a rýchlosť prietoku 1 ml/min.

Kalibračná rovnica bola získaná lineárnou regresiou plochy pod píkom proti koncentrácii analytov v korešpondujúcich štandardných roztokoch. Získaná plocha pod píkom pre jednotlivé roztoky bola porovnávaná s píkmi štandardných roztokov a pomocou kalibračnej rovnice bolo vypočítané množstvo kyseliny listovej vo vzorku. Podmienky stanovenia kyseliny listovej, vrátane množstva mobilnej fázy v jednotlivých časových intervaloch gradientu sú zhrnuté v tabuľke č. 2.

*Tabuľka 2: Podmienky stanovenia kyseliny listovej chromatografickou analýzou*

HPLC	Shimadzu Prominence LC-20AD
Kolóna	C-18Jupiter 4U Proteo 90A (250x4,6mm)
Mobilná fáza	A =10 mM CH <sub>3</sub> COONa pH=2.5; B = MeOH
Gradient	0 – 2 min 10 % B 2 – 12 min 10 – 75 % B 12 – 14 min 75 % B 14 – 17 min 75 – 10 % B 17 – 20 min 10 % B
Ostatné podmienky	1 ml/min, 40 $\pm$ 0,2°C, 283 nm, 10 $\mu$ l

## 7.6 Príprava disolučného média

Disolúcia prebiehala v roztoku simulovanej krvnej plazmy (SBP) o pH 7,25. SBP bola pripravená použitím reagensí uvedených v tabuľke č. 3. (Margareth, Loebenberg, & Almkainzi, 2011)

Tabuľka 3: Zloženie disolučného média

Chlorid sodný	6,715g
Hydrogenuhličitan sodný	2,268g
Chlorid draselný	0,225g
Hydrogenfosforečnan didraselný trihydrát	0,231g
Chlorid horečnatý hexahydrát	0,311g
1 M kyselina chlorovodíková	39 ml
Chlorid vápenatý	0,292g
Síran sodný	0,072g
tris(hydroxymethyl)aminomethan	6,118 g
Destilovaná voda	ad 1000 ml

Jednotlivé zložky boli postupne pridávané do 700 ml destilovanej vody v poradí uvedenom v tabuľke 3, až kým sa každá zo zložiek kompletne nerozpustila. Následne bolo upravené pH roztoku na 7,4 použitím 1 M kyseliny chlorovodíkovej a objem roztoku bol doplnený destilovanou vodou do 1000 ml.

## 7.7 Disolučný test

Pre disolučné testy boli použité vlákna o hmotnosti 0,02 – 0,1 g navážené s presnosťou na 0,5 mg. Uvoľňovanie kyseliny listovej z vlákien prebiehalo formou stacionárnej disolúcie v inkubátore pri teplote  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Navážka vlákna bola umiestnená do kádinky a zaliata 30 ml roztoku SBP, ktorá bola dopredu vyhriata na  $37^\circ\text{C}$ . Disolúcia prebiehala po dobu 168 hodín (7 dní) v uzatvorených kádinkách. Pre stanovenie obsahu kyseliny listovej bol v určených časových intervaloch automatickou pipetou odobraný 1 ml disolučného roztoku, ktorý nebol dopĺňovaný čerstvým médiom. Pred samotným odberom bolo médium premiešané na magnetickej miešačke pri rýchlosti 200 rpm po dobu 10 sekúnd. Kvôli fragmentácii vlákna v disolučnom médiu a možnosti upchania chromatografickej kolóny boli

odoberané vzorky prefiltrované striekačkovým nylonovým filtrom o priemere 13 mm a veľkosti pórov 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 7.8 Výpočet množstva FA vo vzorke

Pre výpočet kumulatívneho množstva kyseliny listovej uvoľneného do disolučného média v akomkoľvek časovom bode bola zistená koncentrácia kyseliny listovej vo vzorke vynásobená objemom disolučného média. V prípade viacnásobného odberu vzoriek bez doplnenia disolučného média boli do výpočtu obsahu FA v celkovom objeme média zahrnuté korekčné faktory zohľadňujúce pokles objemu disolučného média po každom odbere vzorky a stratu aktívnej látky v dôsledku odoberania vzoriek v jednotlivých časových intervaloch. Táto oprava pridá späť už odobrané množstvo aktívnej látky obsiahnuté v objeme každého odoberaného vzorku ku kumulatívne množstvu vypočítanému v nasledujúcich časových bodoch.

Množstvo aktívnej látky ktoré sa stráca v dôsledku odoberania malého objemu vzoriek z disolučného média  $V_s$ , je  $C_1 \times V_s$ , kde  $C_1$  je koncentrácia aktívnej látky v tomto objeme. Do úvahy bol braný jednak pokles objemu disolučného média po každom odbere, jednak strata kyseliny listovej v dôsledku odoberania vzoriek. Disolučné hodnoty pre prvé dva časové body boli vypočítané tak, ako je znázornené v rovniciach 1 a 2 po odbere prvej, resp. druhej vzorky.

$$\text{množstvo rozpustenej aktívnej látky} \quad C_1 \times V_1 \quad (2)$$

$$\text{množstvo rozpustenej aktívnej látky} \quad C_2 \times V_2 + C_1 \times V_s \quad (3)$$

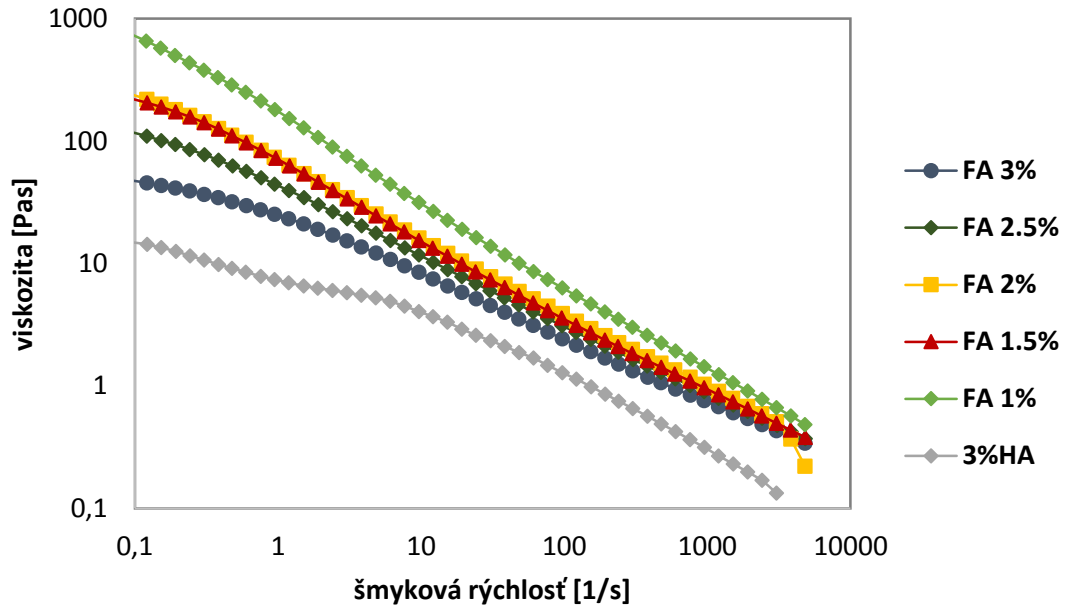
V rovniciach 1 a 2, objemy  $V_1$  a  $V_2$  sú objemy disolučného média odoberané v čase 1 a 2. Podobným spôsobom je po odobraní  $n$ -tej vzorky vypočítané množstvo uvoľnenej aktívnej látky pomocou všeobecného vzorca:

$$C_n \times V_n + \sum^{n-1} C_i \times V_s \quad (4)$$

Pre prvý odber nie je korekcia potrebná. Pre nasledujúce odbery sa korekcia stáva dôležitejšia s tým, ako stúpa množstvo odoberaných vzoriek.

## 8 Výsledky

### 8.1 Reologické vlastnosti disperzií

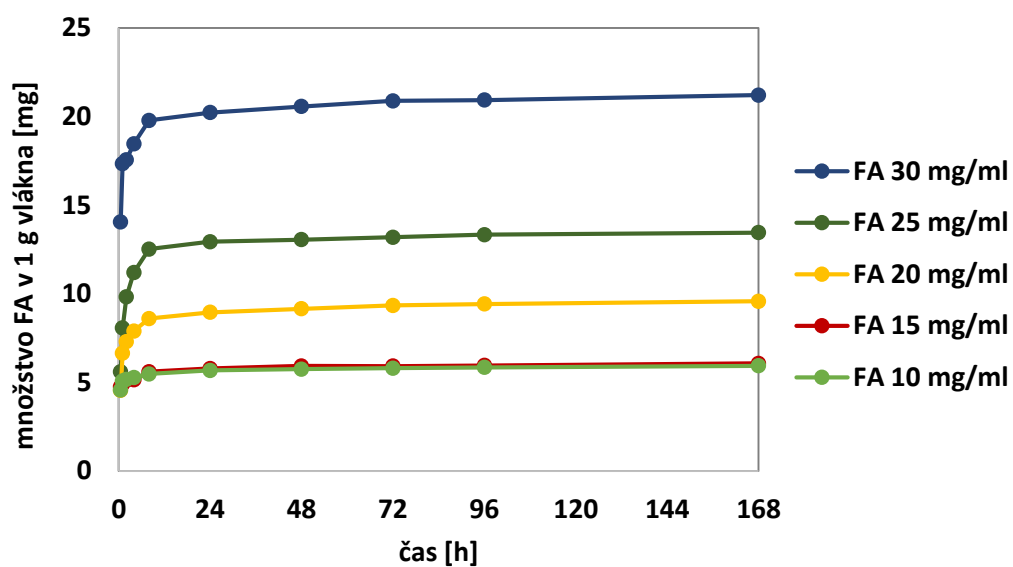


Obrázok 12: Reogramy disperzií nanášaných na vlákno

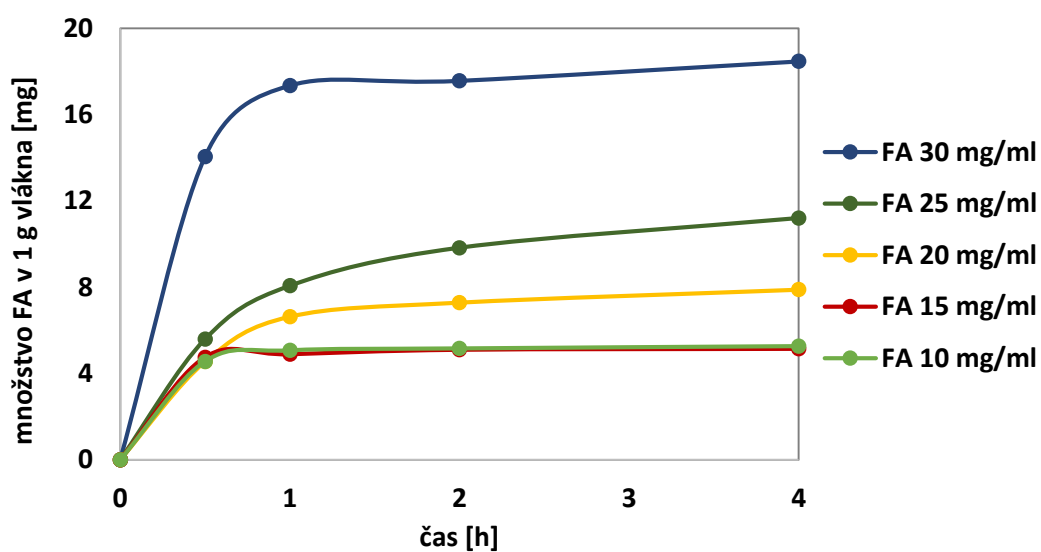
### 8.2 Disolúcia vlákien povrstvených jednou vrstvou kyseliny listovej

Tabuľka 4: Výsledky merania disolúcie FA pri nanosení jednej vrstvy FA

čas [h]	množstvo FA v 1 grame vlákna [mg]				
	1% FA	1,5% FA	2% FA	2,5% FA	3% FA
0,5	4,56	4,75	4,55	5,59	14,05
1	5,07	4,89	6,64	8,06	17,35
2	5,16	5,10	7,29	9,83	17,57
4	5,27	5,14	7,89	11,20	18,47
8	5,47	5,59	8,60	12,52	19,78
24	5,67	5,78	8,95	12,93	20,23
48	5,74	5,93	9,15	13,05	20,57
72	5,79	5,92	9,34	13,19	20,89
96	5,84	5,95	9,42	13,33	20,93
168	5,93	6,07	9,57	13,45	21,22



Obrázok 13: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien v priebehu 7 dní

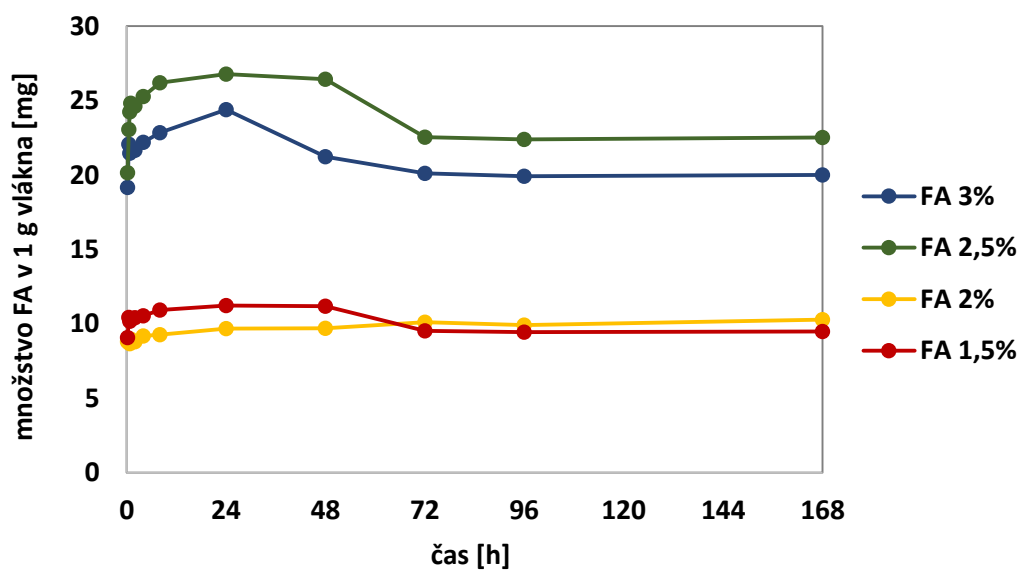


Obrázok 14: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien v priebehu prvých 4 hodín

## 8.2.1 Reprodukovanosť disolúcie vlákien povrstvených jednou vrstvou kyseliny listovej

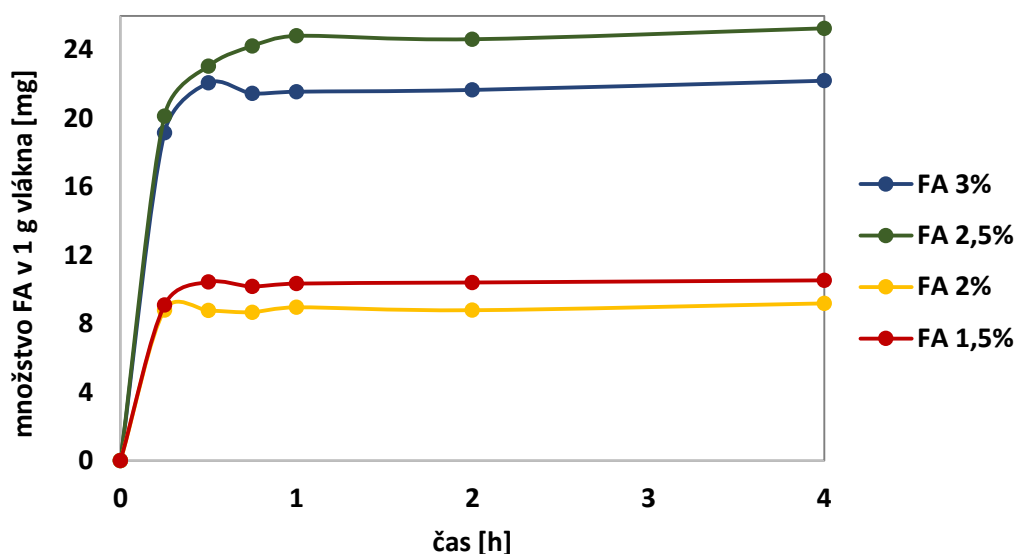
Tabuľka 5: Reprodukovanosť merania disolúcie FA pri nanosení jednej vrstvy FA

čas [h]	množstvo FA v 1 grame vlákna [mg]			
	1,5% FA	2% FA	2,5% FA	3% FA
0,5	10,44	8,77	23,06	22,08
1	10,35	8,96	24,83	21,56
2	10,41	8,79	24,63	21,67
4	10,54	9,19	25,27	22,21
8	10,92	9,27	26,21	22,84
24	11,23	9,68	26,77	24,38
48	11,18	9,70	26,43	21,24
72	9,53	10,11	22,53	20,11
96	9,44	9,93	22,40	19,91
168	9,48	10,29	22,52	20,01



Obrázok 15: Reprodukovanosť obsahu FA uvolnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien v priebehu 7 dní



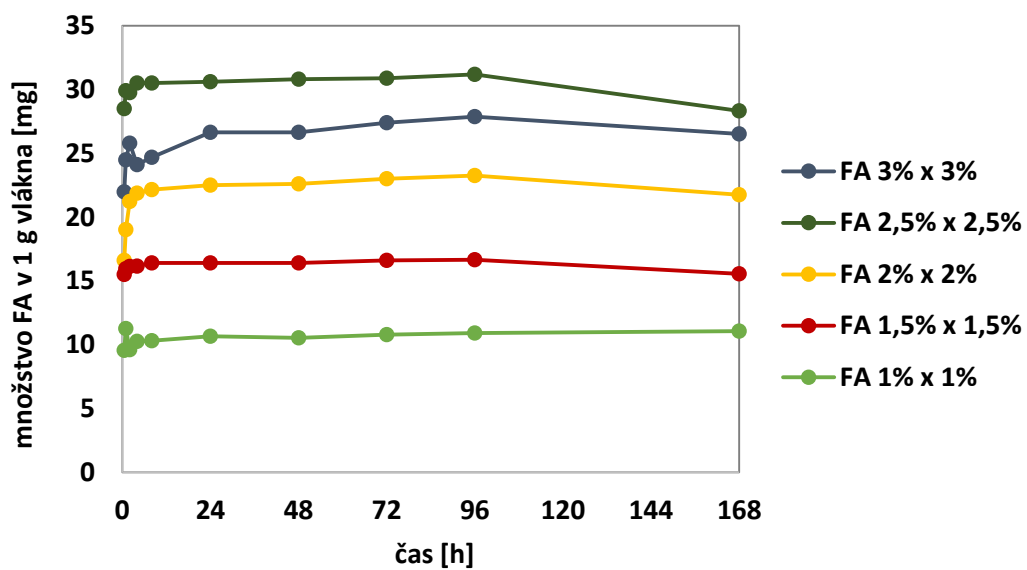


Obrázok 16: Reprodukateľnosť obsahu FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien počas prvých 4 hodín

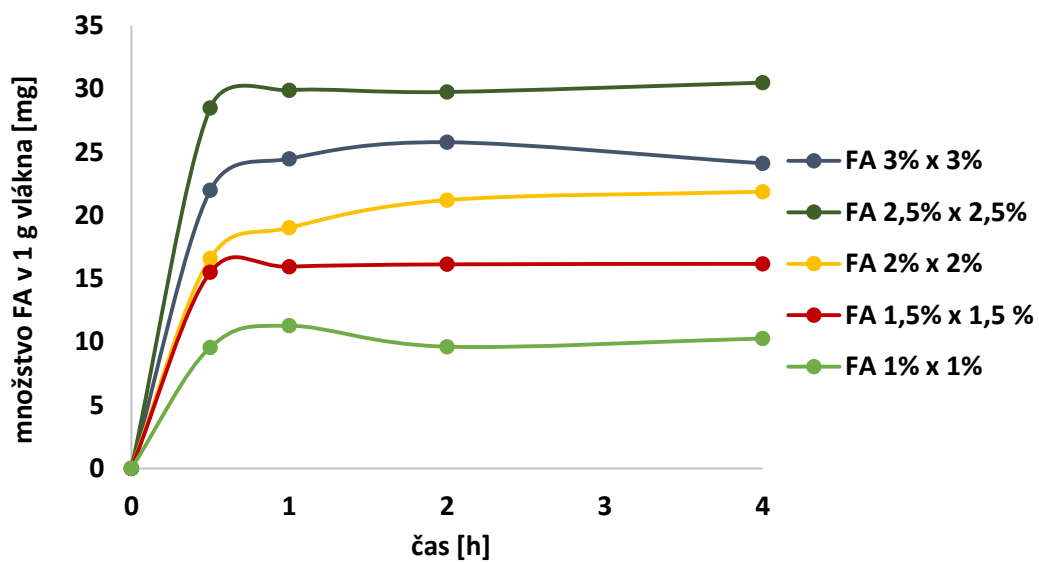
### 8.3 Disolúcia vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej

Tabuľka 6: Výsledky merania disolúcie FA pri nanosení dvoch vrstiev FA

čas [h]	množstvo FA v 1 grame vlákna [mg]				
	1% FA	1,5% FA	2% FA	2,5% FA	3% FA
0,5	9,57	15,50	16,61	28,50	21,98
1	11,27	15,95	19,02	29,90	24,48
2	9,62	16,13	21,22	29,76	25,79
4	10,27	16,17	21,88	30,50	24,12
8	10,33	16,40	22,15	30,50	24,69
24	10,67	16,40	22,50	30,60	26,65
48	10,55	16,40	22,60	30,80	26,66
72	10,78	16,60	23,01	30,90	27,40
96	10,91	16,67	23,27	31,20	27,88
168	11,07	21,80	21,74	28,33	26,53



Obrázok 17: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami v priebehu prvých 7 dní

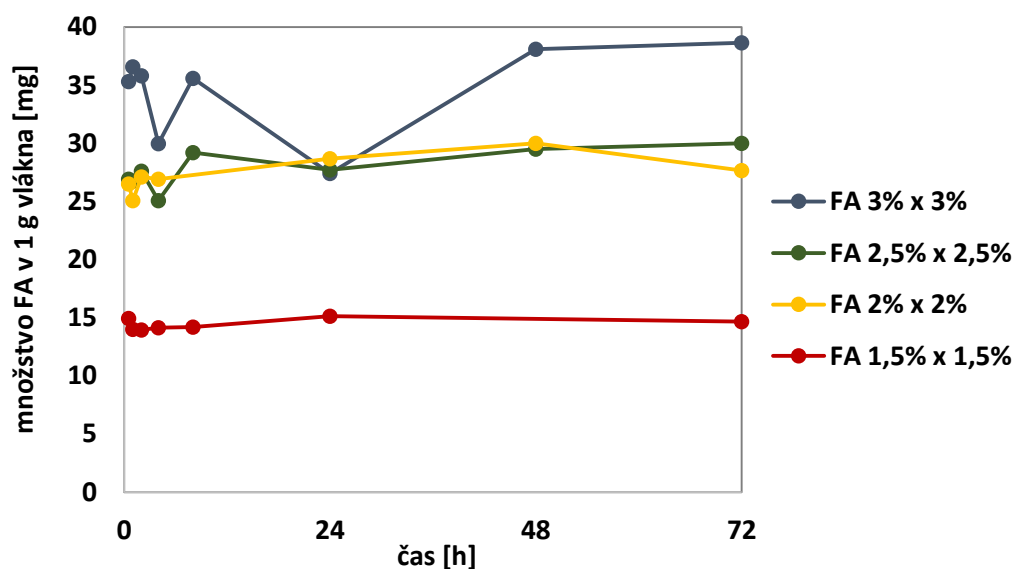


Obrázok 18: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami v priebehu prvých 4 hodín

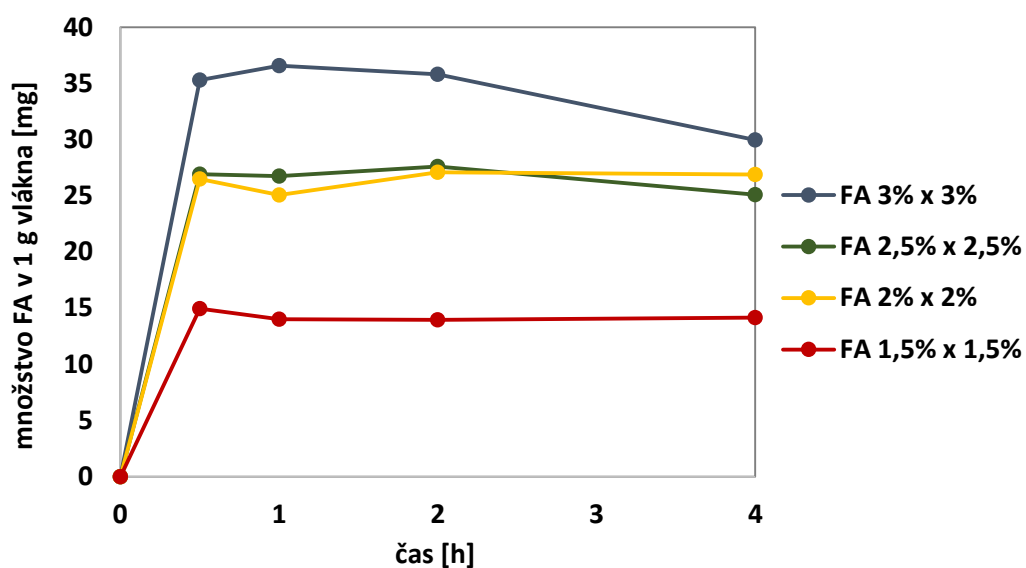
### 8.3.1 Reprodukovanosť disolúcie vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej

Tabuľka 7: Reprodukovanosť výsledkov merania disolúcie FA pri nanosení dvoch vrstiev FA

čas [h]	množstvo FA v 1 grame vlákna [mg]			
	1,5% FA	2% FA	2,5% FA	3% FA
0,5	14,94	26,50	26,91	35,30
1	14,00	25,07	26,76	36,58
2	13,95	27,10	27,60	35,81
4	14,14	26,90	25,08	29,96
8	14,20	25,06	29,19	35,58
24	15,12	28,68	27,71	27,41
48	14,65	30,00	29,50	38,09
72	13,94	27,65	29,99	38,64



Obrázok 19: Reprodukovanosť obsahu FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami v priebehu 3 dní

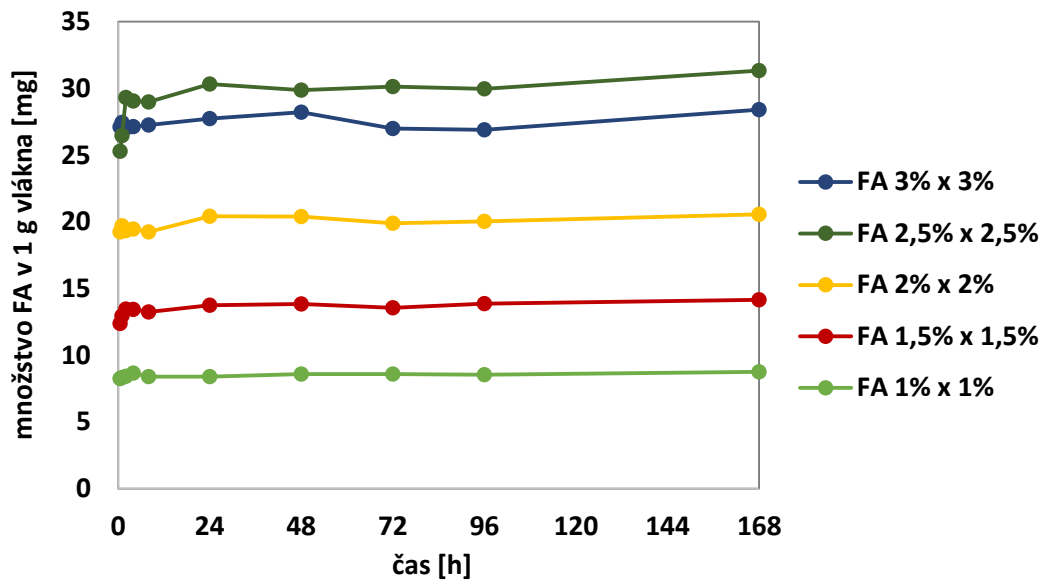


Obrázok 20: Reprodukateľnosť obsahu FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami v priebehu prvých 4 hodín

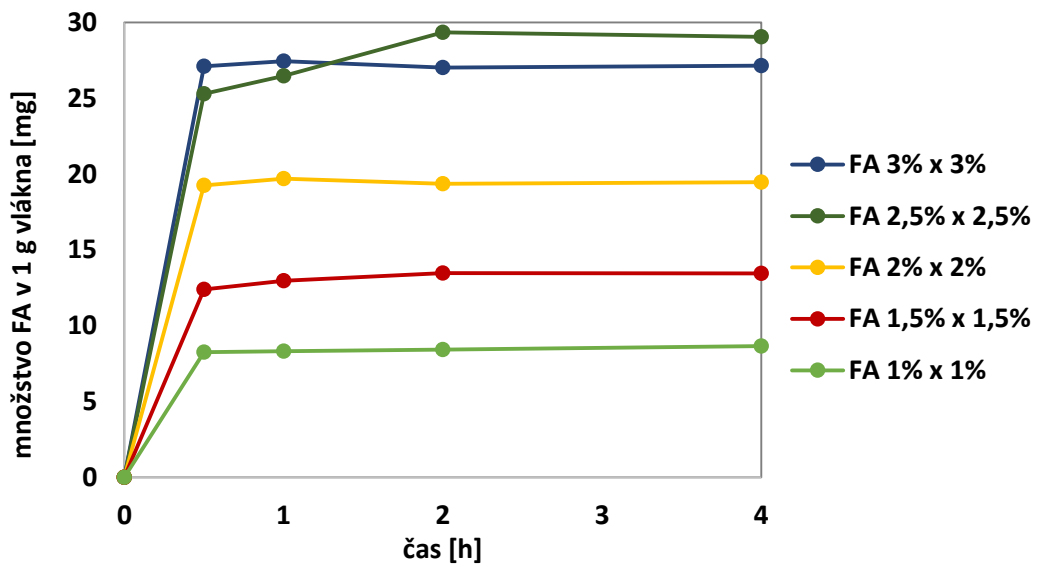
#### 8.4 Disolúcia vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej a jednou ochrannou vrstvou

Tabuľka 8: Výsledky merania disolúcie FA pri nanesení dvoch vrstiev FA a jednej ochrannej vrstvy

čas [h]	množstvo FA v 1 grame vlákna [mg]				
	1% FA	1,5% FA	2% FA	2,5% FA	3% FA
0,5	8,26	12,39	19,24	25,29	27,11
1	8,32	12,95	19,69	26,47	27,44
2	8,42	13,47	19,35	29,33	27,02
4	8,66	13,44	19,47	29,05	27,14
8	8,40	13,25	19,25	28,99	27,25
24	8,41	13,74	20,43	30,32	27,74
48	8,59	13,84	20,39	29,87	28,22
72	8,60	13,55	19,90	30,15	27,00
96	8,55	13,86	20,03	29,96	26,89
168	8,75	14,16	20,57	31,33	28,40



Obrázok 21: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami FA a jednou ochrannou vrstvou v priebehu 7 dní

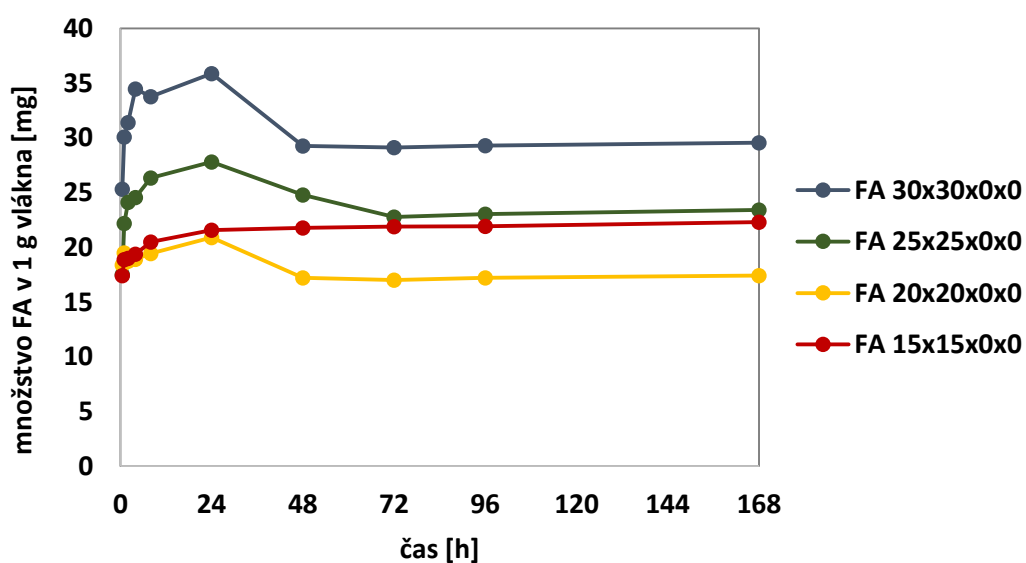


Obrázok 22: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami FA a jednou ochrannou vrstvou v priebehu prvých 4 hodín

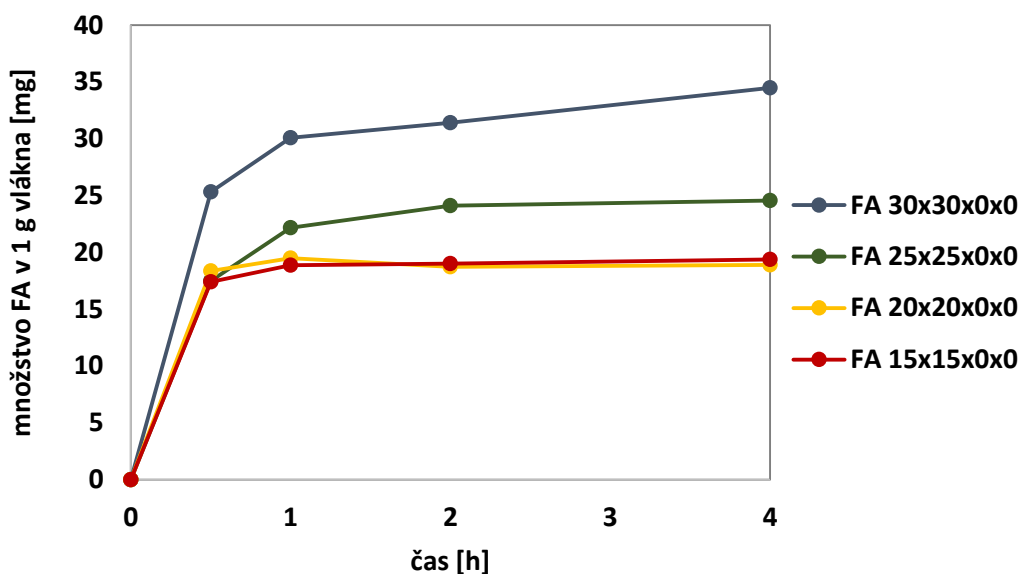
## 8.5 Disolúcia vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej a dvoma ochrannými vrstvami

Tabuľka 9: Výsledky merania disolúcie FA pri nanosení dvoch vrstiev FA a dvoch ochranných vrstiev

čas [h]	množstvo FA v 1 grame vlákna [mg]			
	1,5% FA	2% FA	2,5% FA	3% FA
0,5	17,40	18,37	17,50	25,32
1	18,87	19,50	22,18	30,09
2	19,00	18,73	24,11	31,40
4	19,37	18,90	24,55	34,48
8	20,48	19,44	26,34	33,78
24	21,56	20,88	27,80	35,88
48	21,77	17,20	24,80	29,27
72	21,88	17,00	22,76	29,11
96	21,92	17,20	23,03	29,29
168	22,31	17,40	23,41	29,55

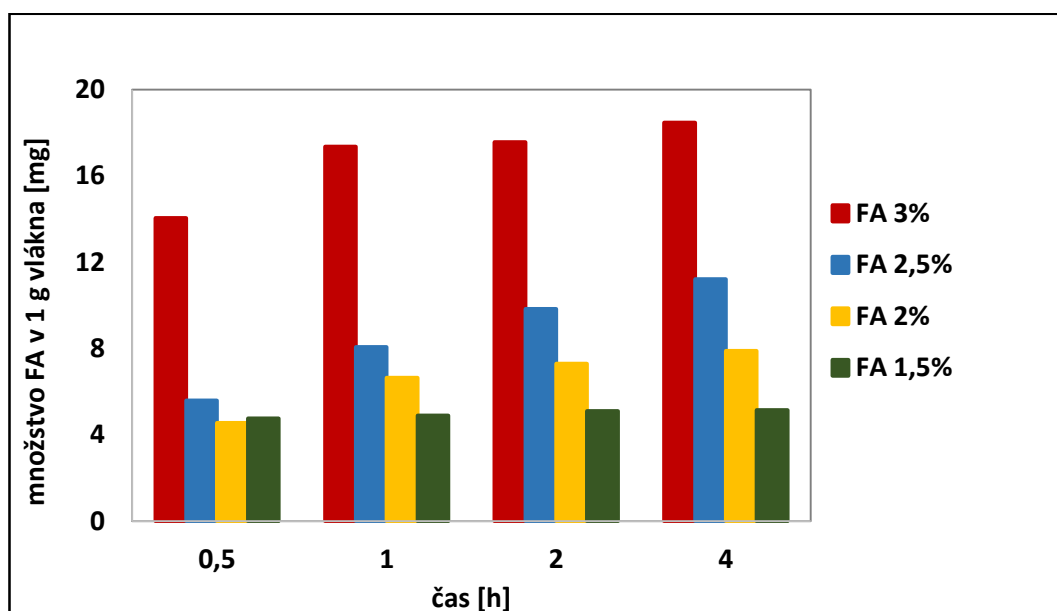


Obrázok 23: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami FA a dvomi ochrannými vrstvami v priebehu 7 dní

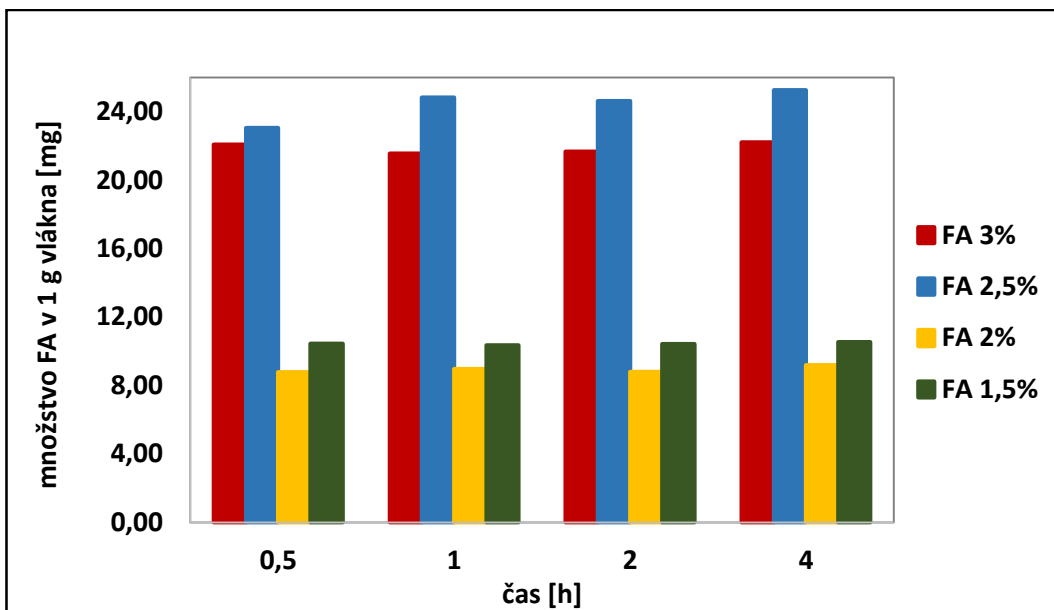


Obrázok 24: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami FA a dvoma ochrannými vrstvami v priebehu prvých 4 hodín

### 8.6 Porovnanie reprodukovateľnosti disolúcie vlákien povrstvených jednou vrstvou kyseliny listovej

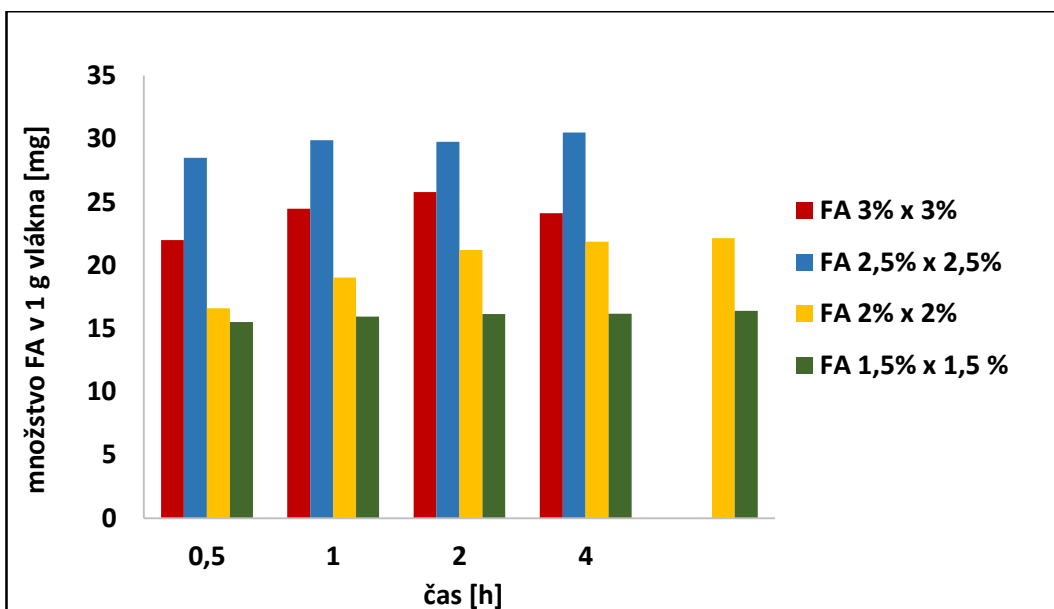


Obrázok 25: Obsah FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien povrstvených jednou vrstvou FA v priebehu prvých 4 hodín



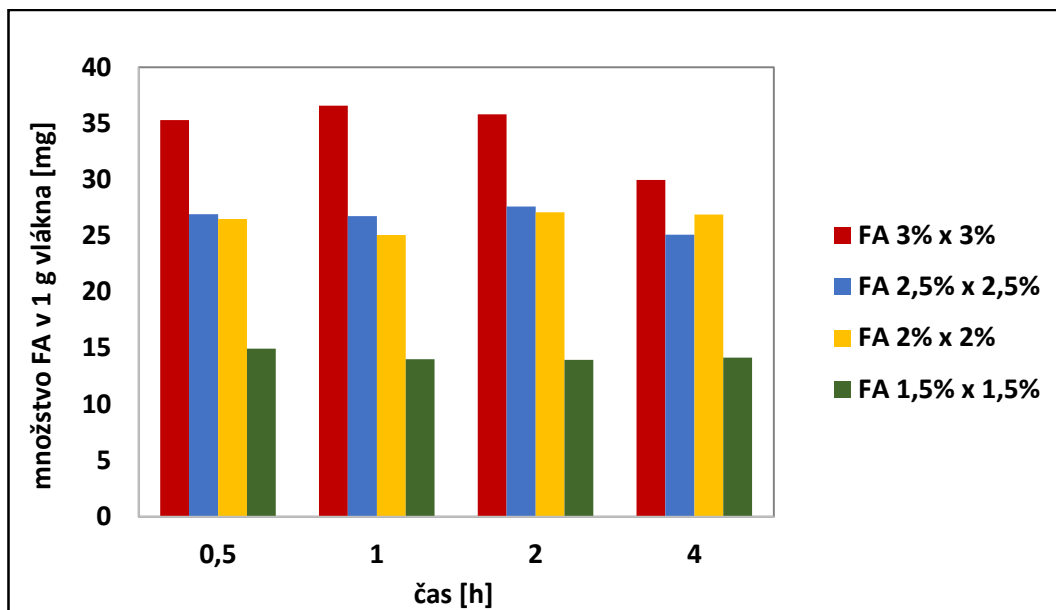
Obrázok 26: Reprodukovanosť obsahu FA uvolnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien povrstvených jednou vrstvou FA v priebehu prvých 4 hodín

### 8.7 Porovnanie reprodukovanosti disolúcie vlákien povrstvených dvoma vrstvami kyseliny listovej



Obrázok 27: Obsah FA uvolnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami FA v priebehu prvých 4 hodín





Obrázok 28: Reprodukateľnosť obsahu FA uvoľnenej pri disolúcii z 1 gramu rôzne odstupňovaných vlákien s dvoma vrstvami FA v priebehu prvých 4 hodín

## 9 Diskusia

### 9.1 Príprava disperzie

Mikrovlákna na báze kyseliny hyaluronovej majú podobu nekonečných elementárnych vlákien. Tie môžu byť pripravené z rôznych biologicky odbúrateľných derivátov hyaluronanu, ktoré sa líšia v rýchlosti rozpustnosti vo vode, doby resorpcie v tele a ďalších fyzikálnych a biologických vlastnostiach. Mikrovlákna môžu byť môžu byť tkané do formy textilných pletenín, kombinované s nanovláknami alebo použité ako nosiče pre postupné uvoľňovanie liečiv. (Contipro a.s., 2017)

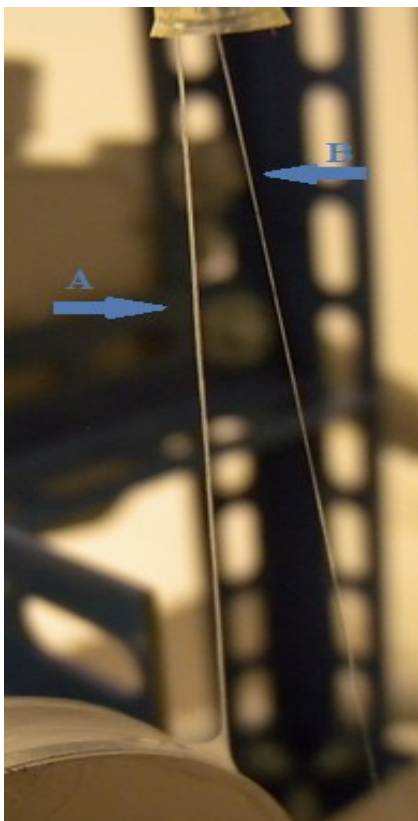
Cieľom tejto rigorózneho práce bola príprava vlákenných nosičov na báze hyaluronanu. Vlákna boli pripravené technológiou povrstvovania „dip-coating“ a poťahované vrstvou derivátu kyseliny hyaluronovej s modifikovanou rozpustnosťou (hydrofóbná úprava s predpokladaným znížením rozpustnosti). Do poťahovanej vrstvy bola inkorporovaná aktívna látka za účelom cieleného ovplyvnenia jej uvoľňovania. Ako modelová aktívna látka bola vybraná kyselina listová pre jej vysokú termickú stabilitu (teplota topenia  $>285^{\circ}\text{C}$ ) a oranžovú farbu prášku, čo zjednodušilo hodnotenie optickej homogenity vlákien. Jej uvoľňovanie bolo sledované v stanovených časových intervaloch v priebehu 7 dní. Poťahovaná zmes bola hodnotená z pohľadu vhodných reologických vlastností.

### 9.2 Príprava záterovej disperzie

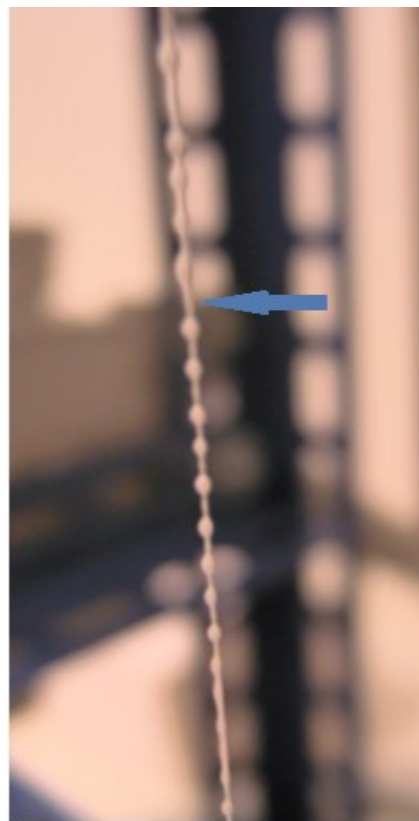
Keďže použitá metóda "dip-coating" neumožňuje regulovať hrúbku vrstvy na vlákne, rovnomernosť nanášania na vlákno závisí od reologických vlastností nanášanej poťahovej disperzie. Kľúčovým faktorom pri povrstvovaní vlákna HA je viskozita disperzií a ich afinita k povrchu vlákna.

Pre zvýšenie afinity disperzie k vláknu bol použitý 0,1% roztok lecitínu v 80% propylenglykole. Roztok bol na vlákno nanášaný technológiou dip-coating, teda rovnakým spôsobom ako povrstvovacie disperzie. Účelom bolo zmeniť polaritu vlákna a zvýšiť afinitu disperzie tvorenej hydrofobizovaným derivátom HA k vláknu vyrobeného z natívneho hyaluronanu.

Pri nízkej viskozite disperzie dochádza vplyvom Plateau-Rayleighovej nestability k vytváraniu kvapiek na povrchu vlákna vedeného z navíjacieho valca (obr. č 30). (Grubelnik & Marhl, 2005)



Obrázok 29  
A – vlákno s disperziou,  
B – nepovrstvené vlákno



Obrázok 30  
Tvorba kvapôčiek na vlákne  
vplyvom Plateau-Rayleighovej  
nestability

Tieto kvapky môžu spôsobiť nerovnomernú distribúciu nanášanej disperzie na vlákne. To by mohlo neskôr viesť k výkyvom v množstve inkorporovanej aktívnej látky, pretože množstvo aktívnej látky na vlákne je ovplyvňované najmä koncentráciou kyseliny listovej v disperzii.

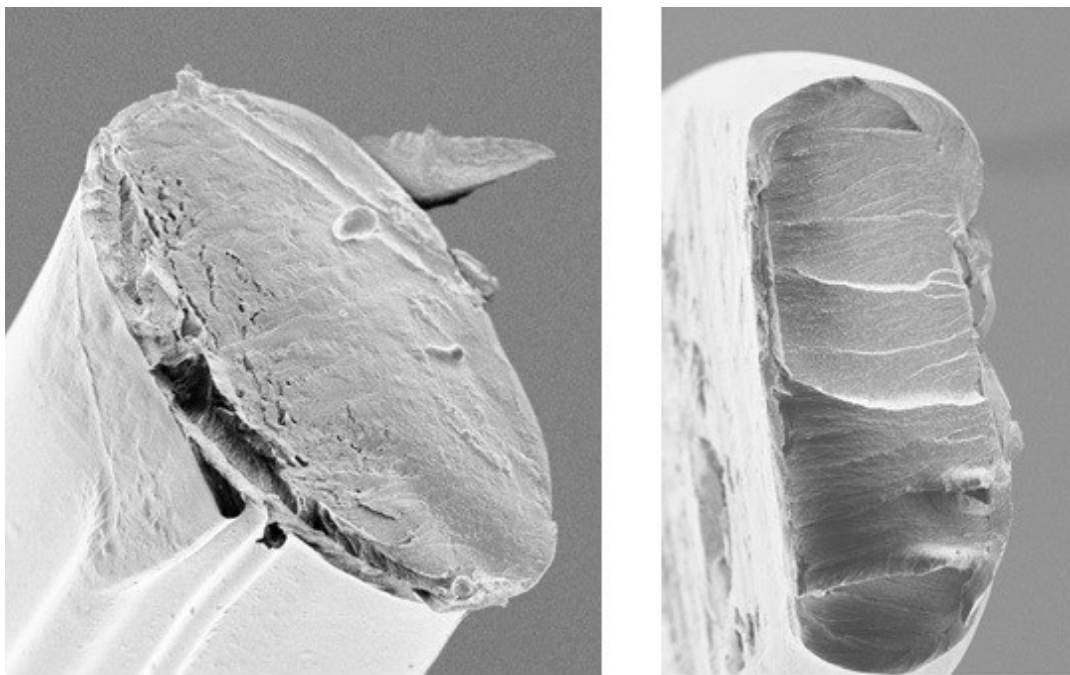
Preto bolo nutné v rámci predbežných skúšok vybrať zloženie poťahovacej disperzie a hodnotiť jej viskozitu. Disperzie hydrofobizovaného derivátu s obsahom kyseliny listovej 1%, 1,5%; 2%,2,5%; a 3% boli hodnotené pomocou rotačného reometru v rozpätí šmykovej rýchlosti od 0,01 do 5000 1/s. Výsledky meraní sú zhrnuté na obrázku 12.

Z obr. 12 je zřejmé, že okrem zloženia záterovej disperzie bola jej viskozita ovplyvnená tiež koncentráciou pridanej FA. Najvyššiu viskozitu mala 1% disperzia a so zvyšujúcou sa koncentráciou FA sa viskozita znižovala. Výnimkou boli 1,5% a 2% disperzie, ktoré mali viskozitu takmer identickú. Takýto výrazný vplyv FA na viskozitu bol spôsobený jej kladným nábojom, kedy pri nízkych koncentráciách FA dochádzalo k sieťovaniu záporne nabitého derivátu HA.

Z tohto dôvodu bola použitá 3% disperzia hydrofobizovaného derivátu HA o MW 83 kDa, ktorá pri pomalom vrstvení rýchlosťou  $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  nevytvárala na povrchu vlákna kvapôčky. Do tejto 3% disperzie bola pridaná kyselina listová v rôznych koncentráciách, pričom viskozita náterovej zmesi sa po pridaní FA zvýšila, čo ešte viac eliminovalo tvorbu kvapiek a zvyšovalo homogenitu vrstvy nanesej na vlákno.

### **9.3 Príprava vlákien**

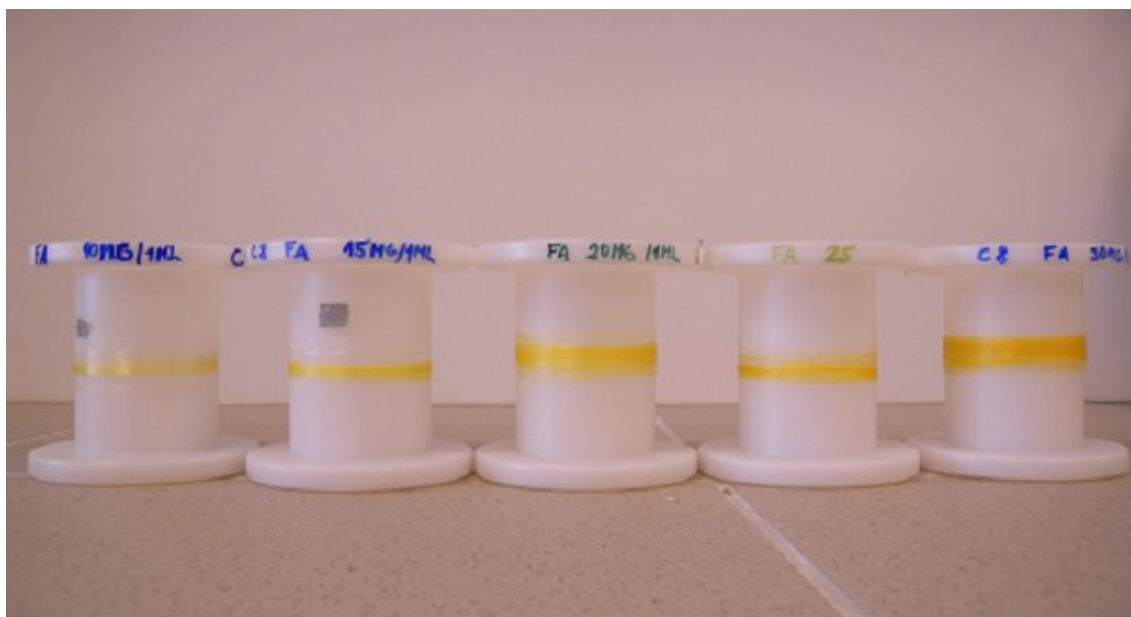
Príprava vlákien spočívala v nanášaní kyseliny listovej vo forme disperzie hydrofobizovaného derivátu HA na povrch už hotových vlákien z natívneho hyaluronanu. Na obrázku č. 31 je pod elektrónovým mikroskopom zobrazené päťkrát povrstvené vlákno na ktorom možno pozorovať jemnú vrstvu disperzie o hrúbke  $6 \mu\text{m}$ . Samotné vlákno má priemer približne  $100 \mu\text{m}$ . Nerovnomernosť a sploštený tvar vlákna je dôsledkom výrobného procesu pri formovaní vlákien. V zrážacej lázni nedochádza k úplnému stuhnutiu vlákna a pri navíjaní na zberný valec sa vlákno sploští.



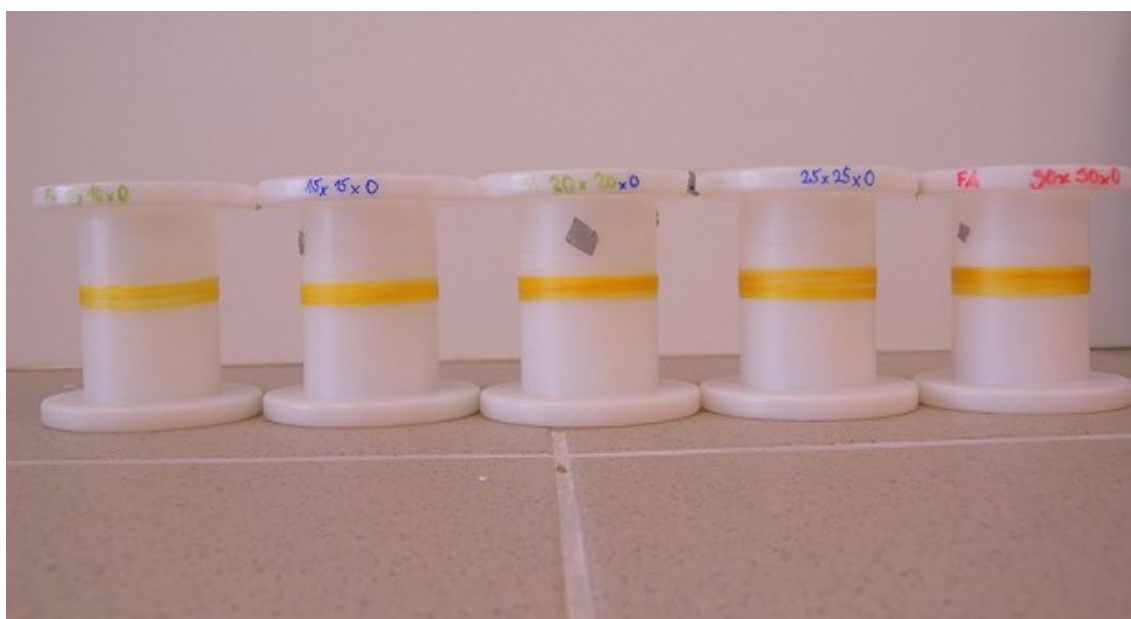
*Obrázok 31: Prierez povrstveným vláknom hualuronanu*

Pre štúdium uvoľňovania FA z mikrovlákien pripravených metódou dip-coating boli pripravené vlákna s rôznymi koncentraciami FA v povrchovej disperzii a rôznym počtom poťahovacích vrstiev.

Najskôr boli pripravené vlákna s jednou a dvomi vrstvami poťahovej disperzie. Vlákna sú zobrazené na obrázku č. 32 a 33. Ako je možno vidieť, vlákna s dvomi vrstvami majú vizuálne sýtejšiu farbu a preto mali obsahovať vyššie množstvo aktívnej látky.



Obrázok 32: Pripravené vlákna povrstvené jednou vrstvou aktívnej látky v rôznych koncentráciách



Obrázok 33: Pripravené vlákna povrstvené dvomi vrstvami aktívnej látky v rôznych koncentráciách

Vzhľadom na priebeh disolúcie, ako bude diskutované ďalej, kedy sa do roztoku v priebehu prvých 30 minút uvoľnilo prakticky celé množstvo aktívnej látky, boli neskôr pripravené vlákna, ktoré okrem vrstvy s liečivom boli potiahnuté ešte jednou alebo dvomi ochrannými vrstvami. Ochranné vrstvy boli tvorené čistou disperziou hydrofobizovaného hyaluronanu bez obsahu aktívnej látky. Dôvodom pre prípravu

takýchto vlákien bol predpoklad, že hydrofóbná vrstva hyaluronanu spomalí uvoľňovanie aktívnej látky z povrchu vlákna a umožní tak prípravu vlákien s postupným uvoľňovaním.

#### **9.4 Disolúcia**

Bolo testované uvoľňovanie kyseliny listovej z povrchu vlákna z natívneho hyaluronanu, ktoré bolo povrstvené hydrofobizovaným derivátom hyaluronanu o molekulovej hmotnosti 83 kDa. K samotnej disolúcii bola použitá navážka od 50 mg do 20 mg povrstveného vlákna. Hmotnosť vlákna u prvých pokusov bola 50 mg, pretože bolo náročné odhadnúť ako rýchlo sa bude kyselina listová z vlákna uvoľňovať a bolo potrebné dosiahnuť aspoň limitnú koncentráciu FA v roztoku pri prvom odbere. Po prvých výsledkoch bola navážka postupne znižovaná, pretože väčšina FA vo vlákne sa uvoľnila v priebehu prvej pol hodiny.

Disolúcia vlákien trvala 7 dní, t.j. 168 hodín a prebiehala pri teplote  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Vzorky boli odoberané v časových intervaloch 0,5; 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 hodín. Napriek prvým výsledkom, kedy sa FA uvoľnila veľmi rýchlo, tieto časové intervaly neboli zmenené, pretože sa predpokladalo, že použitím viacerých vrstiev sa liberácia aktívnej látky spomalí. Odoberaný bol objem 1 ml a nebol dopĺňaný čistým médiom, čo bolo zohľadnené pri výpočte množstva uvoľnenej kyseliny.

Z prvých experimentov bolo zrejmé, že napriek použitiu hydrofóbného derivátu HA, jedna vrstva aktívnej látky je príliš tenká a preto dochádza k veľmi rýchlemu uvoľneniu FA. Ako je ilustrované na obrázkoch č. 13 -24, koncentrácia aktívnej látky sa po štyroch hodinách už ďalej nezvyšovala bez ohľadu na počet povrstvovacích vrstiev.

K zmene rýchlosti uvoľňovania nedošlo ani pri použití ochranných vrstiev hydrofóbného hyaluronanu (obr. č 20 – 24), pričom základným predpokladom bolo, že ďalšia hydrofóbná vrstva na povrchu vlákna spomalí uvoľňovanie aktívnej látky. Pravdepodobným vysvetlením tohto faktu je, že samotná vrstva disperzie nanesej

na vlákna je príliš tenká (obrázok č. 31) a neposkytuje dostatočnú bariéru na to, aby sa aktívna látka uvoľňovala z vlákna postupne.

## 9.5 Obsah kyseliny listovej vo vlákne

Množstvo aktívnej látky vo vlákne bolo sledované kvôli posúdeniu rovnomernosti nanášania disperzie na vlákno. Pre technologické obmedzenia pri povrstvovaní vlákien nebolo možné kontrolovať hrúbku nanášanvej vrstvy, preto množstvo kyseliny listovej na vlákne záviselo prevažne na afinite konkrétnej disperzie k povrchu vlákien. Z tohto dôvodu boli pre jednu a dve vrstvy aktívnej látky pripravené dve sady vlákien, aby bolo možné testovať reprodukovateľnosť procesu prípravy a množstva kyseliny listovej vo vláknach.

Obrázky č. 25 a 26 porovnávajú disolúciu vlákna s jednou vrstvou aktívnej látky v koncentrácii 1,5% - 3%. Ako je možno pozorovať, v prvom prípade bolo najvyššie množstvo FA vo vlákne FA 3% (18 mg) a so znižujúcou koncentráciou na vláknach sa množstvo FA znižovalo. V druhom prípade bolo najvyššie množstvo FA namerané na vlákne FA 2,5% (25 mg) a na vlákne FA 3% bol napriek koncentrovanejšej disperzii menší obsah aktívnej látky (22 mg). Porovnaním jednotlivých vlákien s rovnakou koncentráciou medzi oboma šaržami zistíme, že druhá šarža obsahuje v každom prípade vyššie množstvo aktívnej látky. Zarážajúci je však najmä rozdiel v celkovom obsahu aktívnej látky vo vzorke FA 2,5%, keď v prvá šarža obsahovala 11 mg a druhá až 25 mg.

Obrázky č. 27 a 28 znázorňujú množstvo kyseliny listovej vo vláknach povrstvených dvomi vrstvami disperzie. Aj v tomto prípade sa opakovala situácia, keď jedna šarža vzorky FA 2,5% (30 mg) obsahovala vyššie množstvo aktívnej látky ako vzorka FA 3% (24 mg). Rozdiely medzi jednotlivými vzorkami oboch šarží však nie sú až také výrazné ako u šarží s jednou vrstvou. Celkové množstvo kyseliny listovej je u vzoriek s dvomi vrstvami vyššie ako u vzoriek s jednou vrstvou, avšak tento rozdiel nemá lineárny charakter. Zvýšenie množstva aktívnej látky u vlákien s dvomi vrstvami je oproti vláknam s jednou vrstvou približne 50% v závislosti na šarži.



Nerovnomernosť množstva kyseliny listovej je spôsobená rozdielnym nanášaním jednotlivých disperzií na vlákno a neschopnosťou kontrolovať hrúbku vrstvy pri nanášaní povrchovej disperzie. Z prezentovaných výsledkov je tiež zrejmé, že reprodukovateľnosť prípravy vlákien potiahnutých povrchovou disperziou metódou dip-coating je nízka. Zvýšenie reprodukovateľnosti by bolo možné dosiahnuť úpravou technológie použitej pri príprave vlákien, najmä s možnosťou kontrolovať hrúbku nanášanej vrstvy. K dosiahnutiu kontrolovaného uvoľňovania aktívnej látky bude ale nutné vyvinúť nové riešenia, ktoré by výrazne spomalili uvoľňovanie látok z povrchu vlákien, prípadne inkorporovať aktívne látku priamo do samotného vlákna.

## 10 Závěry

Výsledky tejto experimentálnej práce dovoľujú sformulovať nasledujúce závery:

- K príprave mikrovlákien potiahnutých jednou alebo viacerými vrstvami záterovej disperzie s obsahom liečiva je metóda dip-coating vo všeobecnosti vhodná
- Vyššia viskozita záterovej disperzie je zásadná pre elimináciu tvorby kvapaviek a homogenitu disperzie na povrchu vlákna. Afinitu hydrofobizovanej náterovej zmesi na hydrofilné vlákno natívneho hyaluronanu je možné zvýšiť využitím tenzidových vlastností lecitínu.
- Napriek použitiu hydrofóbneho derivátu HA ako základnej zložky obaľovacieho náteru sú jedna alebo dve vrstvy s obsahom aktívnej látky príliš tenké na to, aby došlo k spomaleniu uvoľnenia liečiva (kyselina listová) z povrchu vlákna. 40 - 80% z celkového množstva kyseliny listovej sa uvoľnilo v priebehu 30 minút
- Bez ohľadu na koncentráciu kyseliny listovej vo vlákne a na počet náterových vrstiev, minimálne 90% účinnej látky sa uvoľnilo do 24 hodín
- Povrstvenie vlákna jednou alebo dvoma vrstvami hydrofóbneho poťahu na vrstve s liečivom liberáciu liečiva neovplyvnilo
- Reprodukovateľnosť prípravy vlákien potiahnutím povrchovou disperziou metódou dip-coating je nízka

## 11 Referencie

- Adam, R., & Hargreaves, G. (2001). Percutaneous cryosurgery of irresectable liver tumors. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*, s. 1-8. Cit. 10 2016
- Adam, R., & Hargreaves, G. (2001). Percutaneous cryosurgery of irresectable liver tumors. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*, s. 1-8. Cit. 10 2016
- Adamson, W., & Gast, A. (1997). The Solid - Gas Interface. General Considerations. In W. Adamson, & A. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces* (6. vyd., s. 571-594). Wiley Canada. Cit. 01. 04 2016
- Allergan, Inc. (2015). *About Ozurdex for macular edema following RVO*. Cit. 11 2016. Dostupné na Internetu: Ozurdex: <http://www.ozurdex.com/RVO/Ozurdex-for-RVO>
- Asenjo-Lobos, C., & Jofre, J. (2015). Use of Antibiotics in Dental Implant Surgery: A Decision Based on Evidence from Systematic Review. *The International Journal of Odontostomatology*, 09(01), s. 137-147. Cit. 12 2016
- AstraZeneca Pharmaceuticals. (2011). *FDA Safety: Zoladex (goserelin acetate) implant*. Dostupné na Internetu: Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/ucm240980.htm>
- Attia, S., Wang, J., & Wu, G. (2002). Review on Sol-Gel Derived Coatings: Process, Techniques and Optical Applications. *Journal of Materials Science and Technology*, 18(3), s. 211-218.
- Azarmi, S., Roa, W., & Lobenbe, R. (2007). Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 328(1), s. 12-21. Cit. 09 2016
- Azimi, B., & Nourpanah, P. (2014). Poly (lactide -co- glycolide) Fiber: An Overview. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 9(1), s. 47-54.
- Berkenbusch, M., Cohen, I., & Zhang, W. (2008). Liquid interfaces in viscous straining flows: numerical studies of the selective withdrawal transition. *Journal of Fluid Mechanics*, 613, s. 171-203. Cit. 11 2016
- Betak, J., Buffa, R., & Nemcova, M. (2015). *Patent č. WO2014082610 A1*. Cit. 17. Apr 2016. Dostupné na Internetu: <http://www.patentsencyclopedia.com/app/20150299911>
- Blades, H. (1973). *USA Patent č. US3767756 A*. Cit. 05 2016. Dostupné na Internetu: <https://www.google.com/patents/US3767756>

- Boeriu, C. G., Springer, J., & Kooy, F. K. (2013). Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, s. 3-8.
- Bonaccorso, E., & Pericet-Camara, R. (2016). Microdrops Evaporating from Deformable or Soluble Polymer Surfaces. In M. Ferrari, & L. Liggieri, *Drops and Bubbles in Contact with Solid Surfaces* (s. 105-128). CRC Press. Cit. 10 2016
- Brinker, C., & Scherer, G. (1990). *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Elsevier Inc.
- Burgert, L., Hrdina, R., Masek, D., & Velebný, V. (2012). Patent č. WO2012089179 A1. Cit. 11. 04 2016. Dostupné na Internetu: <http://www.google.com/patents/WO2012089179A1?cl=en>
- Cawley, S., Mullaney, L., McKeating, A., & Farren, M. (2015). A review of European guidelines on periconceptional folic acid supplementation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70(6), s. 143-154. Cit. 18. 06 2016
- Coffey-Vega, K., & Gentili, A. (2015). *Folic Acid Deficiency : Back ground, Pathophysiology , Epidemiology*. Cit. 10. 09 2016. Dostupné na Internetu: Medscape - Drugs and Diseases: [emedicine.medscape.com/article/200184-overview](http://emedicine.medscape.com/article/200184-overview)
- Contipro a.s. (2017). *Formy a speciality hyaluronanu*. Cit. 02 2018. Dostupné na Internetu: [www.contipro.cz](http://www.contipro.cz): <https://www.contipro.cz/portfolio/formy-a-speciality-hyaluronanu>
- Contipro Group. (2011). Cit. 30. 03 2016. Dostupné na Internetu: Hyaluronan Forms: <http://www.contipro.com/research/hyaluronan-forms>
- Cowie, J. (1991). Polymer Characterization - Chain Dimensions and Structures. In *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials* (2nd Edition. vyd., s. 215-228). CRC Press. Cit. 10 2016
- Crider, C., Cordero, A., Ping Qi, Y., & Mulinare, J. (2013). Prenatal folic acid and risk of asthma in children: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(5), s. 1272-1287. Cit. 18. 06 2016
- Český lékopis 2009 - Doplnok 2013. (2013). 341-419. Praha: Grada Publishing a.s. Cit. 10 2016
- Český lékopis. (2017). In *Zkouška disoluce pevných lékových forem* (s. 354-361). Praha: Grada Publishing. Cit. 2018
- Danov, K., Kralchevsky, P., & Ananthapadmanabhan, K. (2014). Micelle–monomer equilibria in solutions of ionic surfactants and in ionic–nonionic mixtures: A generalized phase separation model. *Advances in Colloid and Interface Science*, 206, s. 17-45. Cit. 12 2016

- Dash, A., & Cudworth, G. (1998). Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 40(01), s. 1-12. Cit. 10 2016
- DeAngelis, P. L. (2008). Monodisperse hyaluronan polymers: synthesis and potential applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(4), s. 246-248.
- Declèves, A.-E., Caron, N., Voisin, V., Legrand, A., Bouby, N., & Kultti, A. (2012). Synthesis and fragmentation of hyaluronan in renal ischaemia. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 10(27), s. 3771-3781. Cit. 12 2016
- Denninger, P., & Reiser, O. (2008). *Hyaluronic Acid – The Secret of Young Skin*. Cit. 30. 03 2016. Dostupné na Internetu: [www.chemie-im-alltag.de](http://www.chemie-im-alltag.de): <http://www.chemie-im-alltag.de/english/articles/0128/index2.html>
- De-Regil, L. M., Fernández-Gaxiola, A. C., & Dowswell, T. (2010). Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, s. 2-28. Cit. 18. 06 2016
- Domard, A., David, L., & Dupasquier, F. (2009). Patent č. WO2009050389 A2. Dostupné na Internetu: <http://www.google.com/patents/WO2009050389A2?cl=en>
- Dowell, J., & Sancho, A. (2000). Noninvasive measurements for studying the tumoral pharmacokinetics of platinum anticancer drugs in solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, s. 111-126. Cit. 10 2016
- Duda, J. (1985). Molecular diffusion in polymeric systems. *Pure and Applied Chemistry*, 11(57), s. 1681-1690. Cit. 10 2016
- Duncan, R., Gac-Breton, S., Keane, R., & Musila, R. (2001). Polymer–drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. *Journal of Controlled Release*, 74(1), s. 135-146. Cit. 09. 05 2016
- Duncan, R., Vicent, M., Greco, F., & Nicholson, R. (2005). Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12, s. 189-199. Cit. 10. 05 2016
- Dvořáčková, K., Rabišková, M., & Bautzová, T. (2011). Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chemické listy*(105), s. 50 - 54. Cit. 09 2016
- Dyas, A., & Shah, U. (2007). Dissolution and dissolution testing. In J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (3. vyd., Zv. 2, s. 908-926). Informa Healthcare USA, Inc. Cit. 09 2016
- Edlund, U., & Albertsson, A. (2002). Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. In A. Albertsson, *Degradable Aliphatic Polyesters* (s. 64-112). Springer Berlin Heidelberg. Cit. 10 2016

- Edwards, P. C., & Fantasia, J. E. (2007). Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. *Clinical Interventions in Aging*, 2(4), s. 509-511.
- FDA. (2014). *OZURDEX® (dexamethasone intravitreal implant), Initial U.S. Approval*. Allergan, Inc. Food and Drug Administration. Cit. 11 2016
- FDA. (24. 06 2015). *Implants and Prosthetics*. Cit. 10 2016. Dostupné na Internetu: US Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/ImplantsandProsthetics/>
- FDA. (07 2015). *Soft Tissue Fillers Approved by the Center for Devices and Radiological Health*. Cit. 03 2016. Dostupné na Internetu: US Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/CosmeticDevices/WrinkleFillers/ucm227749.htm>
- Fraser, J., Laurent, T., & Lurent, U. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1(242), s. 27-33.
- Gajjar, C., & King, M. (2014). *Resorbable Fiber-forming Polymers for Biotextile Applications*. Springer.
- Gajjar, C., & King, M. (2014). *Resorbable Fiber-Forming Polymers for Biotextile Applications*. Springer International Publishing. Cit. 10 2016
- Gedde, U. (2013). *Polymer Physics*. Springer Science & Business Media. Cit. 10 2016
- George, G., S.A.Kanavade, Barsode, U., & Mhaske, B. (2006). *Applied Science - I* (Second Edition. vyd., Zv. 9). Technical Publications Pune. Cit. 10 2016
- Göpferich, A. (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 2(17), s. 103-114. Cit. 03 2017
- Grubelnik, V., & Marhl, M. (2005). Drop formation in a falling stream of liquid. *American Journal of Physics*, 73(5), s. 415 - 419. Cit. 2018
- Guerin, C., & Olivi, A. (2004). Recent advances in brain tumor therapy: local intracerebral drug delivery by polymers. *Investigational New Drugs*, 22(1), s. 27-37.
- Guilford Pharmaceuticals Inc. (2001). *Clinical Review: Gliadel Wafer (Polifeprosan 20 with Carmustine Implant)*. Dostupné na Internetu: Food and Drug Administration: [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3815b2\\_05\\_FDA.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3815b2_05_FDA.pdf)
- Gupta, A. (2010). *Polymer Chemistry*. Pragati Prakashan.

- Haghjou, N., & Soheilian, M. (2011). Sustained Release Intraocular Drug Delivery Devices for Treatment of Uveitis. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, 6(4), s. 317–329. Cit. 11 2016
- Hillery, A., & Lloyd, A. (2003). *Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. CRC Press. Cit. 10 2016
- Hines-Peralta, A., & Liu, Z. (2006). Chemical Tumor Ablation with Use of a Novel Multiple-tine Infusion System in a Canine Sarcoma Model. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*(17), s. 351-358. Cit. 10 2016
- Holban, A., & Grumezescu, A. (2016). *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*. William Andrew. Cit. 12 2016
- Hollinger, J. (2005). *An Introduction to Biomaterials*. CRC Press. Cit. 12 2016
- Holowka, E. (2014). Controlled-Release Systems. In E. Holowka, & S. Bhatia, *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective* (s. 7-62). Springer-Verlag New York. doi:10.1007/978-1-4939-1998-7
- Hrdina, R. (2013). Aby se nám rány hojili lépe. *Scientific American - České vydání*(červenec - srpen), s. 29. Cit. 12 2016. Dostupné na Internetu: [http://www.sciam.cz/files/CHEMIE\\_internet.pdf](http://www.sciam.cz/files/CHEMIE_internet.pdf)
- Chengbin, J., Xiujian, Z., & Haizheng, T. (2006). An approach to predict the solid film thickness possibly yielded from an alumina sol-gel liquid film. *Surface & Coatings Technology*(201), s. 2655-2661.
- Chien, L. J., & Lee, C. K. (2007). Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress*, 23(5).
- Chien, L. J., & Lee, C. K. (2007). Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), s. 339–346.
- Chu, K., & Dupuy, D. (2014). Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. *Nature reviews cancer*, 14(2), s. 199-208. Cit. 10 2016
- Chung, Y., Kang, I., Kwon, W., Shin, S., & Lee, G. (2007). Preparation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) composite fibers by wet spinning and their characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 106(5), s. 3423–3429. doi:10.1002/app.26557
- Israelachvili, J. (2011). *Intermolecular and Surface Forces* (Third Edition. vyd.). Academic Press. Cit. 10 2016
- Jail, M., & Kulkarni, A. (2009). *Applied Science - I* (Zv. 3). Technical Publications Pune. Cit. 10 2009

- James, S., & Zhang, M. (2010). *USA Patent č. US 7692000 B2*. Cit. 12 2016
- Jones, D. (2004). *Pharmaceutical applications of polymers for drug delivery* (Zv. 15, no. 6). Shawbury, U.K.: Smithers Rapra Press.
- Kadri, B. (2001). *Mechanism of drug release from matrix tablets involving moving boundaries, Thesis*. University of Toronto, Graduate Department of Pharmaceutical Sciences. National Library of Canada. Cit. 08. 05 2016
- Karageozian, H., & Park, J. (14. Apr 2014). *USA Patent č. US 20140343013 A1*. Cit. 11. 04 2016. Dostupné na Internetu: <http://www.google.ch/patents/US20140343013?hl=de>
- Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29(1), s. 17-25. doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- Kotra, S., Venkateswarulu, T., & Babu, J. (2013). Cost Effective Media Optimization for the Enhanced Production of Hyaluronic Acid Using a Mutant Strain *Streptococcus zooepidemicus* 3523–7: A Statistical Approach. *International Journal of Advanced Science and Technology*, 60, s. 83-96.
- Kovács, L. (02 2008). Prevencia vrodených vývojových chýb. *Pediatrica Pre Prax*, s. 63. Cit. 18. 06 2016
- Krochta, J., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Dependence of Coating Thickness on Viscosity of Coating Solution Applied to Fruits and Vegetables by Dipping Method. *Journal of Food Science*, 2(68), s. 4055-4068. Cit. 24. 04 2016
- Lambert, B., Tang, F., & Rogers, W. (2001). *Polymers in Medical Applications*. iSmithers Rapra Publishing.
- Lee, P., & Good, W. (1987). *Controlled-Release Technology Pharmaceutical Applications (ACS Symposium Series)* (Zv. 348). Washington D.C.: American Chemical Society.
- Lee, S., & Hughes, P. (2010). Biodegradable Implants for Sustained Drug Release in the Eye. *Pharmaceutical Research*, 10(27), s. 2043-2053. Cit. 11 2016
- Leja, K., & Lewandowicz, G. (2010). Polymer Biodegradation and Biodegradable. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(2), s. 255-266. Cit. 10 2016
- Liu, L., Liu, Y., & Li, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10(99), s. 2-10.
- Lyu, S., & Untereker, D. (2009). Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(09), s. 4033-4065. Cit. 10 2016



- Maleki, M., Latifi, M., Amani-Tehran, M., & Mathur, S. (2014). Drug release profile in core-shell nanofibrous structures: A study on Peppas equation and artificial neural network modeling. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 113(1), s. 92-100. Cit. 08. 05 2016
- Manjkow, J., Papanu, J., & Hess, D. (1987). Influence of Processing and Molecular Parameters on the Dissolution Rate of Poly-(Methyl Methacrylate) Thin Films. *Journal of The Electrochemical Society*, 134(8), s. 2003-2007. Cit. 10 2016
- Mao, Z., & Chen, R. R. (2007). Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. 23(5), s. 1038-1042.
- Margareth, R., Loebenberg, M., & Almukainzi, M. (08 2011). Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution technologies*, s. 15-28.
- Markus, G., & McClintock, D. (1967). Tryptic Hydrolysis of Human Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 242(19), s. 4395-4401. Cit. 10 2016
- Masakazu, S., & Ikada, Y. (2004). Biodegradable Polymers in Medicine. In R. Reis, & J. San Román, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (s. 3-10). CRC Press.
- Merrick, G., & Wallner, K. (2003). Permanent Interstitial Brachytherapy for the Management of Carcinoma of the Prostate Gland. *The Journal of Urology*, 5(169), s. 1643-1652. Cit. 10 2016
- Middleton, J., & Tipton, A. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*(21), s. 2335-2346. Cit. 10 2016
- Miller-Chou, B., & Koenig, J. (2003). A review of polymer dissolution. *Progress in Polymer Science*(28), s. 1224-1267. Cit. 10 2016
- Misra, S., Hascall, V. C., Markwald, R. R., & Ghatak, S. (May 2015). Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 6(201).
- Narasimhan, B., & Mallapragada, S. (1998). Dissolution of amorphous and semicrystalline polymers: mechanisms and novel applications. *Recent Research Developments in Macromolecules Research*(3), s. 311-324.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), s. 397-411.
- Neeraj, A., Alok, M., & Anupam, J. (2013). Polymeric Prodrugs: Recent Achievements and General Strategies. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals*, 15(1), s. 1-13. Cit. 09. 05 2016

- Niu, L., Xu, K., & Mu, F. (2012). Cryosurgery for lung cancer. *Journal of thoracic disease*, s. 408-419. Cit. 10 2016
- Ouano, A. (1982). Dissolution Kinetics of Polymers: Effect of Residual Solvent Content. In B. Raymond, & A. Stahl, *Macromolecular Solutions: Solvent-Property Relationships in Polymers* (s. 208-219). Pergamon Press. Cit. 10 2016
- Perry, J., & Chambers, A. (2007). Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review. *Current Oncology Reports*, 14(5), s. 189-194. Cit. 10 2016
- Petrusic, S., & Koncar, V. (2016). Controlled release of active agents from microcapsules embedded in textile structures. In V. Koncar, *Smart Textiles and Their Applications* (s. 89-110). Woodhead Publishing. Cit. 08. 05 2016
- Pillai, O., & Panchagnula, R. (2001). Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 05(04), s. 447-451. Cit. 10 2016
- Puskas, J. (2013). *Introduction to Polymer Chemistry: A Biobased Approach*. DEStech Publications, Inc. Cit. 10 2016
- Rahaman, M. (2006). *Ceramic Processing*. CRC Press. Cit. 16. 04 2016
- Reis, R., & Tuzlakoglu, K. (2004). Processing and Biomedical Applications of Degradable Polymeric Fibers. In R. Reis, & J. Román, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (s. 163-169). CRC Press.
- Richardson, T., & Lokensgard, E. (2004). Coating Processes. In *Industrial Plastics: Theory and Applications* (4. vyd., s. 287-299). Delmar Learning.
- Rupprecht, A. (1979). Wet spinning of hyaluronic acid. *Acta Chemica Scandinavica*(33), s. 779-780.
- Saldanha, D., & Khiatani, V. (2010). Current Tumor Ablation Technologies: Basic Science and Device Review. *Seminars in Interventional Radiology*, 27(3), s. 247-254. Cit. 10 2016
- Samal, S. K., & Dubrue, P. (2014). *Cationic Polymers in Regenerative Medicine*. Royal Society of Chemistry.
- Scriven, L. (1988). Physics and Applications of Dip-coating and Spin-coating. *Materials Research Society*(121), s. 717-729.
- Shen, A., Gleason, B., McKinley, G., & Stone, H. (2002). Fiber coating with surfactant solutions. *Physics of Fluids*, 14(11), s. 4055-4067. Cit. 16. 04 2016
- Shi, Y., & Li, L. (2005). Current advances in sustained-release systems for parenteral drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2(6), s. 1039-1058. Cit. 10 2016

- Shuwisitkul, D. (2011). *Biodegradable Implants with Different Drug Release Profiles*. Dissertation Thesis, Freie Universität Berlin, Department of Biology, Chemistry and Pharmacy. Cit. 11 2016
- Scheid, B., Delacotte, J., & Dollet, B. (2010). The role of surface rheology in liquid film formation. *Europhysics Letters*, *90*(2), s. 1-6.
- Siegel, R., & Rathbone, M. (2012). Overview of Controlled Release Mechanisms. In J. Siepmann, R. Siegel, & M. Rathbone, *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (s. 19-43). Controlled Release Society. doi:10.1007/978-1-4614-0881-9
- Siewert, M., Dressman, J., Brown, C., & Shah, V. (2003). FIP/AAPS Guidelines for dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *Dissolution Technology*, *10*, s. 10 - 17.
- Silva, G., Fialho, S., Siqueira, R., Jorge, R., & Cunha, A. (2010). Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *46*(03), s. 585-595. Cit. 11 2016
- Sree Lakshmi, C., & Badarinath, A. (2013). An Updated Review of Dissolution Apparatus for Conventional and Novel Dosage Forms. *International Journal of Pharma Research & Review*, *2*(7), s. 42 - 53. Cit. 09 2016
- Stevens, M. (1999). *Polymer Chemistry* (Third Edition. vyd.). Oxford University Press. Cit. 10 2016
- Su, W. (2013). Polymer Size and Polymer Solutions. In *Principles of Polymer Design and Synthesis* (F. Edition, Prekl., s. 9-26). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tacke, J., & Speetzen, R. (2001). Experimental MR Imaging-guided Interstitial Cryotherapy of the Brain. *American Journal of Neuroradiology*(22), s. 431-440. Cit. 10 2016
- Takahashi, Y., & Wada, Y. (1990). Dip-Coating of Sb-Doped SnO<sub>2</sub> Films by Ethanolamine-Alkoxide. *Journal of The Electrochemical Society*, *137*(1), s. 267-272. Cit. 24. 04 2016
- Tan, D., & Chee, S. (2001). Randomized clinical trial of Surodex steroid drug delivery system for cataract surgery: anterior versus posterior placement of two Surodex in the eye. *Ophthalmology*, *106*(2), s. 2172-2181. Cit. 11 2016
- Taylor, D., & May, P. (08 2008). *Folic Acid: A necessary ingredient for building DNA, cells and babies*. Cit. 18. 06 2016. Dostupné na Internetu: University of Bristol, School of Chemistry: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/folic-acid/folicjm.htm>
- Teegarden, D. (2004). *Polymer Chemistry: Introduction to an Indispensable Science*. NSTA Press. Cit. 10 2016

- Theander, K. (2006). *Studies of Surfactant Behaviour and Model Surfaces Relevant to Flotation Deinking*. Stockholm: Royal Institute of Technology. Cit. 11 2016
- Thomas, I. (1994). Optical Coating Fabrication. In L. Klein, *Sol-Gel Optics: Processing and Applications* (s. 141-158). Springer Science, Business Media, LLC.
- Ueberreiter, K. (1968). The Solution Process. In J. Crank, & G. Park, *Diffusion in Polymers* (s. 219-257). Academic Press. Cit. 10 2016
- Valera Pharmaceuticals, Inc. (2006). *Drug Approval Package: Vantas (Histrelin Implant)*. Cit. 10 2016. Dostupné na Internetu: Food and Drug Administration:  
[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/021732s000\\_VantasTOC.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/021732s000_VantasTOC.cfm)
- Vehviläinen, M. (2015). *Wet-spinning of cellulosic fibres from water-based solution prepared from enzyme treated pulp* (Zv. 1312). Tampere: Tampere University of Technology. Cit. 11. 04 2016. Dostupné na Internetu: [https://tutcris.tut.fi/portal/files/3087489/vehvilainen\\_1312.pdf](https://tutcris.tut.fi/portal/files/3087489/vehvilainen_1312.pdf)
- Vehviläinen, M., Kamppuri, T., Grönqvist, S., & Rissanen, M. (2015). Dissolution of enzyme-treated cellulose using freezing–thawing method and the properties of fibres regenerated from the solution. *Cellulose*, 3(22), s. 1653-1674.
- Vester, H., & Wildemann, B. (2010). Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. *Injury: International Journal of the Care of the Injured*, 41, s. 1053–1059. Cit. 12 2016
- Vieira, A., Vieira, J., & Ferra, J. (2011). Mechanical Study of PLA-PCL Fibers during In Vitro Degradation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(3), s. 451-460. Cit. 10 2016
- Weinberg, B., & Blanco, E. (2008). Polymer Implants for Intratumoral Drug Delivery and Cancer Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(05), s. 1681-1702. Cit. 11 2016
- Weinberg, S., & King, W. (2009). Medical Fibers and Biotextiles. In B. Ratner, A. Hoffman, & F. Schoen, *Biomedical Engineering Desk Reference* (s. 172-177). Academic Press.
- WHO. (2015). Dissolution test for solid oral dosage forms. In W. H. Organization, *The International Pharmacopoeia* (5. vyd., Zv. 5, s. 366 - 372). World Health Organization. Cit. 09 2016
- Widner, B., Behr., R., Von Dollen, S., & Tang, M. (2005). Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), s. 3747–3752. doi:10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005

- Wien, T., Pike, E., Wisløff, T., Staff, A., Smeland, S., & Klemp, M. (2012). Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 2(1). Cit. 18. 06 2016
- Wilkes, A. (2001). The Viscose Process. In C. Woodings, *Regenerated Cellulose Fibres* (s. 37-61). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Wise, D. (2000). *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. CRC Press. Cit. 10 2016
- Wolinsky, J., & Colson, Y. (2012). Local Drug Delivery Strategies for Cancer Treatment: Gels, Nanoparticles, Polymeric Films, Rods, and Wafers. *Journal of Controlled Release*, 1(159), s. 14-26. Cit. 11 2016
- Yang, C., & Mao, Z. (2014). *Numerical Simulation of Multiphase Reactors with Continuous Liquid*. Academic Press. Cit. 12 2016
- Yu, H. M., & Stephanopoulos, G. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. (I. M. Society, Ed.) *Metabolic Engineering*(23), s. 24-32.
- Yu-Jin, J., Termsarasab, U., & Dae-Duk, K. (2010). Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 40(Special Issue), s. 33-43.
- ZHU, L. M., & YU, D. G. (2013). Drug delivery systems using biotextiles. In M. W. King, B. Gupta, & R. Guidoin, *Biotextiles as medical implants* (1st Edition. vyd., s. 213-219). Philadelphia: Woodhead Publishing.
- Zilberman, M., & Kraitzer, A. (2008). Paclitaxel-eluting composite fibers: Drug release and tensile mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84A(2), s. 313-323. Cit. 08. 05 2016
- Zorzi, G. K., Seijo, B., & Sanchez, A. (2015). Endogenous Polymers as Biomaterials for Nanoparticulate Gene Therapy. In K. M. Thakur, & V. K. Thakur, *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies: Structure and Chemistry* (Zv. 1). Scrivener Publishing LLC.