

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Markéta Antošová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

CHROMATOGRAFICKÁ CHARAKTERIZACE POLYMERNÍCH
NOSIČŮ LÉČIV

Markéta Antošová

Bakalářská práce

2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

CHROMATOGRAPHIC CHARACTERIZATION OF POLYMERIC
DRUG-DELIVERY SYSTEMS

Markéta Antošová

Bachelor thesis

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Markéta Antošová**
Osobní číslo: **C17059**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Chromatografická charakterizace polymerních nosičů léčiv**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování


1. V dostupné literatuře vyhledejte práce zabývající se analýzou polymerních nosičů léčiv pomocí kapalinové chromatografie. Uveďte stručný přehled používaných polymerních nosičů léčiv.
2. Popište principy kapalinové chromatografie a chromatografické módy používané v analýze polymerů. Shrňte nejvýznamnější publikované práce, zabývající se analýzou polymerních nosičů léčiv pomocí kapalinové chromatografie.
3. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které jsem na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 6. 2020

Markéta Antošová

PODĚKOVÁNÍ

Největší poděkování patří vedoucímu této bakalářské práce panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za profesionální a odborné vedení, cenné rady a připomínky při tvorbě této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na popis polymerních nosičů léčiv a jejich chromatografickou charakterizaci pomocí kapalinové chromatografie. Jsou zde zmíněny vybrané používané polymerní materiály jako nosiče léčiv, popis jejich vlastností i použití. V práci je zmíněno i využití polymerů obecně jako medicínálních materiálů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polymerní nosiče léčiv, kapalinová chromatografie, polymery, medicínální materiály

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on the description of polymeric drug carriers and their chromatographic characterization by liquid chromatography. Selected polymeric materials used as drug carriers are mentioned, including description of their properties and applications. General application at polymers as medicinal materials is mentioned as well.

KEY WORDS

Polymeric drug carriers, liquid chromatography, polymers, medicinal materials

Obsah

Úvod.....	12
1. Polymery a jejich obecné rozdělení.....	13
2. Polymerní materiály v medicíně a farmacii.....	14
2.1. Proces degradace polymerů.....	15
3. Polymerní nosiče léčiv.....	17
3.1 Ideální léčivo.....	18
4. Vodorozpustné polymerní nosiče léčiv.....	19
4.1 Vlastnosti polymerního nosiče léčiv.....	20
4.2 Transport polymerního nosiče do buňky.....	20
4.3 Přírodní polymerní nosiče léčiv.....	22
4.3.1 Alginát.....	22
4.3.2 Chitosan.....	23
4.3.3 Želatina.....	23
4.3.4 Kolagen.....	23
4.3.5 Pektin.....	24
4.3.6 Kyselina hyaluronová.....	24
4.4 Syntetické polymerní nosiče léčiv.....	25
4.4.1 Kyselina polymléčná.....	25
4.4.2 Kyselina polyglykolová.....	26
4.4.3 Polyethylenglykol.....	26
4.4.4 Polyanhydridy.....	27
4.4.5 Polyorthoestery.....	28
5. Ostatní vybrané systémy využívané jako nosiče léčiv.....	29
5.1 Nanočástice.....	29
5.2 Dendrimery.....	30
5.3 Lipozomy.....	31

5.4	Micely	32
5.5	Biopolymery s responzivní aktivitou	33
5.6.1	pH-responzivní biopolymery	34
5.6.2	Termoresponzivní biopolymery	35
5.7	Hydrogely	36
6.	Kapalinová chromatografie	37
6.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High performance liquid chromatography (HPLC)	37
6.1.1	Princip vysokoučinné kapalinové chromatografie	38
6.1.2	Instrumentace vysokoučinné kapalinové chromatografie	39
7.	Chromatografická charakterizace polymerních nosičů léčiv	41
7.1	Příprava poly (N-isopropylakrylamidu-ko-N,N'-metylen-bis-akrylamidu)	41
7.2	Analýza nezreagovaných monomerů	42
7.3	Kombinace systémů pro dodávání léčiv	43
7.4	Dodávání inzulínu	45
7.6	Hydrogely polyakrylamid-methylcelulózy	47
7.7	Hydrogely na bázi polymer-rybí olej	48
8.	Chromatografické módy používané v analýze polymerů	49
8.1	Chromatografie v systémech s normálními fázemi	49
8.2	Chromatografie v systémech s obrácenými (převrácenými) fázemi	49
8.3	Iontově-párová chromatografie	50
8.4	Iontově-výměnná chromatografie	51
	Závěr	52
	Literatura	53

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Základní rozdělení polymerů z hlediska jejich chování za běžné teploty [1]	13
Obrázek 2 - Využití polymerních materiálů [4]	15
Obrázek 3 - Schéma Ringsdorfova modelu [12]	19
Obrázek 4 - Proces endocytózy [15]	21
Obrázek 5 - Struktura alginátu [18]	22
Obrázek 6 - Struktura chitosanu [18]	23
Obrázek 7 - Struktura pektinu [19]	24
Obrázek 8 - Struktura kyseliny hyaluronové [3]	25
Obrázek 9 - Strukturní vzorec kyseliny polymléčné [14]	26
Obrázek 10 - Strukturní vzorec kyseliny polyglykolové [14]	26
Obrázek 11 - Konjugace PEG – léčivo [12]	27
Obrázek 12 - Strukturní vzorec alifatického polyanhydridu [24]	28
Obrázek 13 - Strukturní vzorec polyorthoesterů [17]	28
Obrázek 14 - Typy nanočástic [25]	30
Obrázek 15 - Schéma dendrimeru [14]	31
Obrázek 16 – Struktura polymerní micely unimeru složené z hydrofilních (mPEG) a hydrofobních (PCL) bloků [13]	33
Obrázek 17 - Separace dvou složek v chromatografickém systému [38]	38
Obrázek 18 - Zpracování signálu [39]	39
Obrázek 19 - Schéma HPLC [36]	40
Obrázek 20 - Chromatograf všech složek při $X = 220$ nm s retenčními časy [42]	45
Obrázek 21 - Graf API a hydrogelových složek napříč UV vlnovými délkami [42]	45
Obrázek 22 - Chromatogramy (A) inzulínu v zaváděcím médiu před naplněním; (B) kontrola inzulínu 4,4 (v / v%); a (C) inzulín v zaváděcím médiu po naplnění [43]	46
Obrázek 23 - Struktura Imiquimodu [45]	48

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Hodnoty pH ve vybraných tkáních a kompartmentech [31]	35
--	----

Seznam a překlad zkratk

API – Aktivní farmaceutická substance

APS – Amoniumpersulfát (peroxydisíran amonný)

CDDS – Kombinovaný systém dodávání léčiv

CMC – Kritická koncentrace micel

CMC-PAAm – polyakrylamid karboxymethylcelulózy

DAD – detektor s diodovým polem

DMPA – 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenon

FBSA – Fluorescein isothiokyanát hovězí sérový albumin

FTIR – Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GIT – Gastrointestinální trakt

GOx – glukózooxidáza

HA – Kyselina hyaluronová

HCST – Vyšší kritická teplota roztoku

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPMA – N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid

LCL – Dlouhodobě cirkulující lipozomy

LCST – Nižší kritická teplota roztoku

MBA - N, N'-methylen-bis-akrylamid

MF – mobilní fáze

NIPAAm – N-isopropylakrylamid

NPC – Chromatografie v systémech s normálními fázemi

PANAM – Polyamidoaminové dendrimery

PBS – Fosfátový pufr

PEA – Polyesteraminové dendrimery

PEG – Polyethylenglykol

PEGDMA – poly(ethylenglykol)dimethakrylátový

PEHAM – Polyetherhydroxylaminové dendrimery

PGA – Kyselina polyglykolová

PI – Prasečí inzulin

PLA – Kyselina polylactonová

PMAA – poly(methakrylová) kyselina

PNIPAAm – poly(N-isopropylakrylamid)

P(NIPAAm-ko-MBA) - poly(N-isopropylakrylamidu-ko-N,N'-metylen-bis-akrylamid)

P(NiPMAm) – poly-(N-isopropylmethakrylamid)

PPA – Poly(akrylová) kyselina

PPI – Polypropyleniminové dendrimery

PSE – Prednison

RPC – Chromatografie v systémech s převrácenými fázemi

SEM – Skenovací elektronová mikroskopie

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylenethandiamin

TFA – Kyselina trifluoroctová

VP – Vinylpyrrolidin

VPY – 1-vinyl-2-pyrrolidinon

Úvod

Polymery jsou velmi rozsáhlou skupinou materiálů, se kterými se denně setkáváme. Jedná se o makromolekulární sloučeniny, které se tvoří spojováním monomerů a tvoří velmi dlouhé řetězce. Mezi polymerní materiály patří hlavně plasty, kaučuky, které jsou základní surovinou pro výrobu pryže, nátěrové hmoty, lepidla a další. Můžou být buď syntetické a nebo přírodní.

Polymery biologického původu se označují jako biopolymery a své využití našly hlavně v medicíně a farmacii. Nahrazují dosud používané materiály, jako jsou například kovy a slitiny, protože jsou velmi univerzální, vyrábějí se mnohem snadněji než kovy, můžou se tvarovat, nekorodují a většinou splňují zásadní požadavek, tedy biokompatibilitu, což je schopnost vzájemné snášenlivosti umělých implantátů s okolní hostitelskou tkání a tělem. Z toho plyne, že využití nacházejí hlavně jako implantáty, protézy, kontaktní čočky, kožní náhrady, krevní pumpy a mnoho dalších.

V neposlední řadě našly velké uplatnění jako polymerní nosiče léčiv a odstraňují nevýhody používaných nízkomolekulárních léčiv. Než se léčivo dostane na místo účinku musí dojít k absorpci, distribuci, interakci s receptorem, biotransformaci a nakonec se musí vyloučit procesem exkrece. V každé z těchto fází se může vyskytnout nějaký problém, který může souviset s rozpustností léčiva ve vodě / tuku, s dobou setrvání léčiva v místě absorpce i na místě účinku, s distribucí, protože se léčivo může dostávat i do okolních tkání, s koncentrací léčiva, která v některých místech musí být velká, a proto je nutné podávat vysoké dávky i několikrát denně, což potom vede k projevům vedlejších účinků. Snahou je tyto nežádoucí projevy odstranit právě polymerními nosiči léčiv, které léčivům dávají takové vlastnosti, kterých jinak není možné dosáhnout.

Příkladem můžou být různé implantáty, kde je léčivo rozpuštěno v polymeru, který v organismu podléhá degradaci a uvolňuje léčivo vázané v polymerní matici. Tímto se můžeme vyhnout dennímu podávání léčiva, protože implantáty vydrží i několik let. Prodlužují dobu setrvání účinné látky v krevním řečišti, jejich cílení probíhá na konkrétní místo, aniž by byla zasažena okolní tkáň.

1. Polymery a jejich obecné rozdělení

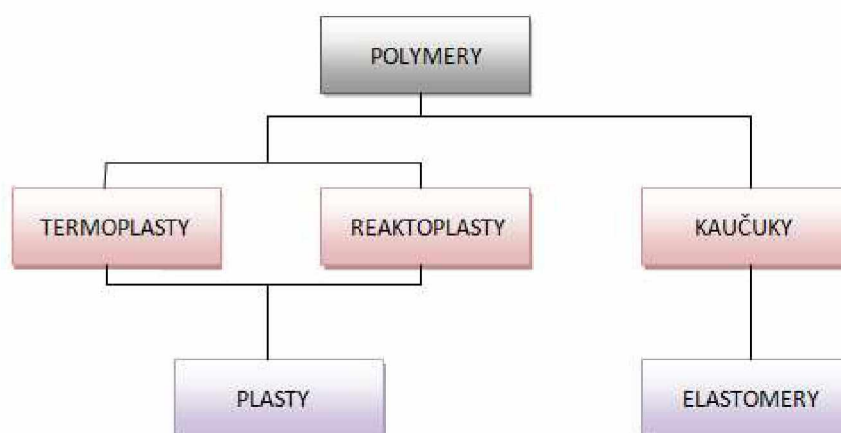
Polymer je chemická makromolekulární sloučenina, která se vyznačuje velmi dlouhým řetězcem, který je důsledkem spojením několika malých molekulárních jednotek (monomerů) a díky tomu má zpravidla velmi vysokou molekulovou hmotnost. Reakce, kdy z malých molekul vznikají vysokomolekulární látky se nazývá polymerizace. Jejich struktura obsahuje atomy uhlíku, vodíku, kyslíku a často je také obohacena o atomy dusíku, chloru a jiných prvků. Při zpracování se v určitém stupni vyskytují v kapalném skupenství, které umožňuje nejčastěji za zvýšené teploty a tlaku poskytnout finálnímu produktu podle potřeby rozmanitý tvar, který bude v tuhém stavu. Primární rozdělení polymerů je na elastomery a plasty.

Elastomer

Elastomer je značně elastický materiál, který můžeme za normálních podmínek bez jakéhokoliv porušení tvarovat, přičemž deformace je vratná. Podjednotkou elastomerů jsou kaučuky, ze kterých může být dále vyrobena třeba pryž (guma).

Plasty

Plasty jsou za normálních podmínek velmi tvrdé a křehké. Při zvýšené teplotě se mění na plastické a tvarovatelné materiály. Jestliže změna z plastického do tuhého materiálu je reverzibilní, jedná se o termoplasty. Pokud se jedná o změnu nevratnou (trvalou) a změna je výsledkem chemické reakce, jedná se o reaktoplasty. Základní rozdělení polymerů je zobrazeno na Obrázku 1. [1; 2]



Obrázek 1 - Základní rozdělení polymerů z hlediska jejich chování za běžné teploty [1]

2. Polymerní materiály v medicíně a farmacii

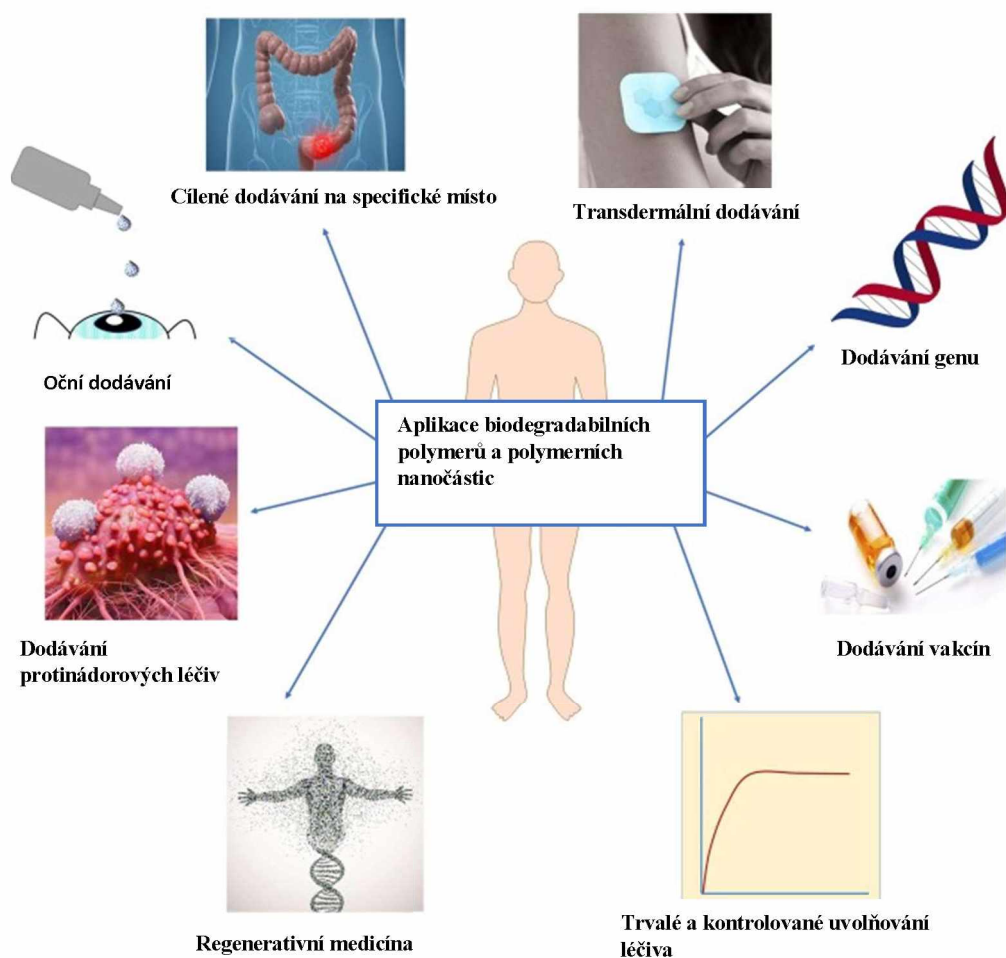
Polymery se rozdělují na umělé (syntetické) a přírodní (biopolymery). Pro lékařské aplikace a farmaceutický průmysl jsou důležité oba typy. Jsou velmi univerzální, takže poslední dobou nahrazují používané materiály, kterými jsou kovy, slitiny a keramika. Jak přírodní, tak syntetické polymery se běžně používají například jako materiály pro různé tělní náhrady, jako jsou kostní šrouby, kostní destičky a další. Můžou sloužit jako kontaktní čočky, zařízení pro dialýzu ledvin, podložky pro kultivaci a následnou transplantaci buněk, materiály pro šití a krytí ran a hlavně jako pomocné látky tzv. excipienty v tradičních lékových formách.

V posledních letech došlo ke značnému rozvoji biodegradabilních biomateriálů, které začaly nahrazovat biostabilní biomateriály, jejichž hlavní nevýhodou je špatná biokompatibilita. Tuto nevýhodu by měly odstraňovat právě biomateriály biodegradabilní, které by měly splňovat vlastnosti: materiál by neměl vyvolávat po implantaci zánět nebo nežádoucí toxickou reakci, degradace materiálu by měla probíhat stejně dlouhou dobu jako hojení či regenerace, po degradaci zpravidla na degradační produkty následuje metabolizace a vyloučení produktů z organismu – produkty by neměly být toxické, dále se jedná o vhodné mechanické vlastnosti, rozpustnost, tvar a další.

Syntetické i přírodní polymery tedy podléhají procesu biodegradace. Biodegradace polymerních biomateriálů se vyznačuje štěpením, které může probíhat dvěma způsoby. U přírodních polymerů probíhá zpravidla degradace enzymatickým štěpením vazeb v polymeru, které vede k erozi polymeru a u syntetických štěpením hydrolytickým. Přírodní polymery mají řadu výhod, jako je bioaktivita, schopnost ligandu vázat receptor k buňkám a jsou citlivé na proteolytickou degradaci vyvolanou buňkami. Také mají své nevýhody a největší z nich je silná imunogenní odpověď, která se vyskytuje u řady polymerů a možnost, že se onemocnění může přenášet.

Mezi velmi významné přírodní polymery patří chitin a kolagen, jejichž největší využití se nachází při přípravách náhrad kůže nebo jako obvazy na rány. Syntetické polymery jsou typické jejich předvídatelnějšími vlastnostmi a možností přizpůsobit se svými vlastnostmi pro specifické aplikace. Vlastnosti se poté můžou upravovat tak, aby vyhovovaly potřebám konkrétní aplikace a tím se stávají vhodnými pro kteréhokoliv pacienta. Odstraňují řadu nevýhod polymerů přírodních. Syntetické polymery jsou využívány hlavně jako implantáty, jsou biologicky inertní a řadí se mezi ně například polyurethany, které se díky jejich výborné biokompatibilitě a mechanickým vlastnostem používají jako kardiostimulátory a vaskulární

štěpy, dále jsou to polyestery, které nacházejí využití v šicích materiálech, polyanhydridy, které našly využití v systémech dodávajících léčivo. K syntéze hydrolyticky biodegradabilních polymerů se můžou použít dvě různé možnosti. První možností je kroková neboli kondenzační polymerace, která se používá k přípravě polyanhydridů, poly (orthoesterů), polyurethanů a dalších. Druhým procesem je adiční neboli řetězová polymerace, kterou doprovází otevření kruhu. Ta se využívá při výrobě polyfosfazenů a poly- α -esterů. [3; 4; 5]



Obrázek 2 - Využití polymerních materiálů [4]

2.1. Proces degradace polymerů

Biodegradabilní polymery podléhají působením enzymů nebo chemickým poškozením spojeným s živými organismy biodegradaci, což je proces odbourávání biodegradabilních polymerů v organismu. Degradace se může projevovat v různých časových intervalech v souvislosti s produktem. Polymery, které se využívají jako chronické implantáty musí být v biologickém prostředí stabilní tak dlouhou dobu, dokud má záření plnit svou funkci, tedy i

několik mnoho let. Polymery pro tkáňové implantáty, degradaci potřebují ve stejném časovém intervalu, který odpovídá době hojení tkáně, tedy týdny až roky. Polymery, které se využívají při dodávání léčiv podléhají degradaci v intervalu několika dnů, mnohdy až let.

Rozlišují se čtyři hlavní degradační mechanismy:

1. Hydrolýza, při které probíhá reakce s vodou ve tkáních za vzniku řetězců, které se rozpadají na kratší.
2. Oxidace, jež je uskutečňována v důsledku produkce antioxidantů tkáněmi. Často se jedná o produkci oxidačních činidel organismem, které jsou důsledkem obranného mechanismu. Oxidační činidla se dostávají do polymerních materiálů a degradují je.
3. Enzymatická degradace, která probíhá v důsledku obranného účinku vůči implantovaným materiálům.
4. Fyzikální degradace, jejíž příčinou může být mechanická zátěž. [6; 7]

Hydrolýza může probíhat dvěma mechanismy – v prvním případě může dojít k pasivní hydrolýze a nebo ve druhém, kdy může dojít k hydrolýze aktivní, která vyžaduje použití katalyzátoru. V obou případech záleží na tom, jaký typ vazeb ve své struktuře polymery obsahují. Enzymaticky odbouratelné polymery obsahují hydrolyticky labilní vazby a vyžadují přítomnost katalyzátoru. Mezi polymery, jejichž vazby podléhají pasivní hydrolytické degradaci se řadí polyestery, polykarbonáty, polyamidy, polyanhydridy a mnoho dalších. Chování degradace závisí na mnoha faktorech mezi které patří struktura monomeru, zpracování materiálu, molekulová hmotnost, hydrofilita, krystalinita, která pokud je přítomna brání difúzi vody a tím omezuje přístup k vazbám. [7; 8]

Degradace je obvykle doprovázena mechanismem, který se nazývá eroze polymeru. Eroze polymeru může probíhat dvěma způsoby. Může probíhat jako povrchová, kdy dochází ke ztrátě materiálu pouze z povrchu polymeru a tvar zůstává stejný. Její výhodou je předvídatelnost eroze, což se uplatňuje u polymerů, které fungují na principu dodávání léčiv, kde jejich uvolňování závisí na její rychlosti. Druhým způsobem je eroze hromadná, která není omezena na povrch, velikost materiálu zůstává stejná po určitou dobu jeho aplikace. [8]

3. Polymerní nosiče léčiv

Hlavními problémy, které se v současné době řeší s podáváním léčiv souvisí s biologickou distribucí léčiv po celém těle, s potřebou dodávat vysoké dávky léčiva pro dosažení vysoké koncentrace v místě účinku s nimiž souvisí projevy nežádoucích vedlejších účinků, které se mohou vyskytovat v různé míře a způsobovat až velmi závažné problémy. Tyto problémy mohou být spojené s poškozením orgánů nebo dokonce částí organismu. Dále se jedná o malou specifickou afinitu léčiva k potřebnému místu, nespecifickou toxicitu a mnoho dalších. Můžeme se setkat i s nemocemi, na které žádná léčiva nezabírají. Ve všech těchto případech se využívají makromolekulární látky, jak přírodní, tak syntetické, které spolu s léčivou odstraňují jejich nevýhody. Například zajišťují rozpustnost ve vodě nerozpustných aktivních sloučenin nebo potlačují rezistenci cílové tkáně k léčivu. Cílení léčiv zahrnuje přímou aplikaci léčiva do cíleného místa účinku, kdy se léčivo podává přímo do postižené oblasti. Pasivní cílení léčiva, kdy dochází k akumulaci léku v oblastech s prosakující vaskularitou nebo účinkem zvýšené permeability. Fyzické cílení založeno na změně pH a teploty v cílovém místě, jedná se o nosiče léčiv citlivé na pH a teplotu, magnetické cílení, kde působí vnější magnetické pole a cílení pomocí specifických molekul – ligandů, které mají specifickou afinitu k určité oblasti. [9; 10; 11]

Polymery jsou jednou z nejdůležitějších součástí v podávání léků, kvůli jejich zlepšeným farmakokinetickým i farmakodynamickým vlastnostem. Polymerní nosiče léčiv umožňují prodloužit cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a účinek selektivně zaměřit na konkrétní tkáň, soubor buněk (např. nádor), jednotlivou buňku nebo jen buněčné kompartmenty ve specifickém čase. Můžeme se setkat s celou řadou nosičů založených na rozpustných polymerech, lipozomech, nanočásticích, polymerních micelách. V dnešní době se vývoj zaměřuje zejména na kancerostatika a to z toho důvodu, že přibývá lidí s nádorovým onemocněním. [9]

Mechanismy uvolňování léčiv z polymerních nosičů mohou být do [12]:

- Membránových systémů, kde je léčivo dispergováno uvnitř polymerní membrány a uvolňování může být řízeno difúzí léčiva
- Polymerní matrice, ve které je léčivo dispergováno a uvolňování může být řízeno difúzí léčiva, erozí matrice

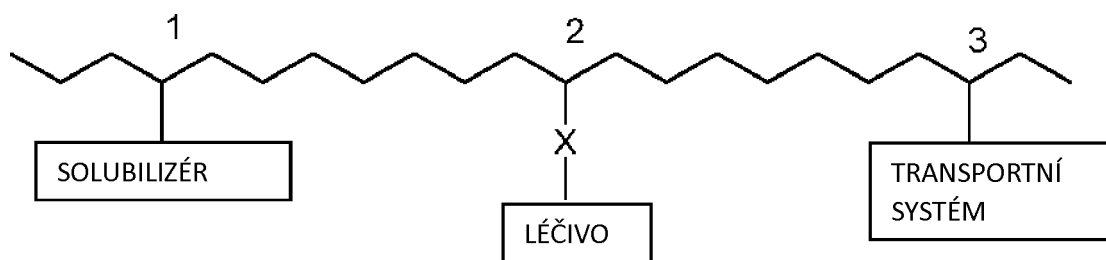
- Hydrofilní matrice, kde je uvolňování řízeno bobtnáním matrice nebo jejím pomalým rozpouštěním
- Systémů, které reagují na podněty a uvolňování zde závisí na změnách teploty, pH
- Konjugátů polymer-léčivo (léčivo nebo bioaktivní sloučenina spojena s polymerem pomocí fyziologicky labilní vazby), kde dochází k chemickému uvolňování léčiva

3.1 Ideální léčivo

V roce 1906 německý lékař a nositel Nobelovy ceny za fyziologii Paul Ehrlich formuloval koncepci „ideálního léčiva“, které nazývá „magickou střelou nebo kouzelnou kulkou“, jež je složena ze dvou složek. Úkolem první složky je rozpoznat a vázat cíl, druhá složka má za úkol poskytnout terapeutický účinek v požadovaném cíli. Dochází zde k cílenému podání léčiva v jeho neaktivní formě, následuje transport léčiva do cílového místa, kde musí splňovat podmínku a měnit svoji neaktivní formu na aktivní, která zajistí jeho působení po určitou dobu a maximální účinek. V poslední fázi dochází k metabolizaci, kdy se léčivo rozkládá na produkty, které se následně vylučují z organismu. Nízkomolekulární léčiva jsou velmi rychle odstraněna z organismu glomerulární filtrací v ledvinách a nechráněné volné léčivo může před vyloučením z organismu podléhat biotransformaci nebo se ukládat v některých tkáních. Z tohoto důvodu se využívají vysokomolekulární polymery, jejichž hlavními výhodami jsou zejména jejich všestrannost ze strukturálního hlediska, schopnost spojovat hydrofobní a hydrofilní složky, jako jsou interakce polymer-polymer, polymer-léčivo, polymer-rozpouštědlo. Jedná se i o pomalé uvolňování léčiv rozpustných ve vodě, způsobené glomerulární filtrací vysokomolekulárních látek ledvinami (hodnota je nad prahem hodnoty glomerulární filtrace), což má za následek prodloužení doby cirkulace v krevním řečišti, také může docházet ke zlepšení biologické dostupnosti u léčiv s nízkou rozpustností, jednoduchá štěpitelnost polymerů, kontrola nad uvolňováním toxických léčiv, jejich zlepšené cílení na tkáň nebo buňky. [10; 11; 12]

4. Vodorozpustné polymerní nosiče léčiv

Vodorozpustné polymerní nosiče jsou velmi využívanými v rozpustných i nerozpustných (hydrogelových) formách. V případě vodorozpustných polymerních nosičů se jedná o polymerní konjugáty, v nichž je léčivo k polymernímu nosiči navázáno pomocí kovalentní vazby. Jako první přišel s konceptem využití vodorozpustných polymerů jako nosičů léčiv v roce 1975 Helmut Ringsdorf, který je nazýval syntetickými polymerními léčivy nebo farmakologicky aktivními polymery. Tento koncept je založen na spojení léku a polymerem kovalentní vazbou. Schéma Ringsdorfova modelu je na Obrázku 3.



Obrázek 3 - Schéma Ringsdorfova modelu [12]

V tomto případě je model rozdělen na tři oblasti, z nichž každá oblast má svoji specifickou funkci. V první oblasti se nachází solubilizátor představující hydrofilní oblast s polárními nebo iontovými skupinami. Je důležitá k tomu, aby zajišťovala rozpustnost celé makromolekulární látky, což je velmi žádané, kvůli tomu, že řada léčiv má nízkou biologickou dostupnost, díky jejich snížené rozpustnosti ve vodě. Konjugáty polymer-léčivo umožňují, aby dodávání léčiva bylo kontrolováno a přitom k uvolňování léčiva docházelo v určitém časovém intervalu. Tímto lze rychlost a dobu dodávání léčiva nastavit tak, že koncentrace je poté dosažena v požadované, terapeuticky účinné hodnotě. V této oblasti lze tedy zamezit opakovanému podávání, které vede ke vzniku nežádoucích vedlejších účinků, které mohou vykazovat až toxické vlastnosti. Dochází zde též ke vzniku vazby s biologicky aktivní látkou. Mezi nejznámější látky, které solubilizují ve vodě patří vinylpyrrolidin (VP), akrylamidy. Může nastat i případ, kdy látky solubilizují v lipidech. Druhá oblast je typická spojením léčiva a polymeru prostřednictvím spaceru (spojky), zde jsou nejvíce využívány polymerizovatelné aktivní skupiny esterů a amidů. Poslední oblast označována jako transportní systém funguje jako směrující struktura, která transportuje polymerní nosič i s léčivem do cílové tkáně, může se jednat o různé enzymy, hormony, aktivní systémy, které obsahují například sulfoxidické skupiny. [12; 13]

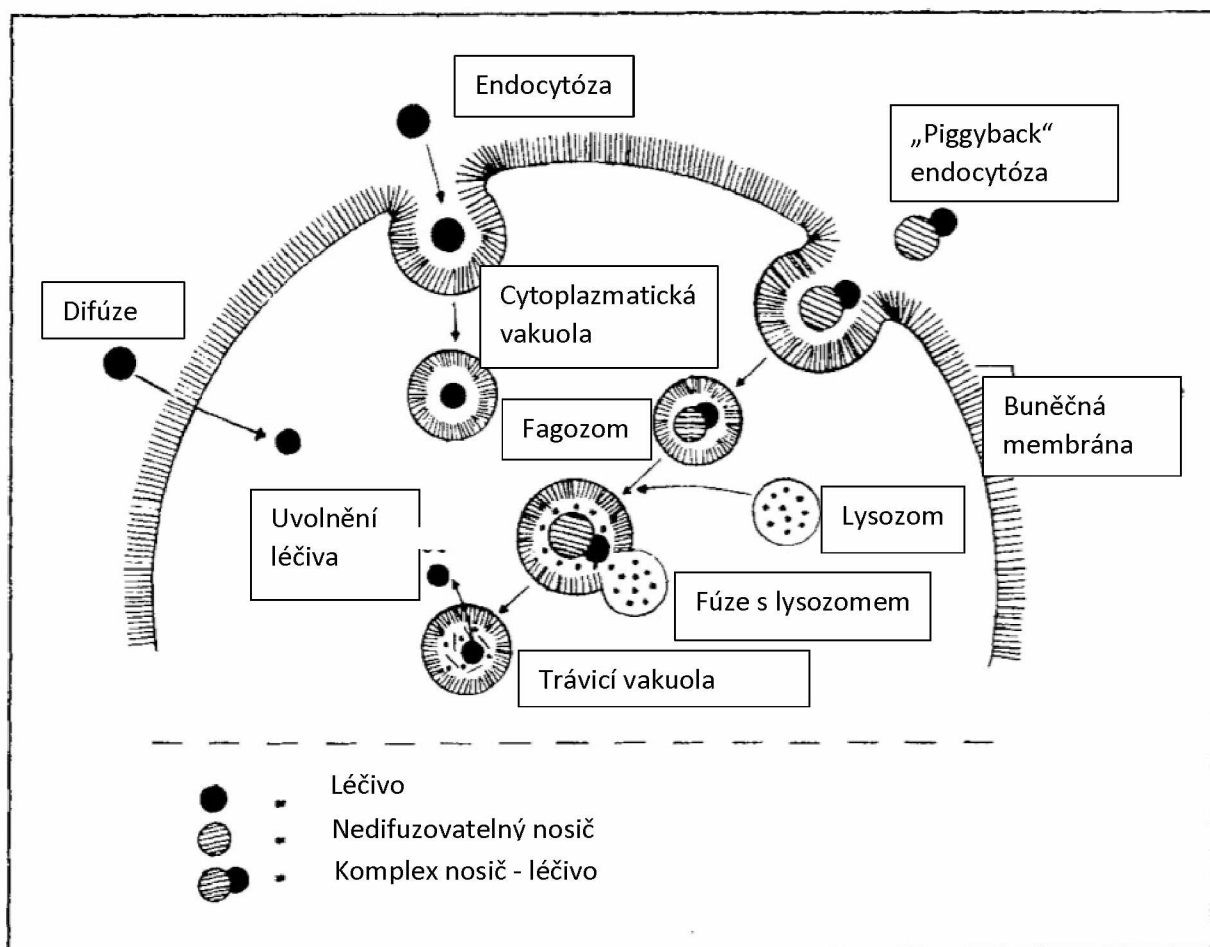
4.1 Vlastnosti polymerního nosiče léčiv

Polymery, které mají být využity jako polymerní nosiče léčiv musí splňovat několik podmínek. Měly by být [14]:

- netoxické
- neimunogenní
- biodegradovatelné
- biokompatibilní
- rozpustné ve vodě

4.2 Transport polymerního nosiče do buňky

Je známo, že nízkomolekulární látky se do buněk dostávají různými transportními mechanismy. Jedním z nejvýznamnějších je transport mechanismem prosté difúze přes membránu, nebo také je možnost využití aktivního transportu pomocí membránových bílkovinných přenašečů. Vysokomolekulární látky tento transport využít nemohou z toho důvodu, že membránami neprocházejí, proto se v jejich případě využívá proces zvaný endocytóza, která je dále rozdělena na dvě podskupiny. První podskupinou je pinocytóza, při které dochází k tvorbě malých útvarů – vezikul, které jsou typické pouze pro látky, které jsou rozpustné. Druhou podskupinou je fagocytóza. Zde se tvoří také vezikuly, ale větší velikosti a s obsahem mikročástic. Celý proces je zobrazen na Obrázku 4.



Obrázek 4 - Proces endocytózy [15]

Dochází zde k adsorpci polymeru na buněčné membráně, která je závislá na buněčné absorpci a ovlivňuje ji řada faktorů. Mezi takové faktory patří molekulová hmotnost polymeru. Čím vyšší je molekulová hmotnost, tím rychlejší je endocytóza. Jakákoliv rozpustná látka, která je přítomná v okolní tekutině, bývá zachycena pinocytózou. Velmi známá a studována je adsorpční pinocytóza, při které dochází k fúzi pinocytického váčku s lysosomy, což jsou intracelulární vakuoly, které obsahují vysokou koncentraci hydrolytických enzymů mezi kterými jsou schopny degradovat vazby, jež se nacházejí v polymerech. Splnutím s lysosomy dochází do styku obsah pinocytického váčku s lysozomálními enzymy. Trávení obsahu v trávicí vakuole známé jako sekundární lysozom je závislý na náchylnosti zachycené makromolekuly k enzymatickým lysozomům. Lécivo musí být dostatečně malou molekulou, aby prošel přes lysozomální membránu a dostal se na místo, které je požadováno. Jakmile bude uvolněno z makromolekulárního nosiče, musí být odolné vůči lysozomálním hydrolázám. Polymerní nosič musí být degradovatelný lysozomálními enzymy, aby se nehromadil v cílových buňkách. Nedegradovatelné látky zůstávají dlouhou dobu zachyceny v lysosomech, obvykle po celou

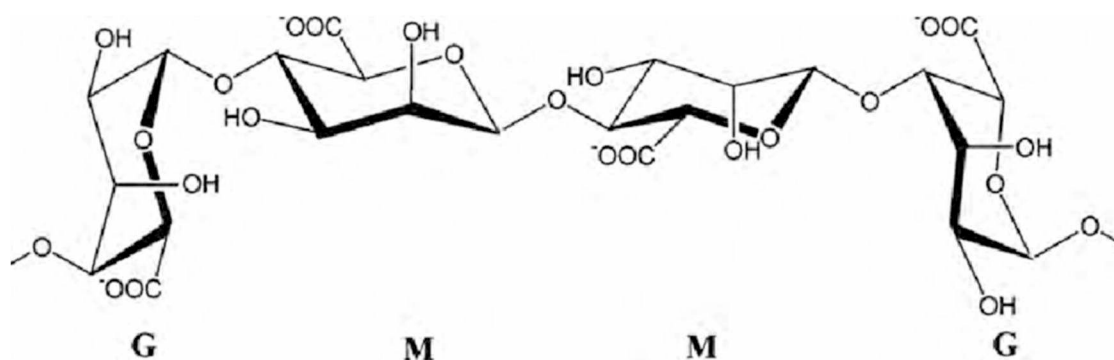
dobu života buňky. Vylučování je závislé na membráně, která obklopuje lysozom a není propustná pro makromolekuly, avšak umožňuje průchod monomerů, ze kterých jsou polymery složeny. [15; 16]

4.3 Přírodní polymerní nosiče léčiv

Mezi vodorozpustné polymerní nosiče se řadí přírodní polymery, které se nejčastěji klasifikují do dvou typů. Vyskytují se ve formě polymeru, který je na bázi proteinů a nebo ve formě polysacharidů. V případě proteinů se využívá albumin, želatina a kolagen. Mezi nosiče na bázi polysacharidů patří kyselina hyaluronová, alginát, dextran, chitosan, celulóza, agaróza a mnoho dalších. Jejich největší výhodou je biodegradovatelnost enzymatickým štěpením na produkty, které organismus snadno vyloučí, může se jednat dokonce o produkty organismu prospěšné, a s poměrně vysokou biologickou bezpečností. [17; 18]

4.3.1 Alginát

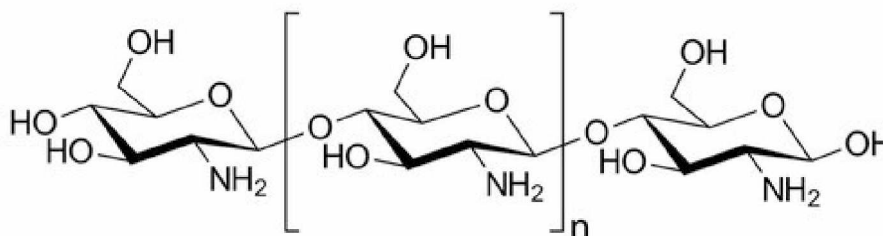
Alginát je nerozvětvený, ve vodě rozpustný polysacharid, který se získává při extrakci z hnědých mořských řas. Je složen z monomerů glykosidicky vázané β -D-manurové a α -glukuronové kyseliny. Materiály na bázi alginátu jsou citlivé na pH, takže uvolňování biomolekul z materiálů na bázi alginátu s nízkým pH je výrazně nízké, což je výhodné při dodávání léčiv na požadované místo účinku. Nevýhodou použití gelů na bázi alginátu je jeho špatná odbouratelnost a špatná adheze buněk na gelech. Struktura alginátu je zobrazena na Obrázku 5. [3; 18; 19]



Obrázek 5 - Struktura alginátu [18]

4.3.2 Chitosan

Chitosan je lineární polysacharid, který se skládá z β -vázaného D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu. Získává se deacetylací chitinu, přírodního biopolymeru pocházejícího z kutikuly členovců. Chitosan je biodegradabilní, biokompatibilní a netoxický. Je rozpustný ve vodě a v kyselých roztocích, což způsobuje kationtový charakter, který je schopný tvořit polyelektrolytové komplexy s polymery s aniontovým charakterem, což se osvědčilo při přípravě nanosfér a nanokapslí. Chitosan je degradován mikroflórou, která se nachází v tlustém střevu a bylo zjištěno, že je výhodný jako nosič léčiv specifické pro tlusté střevo. Struktura chitosanu je na Obrázku 6. [17; 18; 19]



Obrázek 6 - Struktura chitosanu [18]

4.3.3 Želatina

Želatina je bezbarvá, pevná látka bez chuti. Přípravuje se hydrolýzou kolagenu získaného z kůže, bílé pojivové tkáně a kostí zvířat. Příkladem mohou být prasata, ryby, kuře, domácí skot. Nejčastěji je vyrobena z hovězích kostí. Využití nachází u přípravy čípků, pastilek, při potahování tablet a jejich formování do pouzder tobolek, dále při mikroenkapsulaci léčiv. Největší využití nachází však při tvorbě obalu farmaceutických tobolek, aby je bylo možno snadněji polykat. [18; 19]

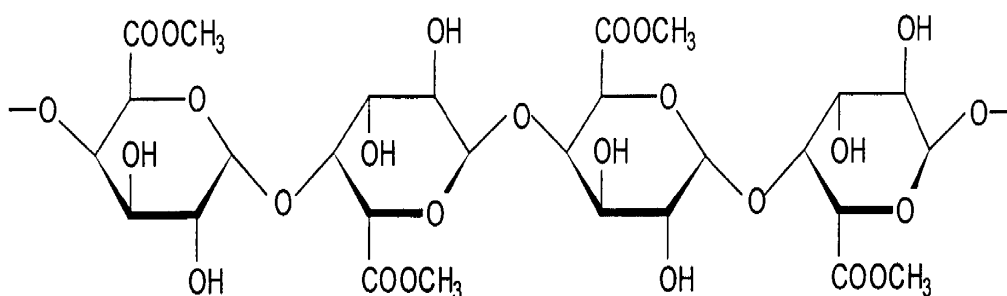
4.3.4 Kolagen

Kolagen je nejvíce se vyskytujícím proteinem v lidském těle, ve kterém bylo dosud identifikováno více než 22 různých typů kolagenů a mezi nejznámější patří typ I – IV. Kolagen prvního typu se skládá ze tří podjednotek, které jsou složeny z polypeptidů s podobným složením aminokyselin. Hlavní složkou kůže a dalších muskuloskeletálních tkání. Jeho

specifickou vlastností je trombogenicita, což vedlo k použití kolagenu jako hemostatika. Vzhledem k jeho vysoké reaktivitě může dojít k zesíťování řadou zesíťujících činidel, jako jsou polyepoxy sloučeniny, polyethylenglykol a další. K zesíťování může dojít i tepelným nebo vysokoenergetickým ozářením, aby došlo k vytvoření kolagenových gelů, které se používají jako nosiče léčiv. Uvolňování léčiva z kolagenových matic lze regulovat změnou fyzikálních vlastností gelu, jako je hustota nebo rychlost degradace. Kolagen se používá jako nosič nízkomolekulárních léčiv včetně antibiotik. Je známo, že kolagen u některých lidí vyvolává imunogenní reakce, což omezuje jeho užitečnost. [3; 20]

4.3.5 Pektin

Pektin je polysacharid buněčných stěn rostlin. Jedná se o lineární makromolekulární látku, která je složena z molekul kyseliny D-galakturonové. Hlavními zdroji pektinu jsou citrusy, takže se nachází například v citronu nebo grapefruitu. V souvislosti s polymerními nosiči léčiv nachází uplatnění ve formě pektinového gelu, který je účinný při řízeném uvolňování léčiva v gastrointestinálním traktu. Struktura pektinu je znázorněna na Obrázku 7. [18; 19]

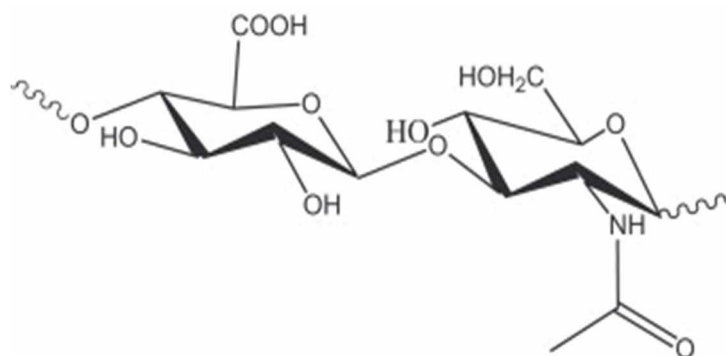


Obrázek 7 - Struktura pektinu [19]

4.3.6 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová se řadí do skupiny glykosaminoglykanů, jež jsou lineární polysacharidy střídavě složené z jednotek N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny glukuronové, nachází se ve tkáních obratlovců. Jedná se o glykosaminoglykan s největší molekulovou hmotností až několik milionů. Rozdílem od jiných glykosaminoglykanů, jako je chondroitin sulfát a heparin sulfát, se kyselina hyaluronová neváže kovalentně na proteiny. Je rozpustná ve vodě a tvoří viskózní roztoky s vysokými viskoelastickými vlastnostmi. Podporováním migrace a diferenciací mezenchymálních a epiteliálních buněk se účastní opravy tkání, což zvyšuje

depozici kolagenu a angiogeneze, díky čemuž se stala ideálním biomateriálem pro aplikaci léků. Struktura HA je na Obrázku 8. [3]



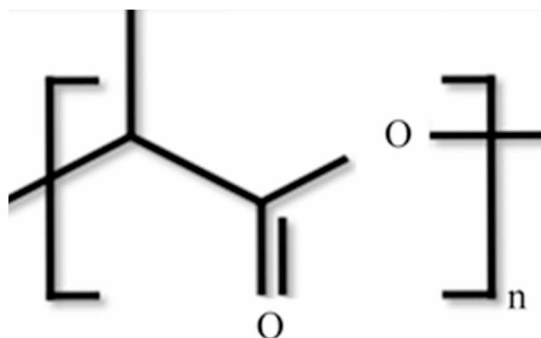
Obrázek 8 - Struktura kyseliny hyaluronové [3]

4.4 Syntetické polymerní nosiče léčiv

Jak již bylo řečeno, syntetické polymerní nosiče léčiv se připravují podle potřeby z široké škály různých materiálů, jejichž vlastnosti lze upravit tak, aby vyhovovaly zvoleným požadavkům. Ne všechny syntetické polymerní nosiče jsou biodegradovatelné, takže se při jejich přípravě musí dbát na to, aby nedocházelo k jejich hromadění v organismu, které by následně mohlo být velmi nebezpečné. Mezi biologicky nerozložitelné polymery se řadí polyethylenglykol (PEG), jež je nejvíce studovaný, dále deriváty celulózy například karboxymethylcelulóza, polyvinylpyrrolidin a ostatní. Většina biologicky rozložitelných syntetických polymerů závisí na štěpení esterových vazeb nebo derivátů, mezi které patří polykyselina (mléčná / glykolová) a poly(ϵ -kaprolakton). Kromě esterových derivátů jsou hydrolyzovány polyanhydridy, polyamidy, polyorthoestery, poly(fosfazeny), deriváty poly(kyanoakrylátů) a další. [17; 21]

4.4.1 Kyselina polymléčná

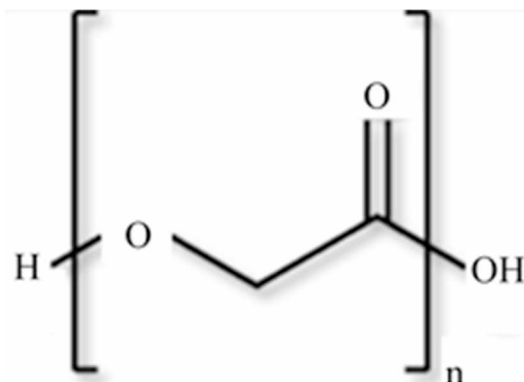
PLA (Obrázek 9) je biologicky rozložitelný termoplastický alifatický polyester získaný z obnovitelných zdrojů, jako je například škrob, kukuřice, kořeny tapioky nebo cukrová třtina. PLA je jeden z nejpoužívanějších nosičů léčiv, protože je biokompatibilní s živou tkání a dochází ke snadné vylučitelnosti z těla. Dochází k hydrolýze vedoucí na kyseliny, které se z těla vylučují za pomoci Krebsova cyklu v podobě oxidu uhličitého a v moči. [14; 17]



Obrázek 9 - Strukturální vzorec kyseliny polymléčné [14]

4.4.2 Kyselina polyglykolová

PGA (Obrázek 10) je biodegradovatelný termoplastický polymer. Jeho příprava spočívá v polykondenzaci z kyseliny glykolové nebo v polymeraci s otevřením kruhu. Mezi jeho vlastnosti patří netoxičita, tvrdost a má výborné vlastnosti pro tvorbu vláken. γ -PGA se používá jako polymerní nosič léčiv pro nádorová onemocnění. [14; 17]

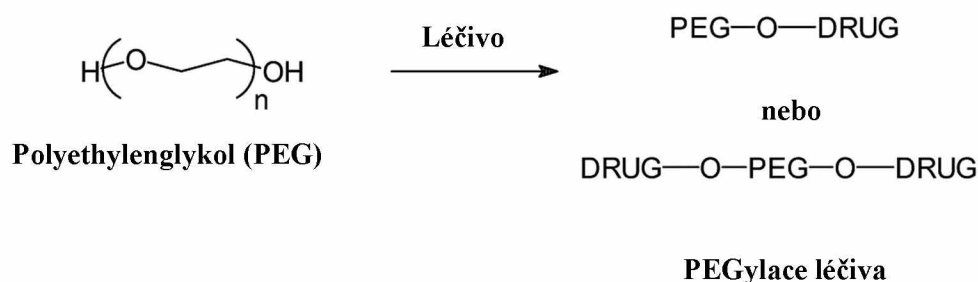


Obrázek 10 - Strukturální vzorec kyseliny polyglykolové [14]

4.4.3 Polyethylenglykol

Konjugáty polymer-léčivo obsahují konjugační místa s reaktivními skupinami, jež se používají pro konjugaci buď přes koncové skupiny nebo připojené polymerní skupiny. V připojených polymerních skupinách mohou být stejné nebo různé biomolekuly konjugovány k danému polymernímu řetězci řízením počtu reaktivních skupin, včetně spacerů mezi nimi, bioaktivní molekulou a udržováním biologicky rozložitelného charakteru vazeb. Při konjugaci přes koncové skupiny k ní může dojít pouze v jednom nebo ve dvou krajních koncích řetězců. Jeden z nejjednodušších polymerů, který se řadí do systémů s koncovými skupinami patří

polyethylenglykol (PEG). Polyethylenglykol se vyznačuje nízkým indexem polydisperzity, což je podmínkou, aby měl farmaceutické využití. Jeho hodnota polydisperzity se nachází pod 1,01 a z toho vyplývá, že polymer je více homogenní a v těle stráví dostatečně dlouhou dobu. Důležitý je při proteinové PEGylaci, která je založena na konjugaci PEG s proteinovými léky jako je například inzulin, daunorubicin, kamptotecin a další, přičemž dochází k ochraně před imunitním systémem těla a prodlužuje dobu setrvání v těle. Všechny modifikace na bázi PEG jsou založeny na nahrazení hydroxylových skupin, přitom se musí brát v úvahu vliv molekulové hmotnosti PEG řetězců a místa konjugace, které ovlivňují konečné vlastnosti konjugátů. Obecně se používá PEG s průměrnou molekulovou hmotností několika tisíců a většina konjugací PEG-proteinů je prováděna přes lysinovou aminoskupinu proteinu. Typický konjugát polymer-léčivo na bázi PEG je znázorněn na Obrázku 11. Mezi hlavní výhody při konjugaci s PEG se řadí jeho netoxicity, snadná aktivovatelnost pro konjugaci, komerční dostupnost, konjugáty mají zlepšenou rozpustnost a stabilitu, je vysoce odolný proti povrchové adsorpci, delší doba cirkulace v krevním řečišti, snížená imunogenita a antigenicita, kontrolovaná permeabilita prostřednictvím biologických bariér. [12; 22; 23]

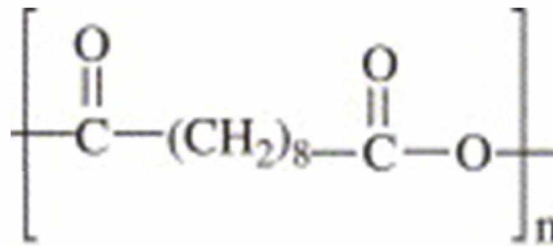


Obrázek 11 - Konjugace PEG – léčivo [12]

4.4.4 Polyanhydridy

Polyanhydridy (Obrázek 12) jsou jedny z nejvhodnějších polymerů jako nosičů léčiv. Je žádoucí, aby kontrola nad uvolňováním léčiva byla co nejvyšší. K tomu je zapotřebí, aby léčivo podléhalo degradaci a následně docházelo k povrchové erozi, protože k uvolnění léčiva z povrchu dochází při konstantní rychlosti uvolňování. Z toho vyplývá, že rychlost bude přímoúměrná rychlosti eroze polymeru, ale nemusí to platit vždy. Může být navržen i tak, že uvolňování léku může trvat dny až týdny podle potřeby. Vazba v anhydridech je hydrolyticky velmi reaktivní, univerzální a poskytuje kontrolu nad rychlostí degradace. Dochází k degradaci

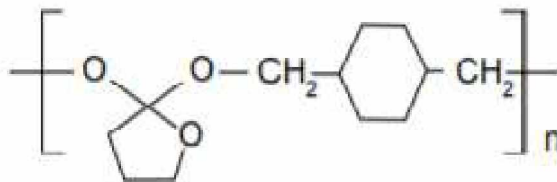
na netoxické metabolity, které nejsou mutagenní, cytotoxické a nedochází ani ke vzniku zánětu. Polyanhidydy splňují podmínku biokompatibility. [24]



Obrázek 12 - Strukturální vzorec alifatického polyanhidydu [24]

4.4.5 Polyorthoestery

Polyorthoestery (Obrázek 13) jsou jedinečné mezi všemi biodegradovatelnými polymery, z hlediska jejich mechanických vlastností, které se můžou měnit výběrem vhodných diolů nebo směsí diolů při jejich syntéze. [21]



Obrázek 13 - Strukturální vzorec polyorthoesterů [17]

5. Ostatní vybrané systémy využívané jako nosiče léčiv

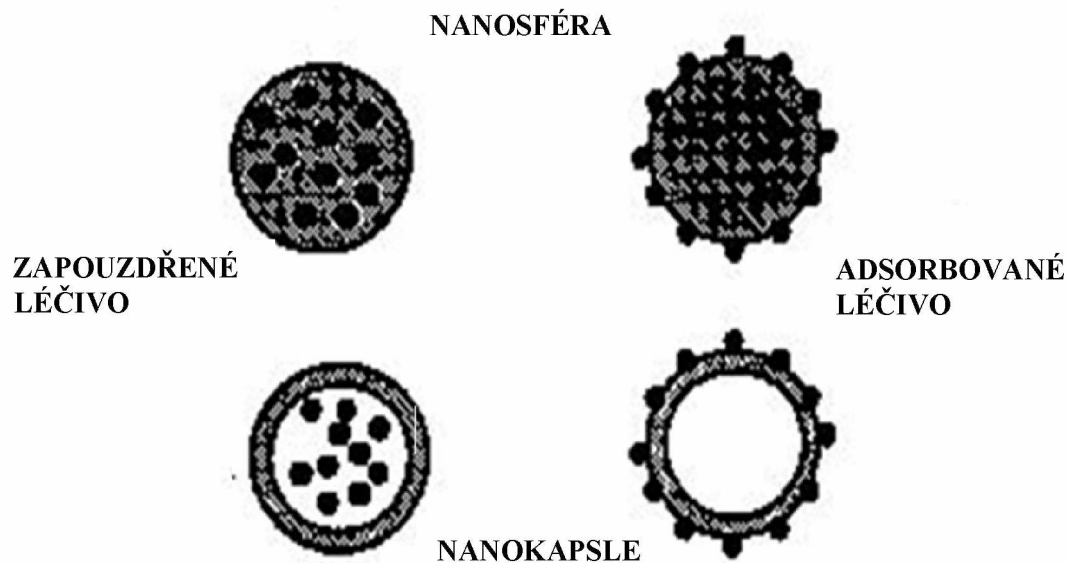
5.1 Nanočástice

V posledních letech se v oboru farmacie můžeme setkat s mnoha moderními technologiemi, které byly nedávno zavedeny. Do takových moderních technologií se řadí nanotechnologie, o kterou v posledních letech vzrůstá zájem. Nanočástice jsou tvořeny takovými polymery, které jsou biodegradovatelné, biokompatibilní, což je důvodem k tomu, aby byly použity jako nosiče léčiv. Polymerní nanočástice jsou pevné koloidní částice, jejichž průměr se nachází v rozmezí od 1 do 1000 nm. Jejich rozměr je dalším důvodem k jejich využití v oblasti podávání a cílení léčiv. Můžou být použity jako adjuvans ve vakuínách nebo jako nosiče léčiv, ve kterých dochází k rozpuštění, zachycení, zapouzdření nebo chemickému připojení účinné látky. Nanosystémy mají spoustu výhod. Dochází k řízenému uvolňování léčiva, které se následně odstraní tak, že se v organismu nehromadí. Mají sníženou toxicitu a výskyt nežádoucích účinků, různé cesty podávání. Systémy s nanočásticemi se používají pro mnoho typů podávání léčiva, včetně orálního, parenterálního, intraokulárního a další. Mají taky svoji nevýhodu, která souvisí s jejich velikostí a plochou, protože dochází k jejich agregaci a poté je obtížné s nimi manimulovat.

Pro přípravu nanočástic se využívají biodegradabilní polymery. Z přírodních hydrofilních polymerů se využívají proteiny. Například želatina nebo albumin a polysacharidy alginát nebo třeba chitosan. A taky syntetické hydrofobní polymery, které se rozdělují do dvou skupin.

První skupina obsahuje polyestery (poly (kyselina mléčná), polystyren) a druhá skupina poly (alkylkanoakryláty).

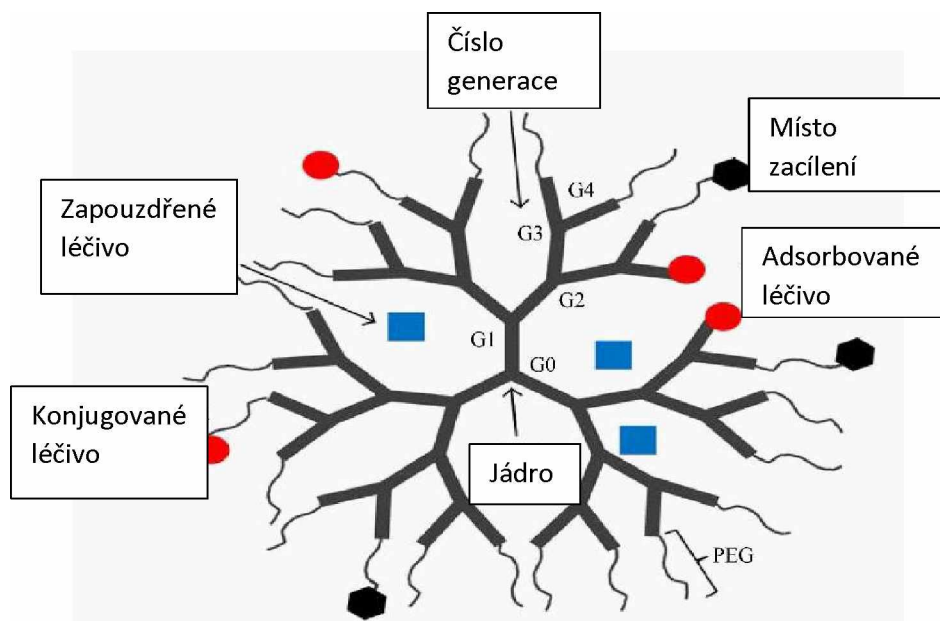
Pojmenování nanočástice je souhrnný název pro nanosféry a nanokapsle. Nanosféry obsahují matici, ve které jsou léčiva rozptýlena nebo adsorbována na jejím povrchu polymeru a nebo jsou zapouzdřena v částicích. Nanokapsle jsou vezikulární systém, který v sobě zahrnuje dutinu, která se skládá z vnitřního kapalného jádra, jež je obstoupeno polymerní membránou. Nejčastěji je účinná látka rozpuštěna ve vnitřním jádru, ale je zde možnost, že se může adsorbovat na povrch tobolky. Léky jsou následně uvolňovány difuzí nebo pomocí degradace polymeru. Typy nanočástic jsou znázorněny na Obrázku 14. [14; 25]



Obrázek 14 - Typy nanočástic [25]

5.2. Dendrimery

Dendrimery jsou rozvětvené polymerní makromolekuly, které se vyznačují trojrozměrností a vysokou rozvětveností, díky které struktura dendrimerů připomíná strom (název je odvozen z řeckého slova „dendron“, což v překladu znamená „strom“). Tyto jedinečné struktury umožňují konjugaci léčiv na povrch nebo mohou být zachyceny uvnitř dendrimeru, čímž maximalizují potenciál biologických interakcí. Skládají se z jádra, které je označováno jako „kořen“, ze kterého vychází dendrony (rozvětvené jednotky), které vytváří rozvětvenou strukturu monomerních jednotek. Mezi jednotlivými body v jejich struktuře se nacházejí vrstvy, které se nazývají „generace“ a generace 0 značí jádro. Vše je vyznačeno na Obrázku 15. [26; 27]



Obrázek 15 - Schéma dendrimera [14]

V souvislosti s dopravou léčiv se můžeme setkat s těmito zástupci dendrimérů: polyamidoaminové (PAMAM), polyesteraminové (PEA), polypropyleniminové (PPI) a polyetherhydroxylaminové (PEHAM). Na rozdíl od klasických polymerů, mají dendrimery co se týče nosičů léčiv velmi vysokou rozpustnost ve vodě, biokompatibilitu, polyvalenci a přesně definovanou molekulovou hmotnost. Díky těmto vlastnostem se z dendrimérů stávají ideální nosiče léků. Vzhledem k jejich rozvětvené struktuře mají často otevřené dutiny mezi sousedními větvemi, což umožňuje zapouzdření léčiv, což může pomoci při solubilizaci špatně rozpustných léčiv. Dendrimery PAMAM jsou pro podávání léčiv nejpoužívanější. Ve struktuře dendrimera se nacházejí tři místa pro zachycení léčiva. Jedná se o prázdné prostory, kde dochází k molekulárnímu zachycení, o body větvení, kde se léčivo váže vodíkovou vazbou a skupiny vnějších povrchů, kde dochází k interakci náboj-náboj. [13; 27; 28]

5.3. Lipozomy

Lipozomy jsou řazeny mezi nanosystémy, jsou označovány jako mikročásticové lipidní vezikuly, které jsou složeny z fosfolipidové dvojvrstvy oddělující ohraničený prostor vnitřní vodné vrstvy od vnějšího vodného prostředí. Podobají se buněčné membráně. Jsou složeny z přírodních nebo syntetických fosfolipidů (může se jednat i o sfingolipidy) s amfifilním charakterem. Jelikož se většina fosfolipidů nachází v organismu, lze tento systém

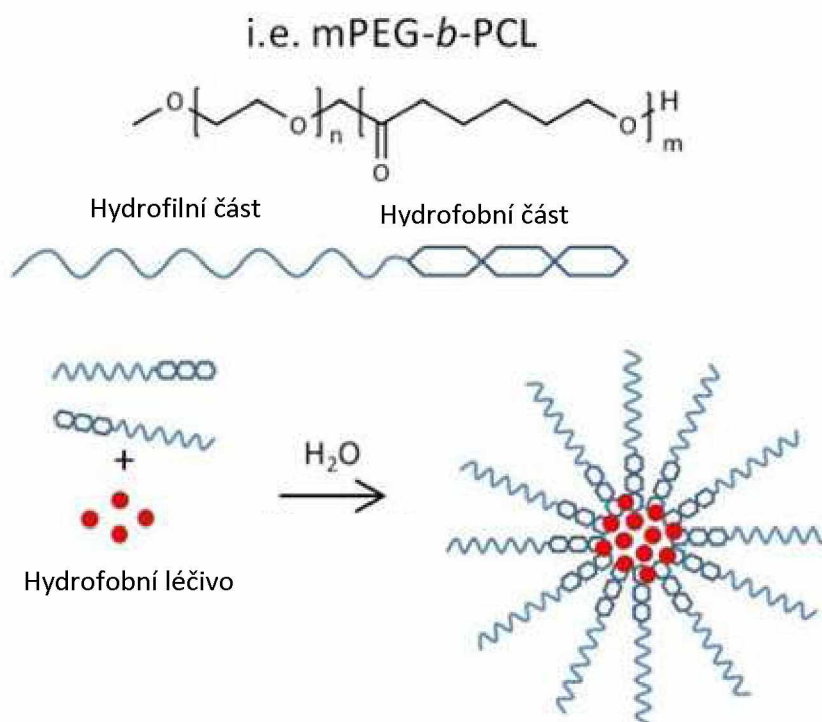
charakterizovat jako biokompatibilní a biodegradovatelný. Lipozomy umožňují zapouzdření hydrofilních nebo lipofilních sloučenin, což se využívá právě u léčiv. Je možné se setkat i se zapouzdřením plynů, které vede k intravenóznímu podávání plynných molekul. Jedná se o velmi univerzální systémy, které se můžou v mnoha ohledech lišit. Můžou se lišit svou velikostí, složením povrchu, objemem a složením vodného prostředí, lipidová dvojvrstva může být různě upravena a v mnoha dalších ohledech. Jejich vlastnosti jsou velmi důležité, protože může docházet ke zvyšování lipozomového cílení a dodávání léčiva, kdy vezikuly zvyšují akumulaci léčiva v cílové tkáni nebo buňce a snižují schopnost léčiva dostat se i do jiných tkání, tedy dochází i k potlačení vedlejších účinků. Liposomy se rozdělují do několika skupin podle složení a mechanismu nitrobuněčného dodávání do pěti typů na konvekční lipozomy, lipozomy citlivé na pH, kationtové lipozomy, imunolipozomy a dlouhodobě cirkulující lipozomy (LCL). [29; 30]

5.4 Micely

Biodegradovatelné polymerní micely jsou jedny z nejslibnějšíchází bází pro cílené a kontrolované dodávání protinádorových léčiv, díky jejich vynikající biokompatibilitě, prodloužené době cirkulace v krevním řečišti, zvýšené akumulaci v nádoru a degradaci in vivo. Jsou to koloidní částice, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 5-150 nm, složené ze samostatných agregátů amfifilních molekul nebo povrchově aktivních látek. Tyto polymerní micely jsou primárně složeny z blokových nebo terminálně modifikovaných kopolymerů s hydrofilními a hydrofobními jednotkami, které se skládají do hydrofobního jádra obklopeného hydrofilním obalem, což je znázorněno na Obrázku 16. Každá jednotka micel může být složena různými způsoby, jako například diblokové kopolymery A-B, trojblokové kopolymery A-B-A a roubované kopolymery.

Hlavní výhodou použití polymerních micel oproti tradičním systémům odvozených od povrchově aktivních látek s nízkou molekulovou hmotností je jejich zvýšená stabilita. Při zvyšující se koncentraci amfifilních molekul způsobené termodynamickými procesy dochází k tvorbě agregátů, které se uvolňují z hydrofobní oblasti do struktur podobných jádru, obklopených skořápkou. Koncentrace, při které dochází k agregaci se nazývá kritická koncentrace micel (CMC). Ve farmacii se velmi využívají povrchově aktivní látky s nízkou molekulovou hmotností, s relativně vysokou CMC v rozmezí 10^{-3} až 10^{-4} mol / l jako pomocné látky pro zvýšení rozpustnosti ve vodě pro léky, které se v ní špatně rozpouštějí. Po podání dochází k zředění a jakmile klesne koncentrace micel pod jejich CMC dochází k ohrožení jejich

stability. Polymerní micely ale nelze klasifikovat jako klasický konjugát polymer-léčivo, protože mezi léčivem a micelárním nosičem zpravidla neexistuje kovalentní vazba. I tak bylo popsáno mnoho polymerních micel, ve kterých se léčivo kovalentně váže na hydrofobní řetězec v jádře micely. [13; 31]



Obrázek 16 – Struktura polymerní micely unimeru složené z hydrofilních (mPEG) a hydrofobních (PCL) bloků [13]

5.5 Biopolymery s rezpozivní aktivitou

Můžeme se s nimi setkat také pod názvem „polymery citlivé na životní prostředí“ nebo „inteligentní polymery“. V současné době je o tento typ polymerů velký zájem, zejména v oblasti dodávání léčiv a to z toho důvodu, že polymery jsou vyvinuty tak, aby byly podobné normálnímu fyziologickému procesu nemocného stavu a zajišťovaly optimální dopravení bioaktivní látky do cílové tkáně, kde poté dojde k řízenému uvolnění léčiva podle fyziologické potřeby. Zahrnují mnoho vlastností, včetně schopnosti reagovat na velké a náhlé změny v prostředí, jako je pH, iontová síla, teplota, působení magnetického a elektrického pole. Reagují prostřednictvím konformačních nebo elektrostatických změn, které se využívají k usnadnění potřebné funkce například při uvolnění léčiva. Fyzikální vlastnosti jako je teplota, ultrazvuk, teplo, magnetické a elektrické pole přímo modulují energetickou hladinu systému

polymer / rozpouštědlo a indukují polymerní reakci při konkrétní kritické energetické úrovni. Chemické podněty jako je pH, redoxní potenciál, iontová síla indukují reakci tak, že mění molekulární interakci mezi polymerem a rozpouštědlem, dochází tedy k úpravě hydrofobní / hydrofilní rovnováhy nebo mezi řetězcí polymerů, což ovlivňuje integritu síťování. Dle použitého stimulu lze biopolymery rozlišit na termo-, pH-, foto-, elektro- a multi-responzivní. Používají se při výrobě hydrogelů a dalších materiálů. [13; 32; 33]

5.6.1 pH-responzivní biopolymery

Největším rozdílem mezi termo- a pH-responzivními biopolymery je skutečnost, že v těle dochází ke změnám hodnot pH na rozdíl od změn teploty. To lze využít k přímé reakci cílené na určitou tkáň nebo buněčný kompartment. Hodnoty pH v různých tkáních a buněčných kompartmentech jsou znázorněny na Tabulce 1. Citlivost pH je velmi využitelným faktorem například při cílené dopravě léčiva do specifického místa v gastrointestinálním traktu (GIT), podél kterého dochází k výrazným změnám pH. pH v žaludku dosahuje kyselých hodnot, kdežto hodnota pH ve střevech může být až mírně zásaditá. Konjugáty léčiva s polymerem jsou většinou známé jako neaktivní látky, tedy proléčiva. Jejich využití je výhodné pro cytostatika, kde dochází k cílení a řízenému uvolňování léčiv přímo do tkáně nádoru, kde je pH nádorového intersticiálního prostoru kvůli hypoxii kyslejší a pohybuje se v rozmezí od 6,5 do 7,2, což je nižší než normální hodnota krve, kde je pH udržováno na hodnotě 7,4. Veškeré polymery reagující na změnu pH ve své struktuře obsahují kyselou (např. karboxylové kyseliny) a bazické (např. amonné soli) skupiny, jež podléhají protonaci či deprotonaci v reakci na změnu prostředí v pH. To vede ke změnám konformace rozpustných polymerů a ke změnám v chování při bobtnání hydrogelů, pokud jsou ionizovatelné skupiny navázány přímo na strukturu polymeru. Velmi využívanými pH-responzivními polymery jsou polykyseliny. Nejvíce využívaná je kyselina poly(akrylová) (PPA) a od ní odvozená kyselina poly(methakrylová) (PMAA). [32; 33]

Tabulka 1 – Hodnoty pH ve vybraných tkáních a kompartmentech [32]

Tkáň / Buněčný kompartment	pH
Krev	7,35 – 7,45
Žaludek	1,0 – 3,0
Duodenum	4,8 – 8,2
Tlusté střevo	7,0 – 7,5
Časný endozom	6,0 – 6,5
Pozdní endozom	5,0 – 6,0
Lysozom	4,5 – 5,0
Golgiho aparát	6,4
Nádor, extracelulární	6,5 – 7,2

5.6.2 Termoresponzivní biopolymery

Teplota je nejčastěji využívaným podnětem v polymerních systémech reagujících na změny v prostředí. Charakteristickým rysem těchto polymerů je přítomnost hydrofobní skupiny, jako jsou methylové, ethylové a propylové skupiny. Jednou z jedinečných vlastností polymerů, které reagují na teplotu je kritická teplota roztoku (HCST), což je teplota, při které se fáze polymeru a roztoku nebo jiného polymeru nepřetržitě mění podle jejich složení. Jestliže má polymerní roztok jednu fázi pod určitou teplotu neboli se stává nerozpustnou při zahřívání, má nižší kritickou teplotu roztoku (LCST). Obecně roste rozpustnost polymeru se zvyšující se teplotou. V případě polymerů s LCST rozpustnost s rostoucí teplotou klesá a v důsledku toho, se hydrogely vyrobené z těchto polymerů zmenšují se zvyšující se teplotou nad LCST. Tento typ bobtnání je známý pod pojmem inverzní teplotní závislost a vyskytuje se pokud převládají hydrofobní interakce. Tyto hydrogely jsou vyrobeny z polymerních řetězců, které obsahují směs hydrofilních a hydrofobních segmentů. Další důležitou vlastností polymerů reagujících na teplotu je intermolekulární interakce ve vodním médiu, která může mít za následek smrštění hydrogelu, agregaci micel nebo fyzické zesítnění. Nejvíce studovaným a nejrozšířenějším termoresponzivním polymerem je poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAAm). Důvodem jeho častého použití je to, že k jeho fázovému přechodu dochází při teplotě blízké teplotě tělesné, což vykazuje fázový přechod při teplotě 32 °C ve vodě a pro dodávání léčiv může být jeho teplota snadno nastavena na vhodnou teplotu po zavedení hydrofilního komonomeru N,N-dimethylakrylamidu. [32; 34]

5.7 Hydrogely

Hydrogely jsou hydrofilní, trojrozměrné sítě, které jsou schopny absorbovat velké množství různých terapeutických látek. Obecně můžou být syntetizovány tak, aby reagovaly a uvolňovaly je v závislosti na mnoha fyziologických aspektech přítomných v těle, jako je teplota, pH a iontová síla. Volné léčivo se z krevního oběhu se vylučuje velmi rychle, díky jejich vysoké míře vylučování. Syntetické hydrogely nabízejí možnost účinného a pohodlného způsobu podávání různých sloučenin. Hydrogely jsou založeny na N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) za účelem prodloužení biologické dostupnosti léčiva a snížení vedlejších účinků aplikace volného léčiva. HPMA-hydrogely mají výhodu, protože po odstranění léčiva nemusí být odstraněny z místa implantace, protože jsou hydrolyticky degradovány na polymerní fragmenty s nižší molekulovou hmotností než je hodnota prahu vylučování ledvinami. Kromě toho má použití HPMA jako základního polymeru výhodu, protože základní produkty biodegradace jsou rozpustné. Biodegradace takových hydrogelů umožňuje selektivní uvolňování zachycených léčiv z polymerní matrice po definovanou dobu podle stupně zesítnění a fyzikálně-chemického charakteru léčiva. To pomáhá při snížení rychlosti eliminace léčiva a udržování koncentrace léčiva v krevním řečišti a tkáních delší dobu. [35]

6. Kapalinová chromatografie

Chromatografie patří do skupiny separačních metod, při které se oddělují neboli separují složky obsažené ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. První je fáze stacionární – nepohyblivá, na jejíž začátek se nanáší vzorek. Druhou je fáze mobilní – pohyblivá, jejímž přestupem přes fázi stacionární dochází k unášení vzorku. Může docházet k zachycování složek na stacionární fázi a tím docházet k jejich zadržování. Obecně platí, že déle se zadržují ty složky, které jsou na stacionární fázi poutány silněji. Postupně se složky od sebe oddělují a na konec stacionární fáze se nejdříve dostanou složky méně zadržované. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a stacionární fází tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Během separace se vzorek (analyt) rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, který stráví ve fázích je závislý na afinitě analytu k fázím. V kapalinové chromatografii dochází k využívání všech možných procesů separace: adsorpce, rozdělování na základě různorodé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt, specifické interakce v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze se lze setkat s těmito typy chromatografie: [36; 37]

- kolonová chromatografie
- tenkovrstvá chromatografie
- papírová chromatografie

V klasické chromatografii se používají skleněné kolony o délce asi 0,5 m a průměru 2 cm, jejichž zakončením je frit a kohout. Jsou plněny zrnitým sorbentem, jehož částice mají velký průměr. Takovým sorbentem může být např. oxid hlinitý. Na horní části vrstvy dochází k dávkování vzorku a poté se přidává mobilní fáze (eluent). Působením gravitace eluent prostupuje kolonou, dochází k oddělování složek vzorku, které ve spodní části opouštějí kolonu. [36]

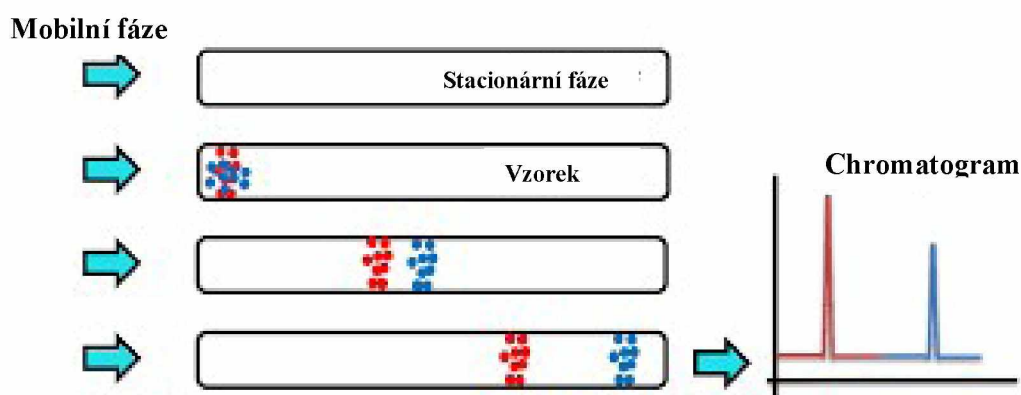
6.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High performance liquid chromatography (HPLC)

V současnosti se jedná o nejčastější uspořádání kapalinové chromatografie. Rozdíl mezi klasickou a vysokoučinnou kapalinovou chromatografií je ten, že se pracuje s užšími kolonami o průměru 2 – 8 mm. K jejich naplnění se využívá materiál s malými částicemi o průměru 3 – 10 μm . K účinné separaci je nutno použít malá zrníčka sorbentu, které kladou prostupující kapalině značný odpor, z tohoto důvodu je nutno použít vysoký tlak. Průtok pohyblivé kapalné

fáze zde neprobíhá účinkem gravitační síly, jak je tomu v klasické kapalinové chromatografii, ale pod tlakem čerpadla. [36; 37]

6.1.1. Princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie

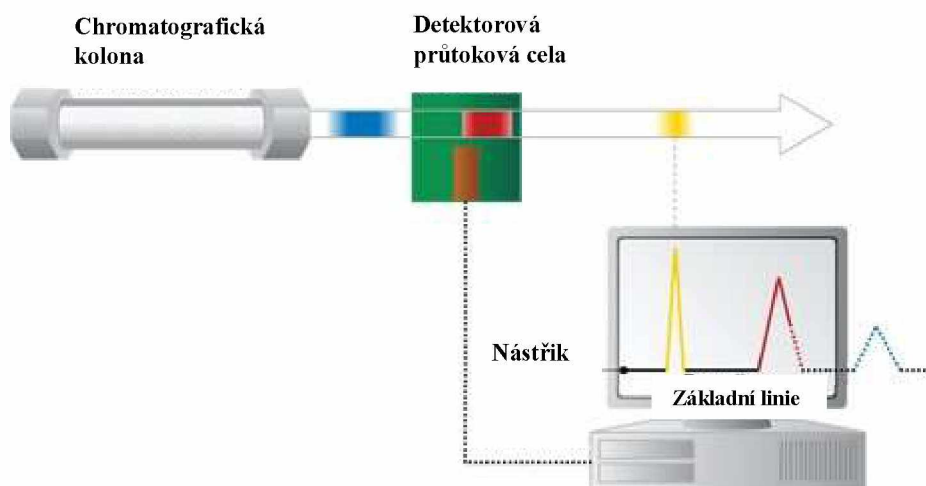
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je fyzikálně-chemická metoda, jejíž princip je založen na distribuci látek mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Vzorek směsi se vstříkne do nepřetržitě tekoucího proudu mobilní fáze a pomocí vysokotlakého čerpadla je unášen do kolony, kterou představuje trubice naplněná vhodným sorbentem. Analyty, které jsou ke stacionární fázi poutány slaběji, jsou eluovány (vymyty) z kolony za kratší dobu. Aby mohlo dojít k distribuci mezi stacionární a mobilní fází, musí existovat fázové rozhraní. Při rozdělování látek poté dochází k opakovanému ustavování rovnováhy dělených látek mezi obě fáze (Obrázek 17). V ideálním případě se chromatografický systém může blížit rovnováze. Distribuce složek mezi pohyblivou a nepohyblivou fází se popisuje distribuční konstantou K_D , která vyjadřuje poměr koncentrace složky ve stacionární fázi / koncentrace složky v mobilní fázi. Čím má distribuční konstanta vyšší hodnotu, tím déle se její molekuly zdržují ve stacionární fázi, tím větší je i jejich retence.



Obrázek 17 - Separace dvou složek v chromatografickém systému [38]

Separace a eluce jednotlivých složek směsi závisí na povaze pohyblivé i nepohyblivé fáze. V případě, že se při eluci použije mobilní fáze, která má konstantní složení (o stejné eluční síle), hovoří se o izokratické eluci. Opakem je gradientová eluce, kdy mobilní fáze má zvyšující se eluční sílu neboli složení mobilní fáze je během vymývání programově řízeno. Izokratická eluce se hodí pro látky, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti se podobají. Gradientová eluce pro látky, jejichž vlastnosti se výrazně liší. Po průchodu kolonou dochází k detekci analytu v detektoru, kdy se získá signál, který se převádí do formy gausovských křivek neboli piků,

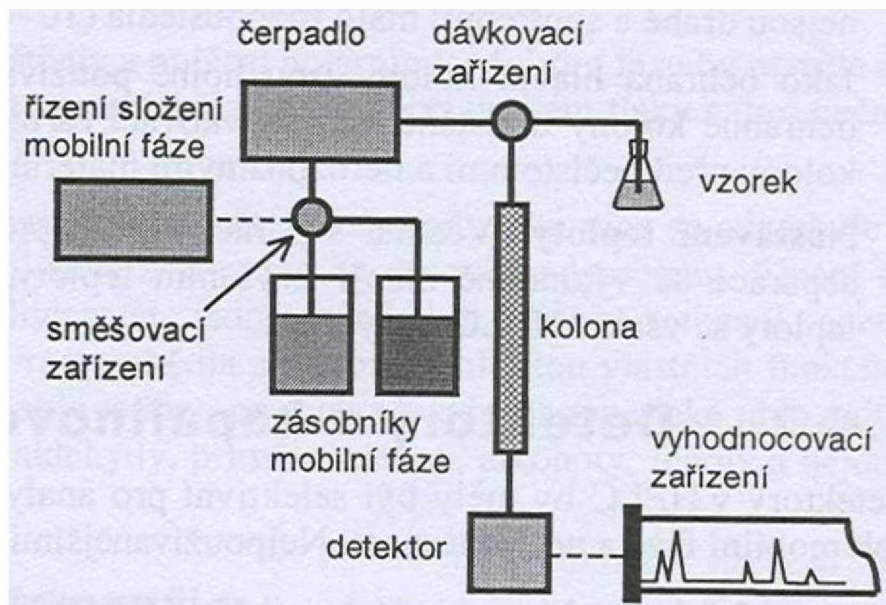
kteře se zobrazují na chromatogramu (Obrázek 18). V ideálním případě každý pík představuje odezvu detektoru pro jinou sloučeninu. [38]



Obrázek 18 - Zpracování signálu [39]

6.1.2. Instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Základní instrumentace HPLC je znázorněna na Obrázku 19. K čerpání kapaliny do kolony dochází pomocí membránových nebo pístových čerpadel. Rozdíl v čerpadlech je ten, že membránové čerpadlo obsahuje prostor s pístem, který je naplněn hydraulickou pracovní kapalinou. Prostor je od pracovního prostoru pro mobilní fázi oddělen membránou. Směšovací zařízení souvisí se složením mobilní fáze a poté s elucí, jak již bylo zmíněno dříve. Aby bylo možné provést naprogramovanou (gradientovou) eluci, kapalinový chromatograf musí obsahovat zásobníky více kapalin. Dávkovací zařízení se dříve využívalo ve formě injekční stříkačky, což neslo určité nevýhody z hlediska těsnosti nebo vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Tuto nevýhodu odstranilo dávkování obtokovým dávkovacím kohoutem. Kolony se používají převážně náplňové, které mohou být zhotoveny z borosilikátového skla pro nižší tlaky nebo z nerezové oceli pro vyšší tlaky kolem 50 MPa. Délka kolony je poměrně krátká, nachází se v rozmezí 5-30 cm. Poslední částí je detektor, pro zachycení signálu. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční. [36; 37; 38; 39]



Obrázek 19 - Schéma HPLC [36]

7. Chromatografická charakterizace vybraných polymerních nosičů léčiv

Jelikož se jedná o velmi rozsáhlou tematiku, která svým rozsahem přesahuje meze této práce, je tato část práce zaměřena na charakterizaci vybraných hydrogelů pomocí kapalinové chromatografie.

7.1. Příprava poly (N-isopropylakrylamidu-ko-N,N'-methylen-bis-akrylamidu)

Jednou z možností je příprava poly(N-isopropylakrylamidu-ko-N,N'-methylen-bis-akrylamidu), přičemž složení kopolymeru při vysoké přeměně (>95 %) je možné stanovit analýzou vyluhovací vody po polymeraci nepřímo pomocí kapalinové chromatografie. Hydrogely na bázi poly(N-isopropylakrylamidu) (PNIPAAm) jsou řazeny do skupiny „inteligentních polymerů“ zejména mezi termoresponzivní polymery. PNIPAAm je rozpustný ve vodě, a proto musí být pro výrobu hydrogelů zesítován. K zesílení se využívá N, N'-methylen-bis-akrylamid (MBA). Zesíťováním pak dojde ke zlepšení mechanických a elastických vlastností hydrogelu. Bylo zkoumáno reologické chování roztoků homopolymeru PNIPAAm ve vodě při separaci fází a bylo prokázáno, že dochází k tvorbě fyzické sítě. V této studii byl PNIPAAm propojen s MBA v rozmezí 1,10 – 9,10 %.

Materiály:

N-isopropylakrylamid, N,N'-methylen-bis-akrylamid, amonumpersulfát (APS), N,N,N',N'-tetramethylenethandiamin (TEMED), acetonitril, voda

Příprava hydrogelů:

Hydrogely P(NIPAAm-ko-MBA) byly připraveny redoxní radikálovou polymerací ve vodě. Do 5 ml vodného roztoku NIPAAm (1,0 M zásobní roztok) bylo přidáno potřebné množství MBA (0,1 M zásobní roztok). Množství APS a TEMED bylo 2 % hm. na hmotnost NIPAAm. Polymerace probíhala v ledové lázni půl hodiny a poté se nechala 72 hodin stát při laboratorní teplotě. Po ukončení polymerace byly gely promývány deionizovanou vodou pro odstranění homopolymeru a všech nezreagovaných složek. Vyluhovaná voda byla nashromážděna a jejím testováním na zbytkové monomery byla potvrzena čistota gelu pomocí UV-VIS spektroskopie a na PNIPAAm homopolymer zahřátím vyluhovací vody na 50 °C. Další řada gelů byla po polymeraci podrobena Soxhletově extrakci vodou. Nashromážděná

vyluhovaná voda a extrakty byly analyzovány na obsah NIPAAm a MBA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pomocí HPLC se stanovilo skutečné složení kopolymerů gelů.

Charakterizace pomocí HPLC:

Byl použit vysoce účinný kapalinový chromatograf Hewlett Packard 1090 s UV detektorem s nastavenou vlnovou délkou 220 nm. Kolona BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm, s velikostí částic 3 μm). Mobilní fáze pro separaci NIPAAm a MBA byl 5 obj. % acetonitril ve vodě. Vyluhovací voda byla zředěna mobilní fází stejného objemu. Byla použita izokratická eluce s průtokem 0,5 ml / min. U každého vzorku byly provedeny tři měření. Kalibrační graf byl připraven za použití sériových ředění 10, 30, 50, 70 a 100 % g / ml.

Výsledky HPLC:

Retenční časy pro MBA a NIPAAm byly $5,54 \pm 0,01$ a $9,92 \pm 0,01$ minut pro použitý chromatografický systém. APS a TEMED nebyly při nastavené vlnové délce 220 nm detekovány. Detekční limity pro NIPAAm a MBA byly zjištěny podílem signálu k šumu 3:1 a vypočteny byly na 160 a 332 ng / ml. Selektivita separace byla prokázána slepým pokusem a v retenčních časech požadovaných solutů nebyly detekovány žádné signály. Při zahřívání vyluhovací vody na 50 °C, tedy nad teplotu fázového přechodu nebylo možné vizuálně detekovat žádné srážení homopolymeru PNIPAAm. [40]

7.2. Analýza nezreagovaných monomerů při syntéze poly (N-isopropylmethakrylamidu)

Možnost využití HPLC se nabízí i k analýze nezreagovaných monomerů při syntéze poly(N-isopropylmethakrylamidu). Zde je ale charakterizace (p(NiPMAM)) provedena pomocí infračervené Fourierovy spektroskopie (FTIR) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Pro stanovení zbytkového množství nezreagovaného NiPMAM monomeru ve vzorcích po syntéze hydrogelu p(NiPMAM) byl použit přístroj HPLC Agilent 1100 Series s detektorem diodového pole 1200 Series. Na detektoru byla nastavena vlnová délka 212 nm. Používaná kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μm) byla nastavena na teplotu 25 °C. Jako mobilní fáze byl zvolen methanol a průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml / min. Vstříkovaný objem vzorku 10 μl . Byla připravena řada standartních roztoků se známými koncentracemi NiPMAM, které se filtrovaly přes 0,45 μm celulósový membránový filtr a byly analyzovány metodou HPLC. [41]

7.3. Kombinace systémů pro dodávání léčiv

Dále se kapalinová chromatografie využívá při kombinacích systémů pro dodávání léčiv (CDDS). Se zvyšujícím se počtem kombinací, které se podávají se obtížně charakterizují jako celek. V podstatě se jedná o dva horizonty pro kombinované systémy pro dodávání léčiv, které jsou nezávislé na řízeném uvolňování aktivních farmaceutických složek (API) a umožňují současně podávat malá i makromolekulární léčiva. Například při leukemii, revmatoidní artritidě, anémii, roztroušené skleróze je vyžadováno právě kombinované podávání, kdy se podává dávka malé molekuly a proteinového léčiva, jejichž výsledkem je zvýšení terapeutického účinku. Jednoduché jednosložkové systémy lze analyzovat pomocí spektrofotometrie, u složitějších vícesložkových systémů se k analýze využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Jako materiál pro CDDS byl použit poly(ethylen glykol), protože vykazuje nízkou imunogenicitu a vysokou biokompatibilitu. Konkrétně byl použit poly(ethylen glykol) dimethakrylátový (PEGDMA) monomer. Polymerace dimethakrylátových skupin byla zajištěna fotoinicovaným zesítením s 2,2-dimethoxy-2-fenylacetone (DMPA), který je zdrojem volných radikálů. Třetím činidlem byl 1-vinyl-2-pyrrolidinon (VPY), který se využívá ke stabilizaci a jako mezifázové rozpouštědlo pro DMPA. Po zesítení byly hydrogelové tablety umístěny do nanášecích roztoků s vysokou koncentrací API a naloženy 72 hodin. Byly použity tři modelové API – prasečí insulin (PI), fluorescein isothiokyanát hovězí sérový albumin (FBSA) a prednison (PSE), u kterých bylo sledováno jejich uvolňování z PEGDMA.

Materiály:

PEGDMA, fluorescein isothiokyanát hovězí sérový albumin (FBSA), 1-vinyl-2-pyrrolidinon (VPY), 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenon (DMPA), PSE

Zařízení HPLC:

Byl použit vysoce účinný kapalinový chromatografický systém LaChrom Elite® s detektorem s diodovým polem. Stacionární fáze byla Luna 5 µm C18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, uzavřená v termostatu. Byla ekvilibrována při 25 °C. Voda, acetonitril, isopropanol a kyselina trifluoroctová byly smíchány do tří zásobníků s rozpouštědlem. Rozpouštědlo A představovalo vodu, rozpouštědlo B pouze acetonitril a rozpouštědlo C směs isopropanolu a acetonitrilu 2:1. Kyselina trifluoroctová (TFA) byla přidána do rozpouštědla A v 0,1 % (obj./obj.) a do rozpouštědla B v 0,08 % (obj./obj.). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml / min, kdy se

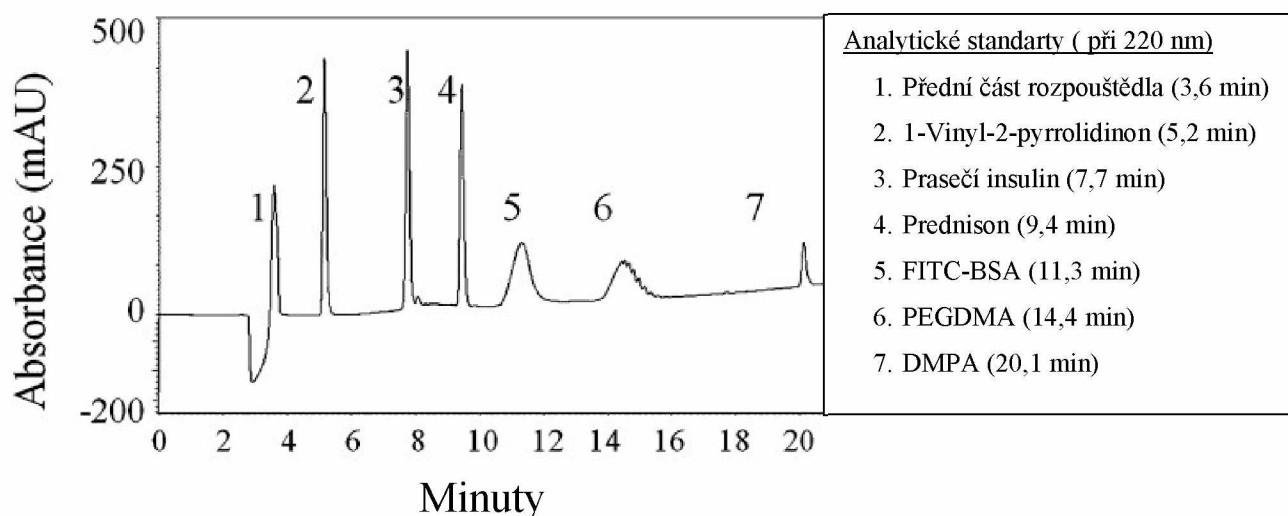
začínalo na 70 % rozpouštědla A a 30 % rozpouštědla B až na 90 % rozpouštědla B a 10 % rozpouštědla A od v časovém intervalu od 0 do 21 minut. Od 21,1 minuty do 30 byla použita 100 % fáze C, která sloužila pro vymytí zbytkového materiálu ulpívajícího na koloně s malými póry. V poslední fázi byla kolona ještě jednou ekvilibrována na výchozí složení 70 % rozpouštědla A a 30 % rozpouštědla B. Ekvilibrace probíhala v časovém intervalu od 30,1 do 35 minut.

Výroba hydrogelových tablet:

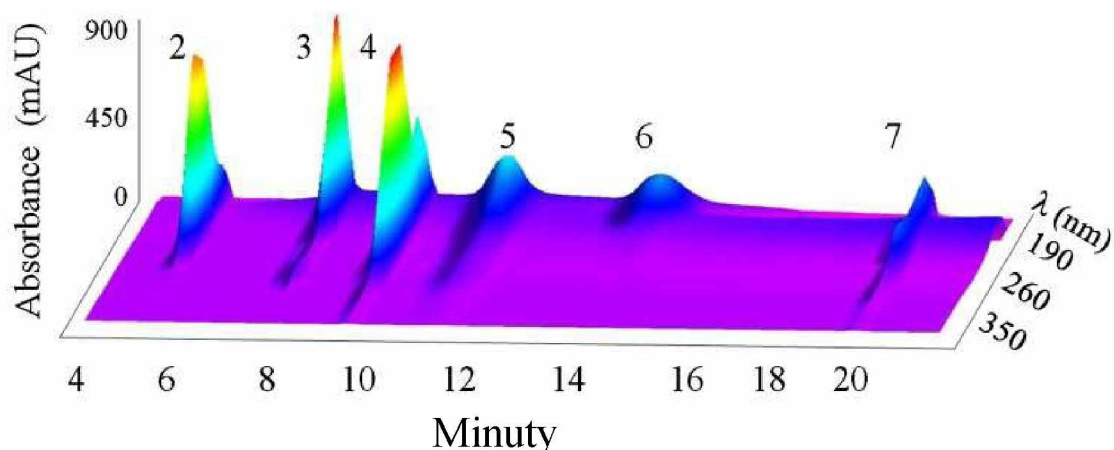
Tablety PEGDMA byly připraveny napipetováním 200 μ l roztoku, který obsahoval 50% PEGDMA, 42 % PBS a 8 % fotoiniciátoru. Roztok byl zesíťován po dobu 5 minut při 99 J a 365 nm v UV-boxu a poté uložen na 1 hodinu do vakuové pece, kde byla teplota 50 °C. Zde došlo ke vzniku hydrogelových tablet, které byly podrobeny dehydrataci a umístěny do plnicího pufru. Po 96 hodinách plnění při 23 °C byly tablety promyty PBS a testovány na přítomnost API. Po opláchnutí byly tablety umístěny do 3 ml elučního pufru v 5 ml zkumavkách a protřepány při 37 °C. Každých 72 hodin byl ze zkumavky odstraněn objem kapaliny, který byl analyzován pomocí HPLC. Odstraněný objem byl nahrazen 3 ml PBS.

Výsledky:

Charakterizace kinetiky uvolňování není jednoduchá, dochází k interakcím mezi hydrogelovými složkami a API. Rozdělovací koeficient oktanol / voda měl $7,8 \times 10^8$ násobný rozsah rozdělení. Oddělení PEGDMA od DMPA bylo snadno dosažitelné mobilní fází při izokratické eluci voda / acetonitril. Izolace FBSA od VPY byla složitější. Retenční časy u všech přítomných složek byly v souladu s retenčními časy standartů jednotlivých složek. Pomocí HPLC bylo kvantifikováno celkem šest složek. [42]



Obrázek 20 - Chromatograf všech složek při $\lambda = 220$ nm s retenčními časy [42]



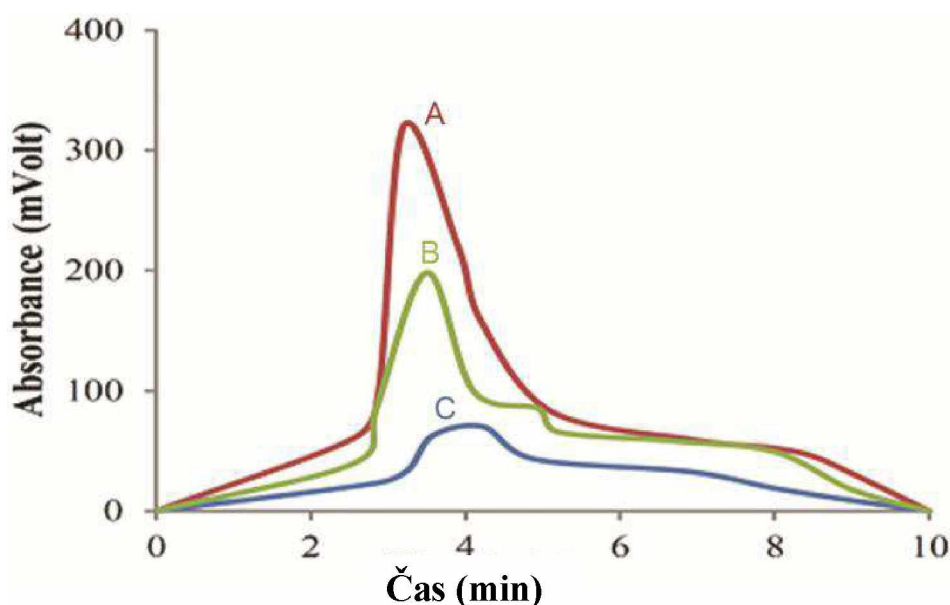
Obrázek 21 - Trojrozměrný graf API a hydrogelových složek napříč UV vlnovými délkami [42]

7.4. Dodávání inzulínu

Charakterizace pomocí kapalinové chromatografie našla též využití při dodávání inzulínu. Diabetes mellitus je onemocnění, které je charakterizováno chronickou hyperglykemií a jinými metabolickými abnormalitami. Diabetes mellitus je výsledkem autoimunitní destrukce β -buněk, které produkují inzulín ve slinivce břišní. Obvyklé podávání inzulínu, které měří koncentraci glukózy a dodávání inzulínu jsou dva oddělené procesy a označují se jako systém inzulínu s otevřenou smyčkou. Nový systém se označuje dodávací systém inzulínu s uzavřenou smyčkou, kde jsou oba dva procesy spojeny a tím je snižováno riziko hyperglykémie. Jako

polymerní hydrogel, který funguje jako nosič léčiv byla použita karboxymethylcelulóza. Je to lineární polymer β -D-glukózy, kde dochází k náhradě některých hydroxylových skupin celulózy karboxymethylovými. Byl vybrán kvůli jeho nízké toxicitě, biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti. Hydrogely CMC-PAAm jako systémy dodávání léčiv jsou založeny na glukózooxidáze, která hraje roli jako enzym specifický pro glukózu. Katalyzuje glukózu na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. Tím, že se zvýší koncentrace glukózy ve fosfátovém pufru (PBS) se vytvoří více peroxidu vodíku a tím dojde k degradaci hydrogelu a uvolnění inzulinu. Rychlost degradace a uvolnění inzulinu se zvyšuje se zvyšující se koncentrací glukózy. Tím, že se inzulin uvolňoval z hydrogelu, který byl podobný umělé slinivce břišní možno zajistit řízené uvolňování. CMC-PAAm byly syntetizovány polymerací volných radikálů. Imobilizace a naplnění glukózooxidázy (GOx) a inzulinu bylo provedeno metodou bobtnání.

K charakterizaci nabitých hydrogelů byl využit Knauer 1100 HPLC analyzátor, kolona C18 25 x 4,0 mm, jako MF byl zvolen methanol a rychlost průtoku nastavena na 1,0 ml / min. Vstříkovaný objem vzorku byl 20 ul. Chromatografický systém byl vybaven UV-detektorem Camspec M 350, nastavená vlnová délka byla 280 nm. Výsledkem bylo, že množství inzulinu v zaváděcím médiu bylo 15 % počáteční hodnoty. Z toho vyplynulo, že 85 % inzulinu bylo vloženo do hydrogelů. [43]



Obrázek 22 - Chromatogramy (A) inzulinu v zaváděcím médiu před naplněním; (B) kontrola inzulinu 4,4 (v / v%); a (C) insulin v zaváděcím médiu po naplnění [43]

7.6. Hydrogely polyakrylamid-methylcelulózy

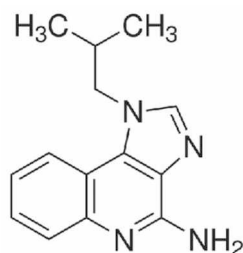
Další možnost, kdy se můžeme setkat s hydrogely v souvislosti s jejich analýzou pomocí HPLC je u hydrogelů polyakrylamid-methylcelulózy. Tyto hydrogely obsahují extrakt z *Aloe barbadensis* neboli *Aloe vera* a používají se v obvazech na ošetření chronických ran kůže. Chronické rány poškozují kožní bariéru a nehojí se v přijatelném časovém intervalu. Tím zabraňují úplnému obnovení anatomické a funkční integrity tkáně, což má za následek zvyšující se riziko infekcí a apoptózy. Hydrogely jakožto známé nosiče léčiv zde mají potenciál v pokrývání ran a popálenin na kůži. Zlepšují dobu hojení, snižují riziko infekce, podporují regeneraci kůže a snižují bolest. V tomto případě se jedná o již zmíněný polyakrylamid-ko-methylcelulóзовý hydrogel obsahující *Aloe vera*, který slouží ke zlepšení léčebných vlastností hydrogelu. Extrakt byl připraven z lyofylizované *Aloe vera* pomocí methanolické extrakce, charakterizován HPLC a začleněn do hydrogelu. Hydrogely celkově poté byly charakterizovány opět infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací, skenovací elektronovou mikroskopií a tepelným profilováním pomocí termogravimetrické analýzy.

Analýza extraktu z *Aloe barbadensis* byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem (HPLC-DAD-EM). Z extraktu byl identifikován Aloin porovnáním vzorků s aloinovým standardem (přírodní směs diastereomerů aloin A – barbaloin, aloin B – isobarbaloin). Aloin je jedna z nejdůležitějších bioaktivních sloučenin v rostlině *Aloe barbadensis*. Používaný byl detektor s diodovým polem (DAD), automatický dávkovač a kvartérní čerpadlo spojené s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem. Kolona Zorbax Eclipse XDB-C8 s nastaveným průtokem 0,4 ml / min a vstřikovaným objemem 5 μ l. Maximální tlak byl 400 bar. Mobilní fázi představovala voda okyselená kyselinou mravenčí (rozpouštědlo A) a acetonitril (rozpouštědlo B). Eluce rozpouštědel proběhla následovně: 0 – 7 min 10 % B, 7 – 8 min 10 – 22 % B, 8 – 14 min 22 % B, 14 – 18 min 22 – 50 % B, 18 – 33 min 50 – 95 % B. Nastavená vlnová délka byla v rozmezí od 210 nm do 400 nm. Detekce proběhla při vlnových délkách 254 nm, 280 nm, 315 nm, 330 nm a 350 nm. Ve výsledcích bylo zjištěno, že extrakt *Aloe barbadensis* (EA) vykazoval přítomnost Aloinu A i B. Z tohoto zjištění poté byly hydrogely polyakrylamid-ko-methylcelulózy připraveny v koncentraci 1 a 2 % a byly dále charakterizovány pomocí FTIR. [44]

7.7. Hydrogely na bázi polymer-rybí olej

Poslední příkladem v této kapitole je využití HPLC pro vyhodnocení obsahu léčiva imiquimod. Je známo, že hydrogely jsou velmi využívaným systémem při dodávání léčiv pro transdermální aplikace. Zvyšují hydrataci stratum corneum, mají chladící účinek, dobře se roztírají, jsou omývatelné vodou. Ovšem pokud se jedná o dodání léku přes stratum corneum prochází špatně. K průniku léčiva uvolněním z hydrogelů tak napomáhají jedlé oleje jako jsou palmový, olivový nebo rybí olej. Jedná se o polotuhou lékovou formu, připravenou smícháním dvou koloidních oleogelů a vodného gelu pro lokální a transdermální aplikaci léčiv. Oleogely, které jsou olejové povahy jsou po aplikaci špatně odstranitelné a z toho důvodu byla zavedena alternativa ve formě gelu, která má vlastnosti oleogelů i vodných gelů. Tyto gely jsou kompatibilní s mnoha látkami, které zlepšují vlastnosti účinků a pronikání léčiv kůží. V této studii se jedná o polymer-rybí olej, který vznikl z rybiho oleje, přírodního polymeru alginátu sodného a syntetického polymeru hydroxypropylmethylcelulózy. Rybí olej jako olejová fáze z toho důvodu, že obsahuje omega-3 mastné kyseliny (především eikosapentanové kyseliny a dokosahexanové kyseliny), které zlepšují průnik pokožkou a mají terapeutické účinky při zánětech kůže. Jako modelový lék byl vybrán lék s chinolonovou strukturou Imiquimod (Obrázek 23). Používá se proti kožnímu onemocnění (aktinická keratóza, neoplázie, parianální bradavice,...). Stabilita mastných kyselin byla stanovena plynovou chromatografií a obsah léčiva chromatografií kapalinovou.

K analýze byl použit chromatografický systém RP-HPLC Shimadzu LC-20AT s automatickým dávkovačem SIL-20A a detektorem SPD-M20A DAD. Kolona Japan Alt a Altima C8 (4,6 x 150 mm; 5 μ m). Mobilní fáze pro analýzu léčiva byla složena z acetonitrilu, vody a kyseliny fosforečné v poměru 250 : 750 : 10. Byla upravena na pH 2,7. Nastavený průtok byl 1,5 ml / min, vstřikovaný objem 20 μ l. Imiquimod byl sledován při vlnové délce 254 nm a jeho obsah byl vypočten z kalibrační křivky. [45]



Obrázek 23 - Struktura Imiquimodu [45]

8. Chromatografické módy používané v analýze polymerů

To jakým způsobem bude probíhat mechanismus retence a separace jednotlivých složek určuje charakter použité stacionární a mobilní fáze, jejichž složky vzorku mezi sebou interagují. Podle principu distribuce látek mezi fázemi a podle interakcí lze rozlišit čtyři základní typy neboli módy, které se v kapalinové chromatografii využívají.

8.1. Chromatografie v systémech s normálními fázemi

Systém s normálními fázemi (NP) je nejstarším využívaným typem. Je založen na interakcích polárního charakteru mezi separovanými látkami, polárními stacionárními fázemi a méně polárními mobilními fázemi. Jako náplně kolon bývají využity buď anorganické adsorbenty (nejčastěji silikagel nebo oxid hlinitý) nebo polární fáze, které jsou navázány na povrch anorganického adsorbentu. Jedná se o aminopropylové, diolové, hydroxylové a další. Mobilní fáze je nejčastěji využívána ve formě dvousložkové směsi organických rozpouštědel, které se liší svojí polaritou (propanol, tetrahydrofuran, acetonitril a další). Mobilní fáze ovlivňuje velikost retence i selektivitu separace. K eluci látek dochází v pořadí rostoucích polarit, tedy retence roste s větším počtem a polaritou funkčních skupin.

NPC je využitelná převážně pro separace neiontových a středně nebo málo polárních, které se liší počtem a polohou polárních funkčních skupin, zejména geometrických a polohových izomerů, které podléhají různě silným interakcím s adsorpčními centry na povrchu adsorbentu. Nepoužívají se k dělení látek, které se liší pouze velikostí uhlíkového řetězce. Na různých typech stacionárních fází, vykazují selektivní interakce. Látky slabě zásadité povahy jsou déle zadržovány na silikagelu a látky, které mají charakter slabě kyselý na chemicky vázaných aminových fázích. Výhodou NPC je relativně nízký pracovní tlak na koloně, vzhledem k nižší viskozitě organických rozpouštědel (mobilních fázích). Nevýhodou je vysoká cena organických rozpouštědel a to, že retence závisí i na nepatrných koncentracích vody v organických rozpouštědlech. [46; 47; 48]

8.2. Chromatografie v systémech s obrácenými (převrácenými) fázemi

Tento mód je první volbou v současné praxi HPLC, protože umožňuje separace látek, které se liší velikostí hydrofobních částí molekul např. členů homoogických nebo oligomerních

řad. Dále pro vzorky, které obsahují nepolární, středně nebo silně a někdy i iontové látky, které se liší počtem a charakterem svých substituentů. Princip separace je založen na nepolárních interakcích mezi analyzovanými látkami, tedy mezi mobilní a stacionární fází. Méně polární látky a látky, které obsahují větší molekuly se zadržují silněji. Retence je rostoucí s délkou a počtem alkylů, aromatických jader, halogenů v molekulách a klesající průběh vykazuje s počtem a polaritou dalších substituentů (např. -NH₂, -OH, -CHO) a násobných vazeb. Stacionární fáze jsou nepolárního či málo polárního charakteru, většinou chemicky vázané na silikagelu s vázanými oktadecylými, oktylovými či jinými alkylovými nebo arylovými skupinami, méně často mírně polárními nitrilovými skupinami. Mobilní fáze vykazují vždy větší polaritu než fáze stacionární a jsou složeny nejčastěji z vody a jednoho či více polárních rozpouštědel, které jsou rozpustné ve vodě. Nejčastěji se jedná o methanol, acetonitril či tetrahydrofuran. Eluce látek je ovlivněna klesající polaritou, která ji urychluje a rostoucí koncentrací rozpouštědla, jež ovlivňuje i selektivitu separace. V RPC se nachází možnost separovat i slabé organické látky bazické či kyselé povahy. Retence je zvyšována upravením pH mobilní fáze přidávkem pufru tak, aby se potlačila jejich disociace. U silikagelu tuto možnost nelze využít, protože se při vyšších pH rozpouští a životnost chromatografických kolon je snižována. V tomto případě lze využít stabilnější fáze na bázi oxidu zirkoničitého nebo titaničitého, lipofilní organické látky nebo pórovitý grafický uhlík. [47; 48]

8.3. Iontově-párová chromatografie

V systémech s obrácenými fázemi lze někdy separovat i zcela ionizované látky, např. silné kyseliny a báze. Ty jsou přidávány do vodných organických mobilních fází o koncentraci v rozmezí 0,0001 – 0,1 mol/l. Iontově-párová činidla jsou kationické nebo anionické tenzidy s molekulami, které se skládají ze dvou částí. První částí je velká uhlovodíková část a druhou částí je iontová skupina nesoucí opačný náboj než analyzovaná látka. Iontová skupina tvoří s ionty vzorku neutrální iontový pár, který se v systémech s obrácenými fázemi zadržují silněji než původní ionty. Bazické látky se separují především v mobilních fázích, které obsahují soli hexan- až oktansulfonových kyselin. Kyselé látky v mobilních fázích obsahujících přídavek tetrabutylamoniových či hexadecyltrimethylamoniových solí. Retence látek je zvyšována rostoucí lipofilitou iontově-párového činidla a s rostoucí koncentrací činidla v mobilní fázi až do dosažení saturace povrchu stacionární fáze, na které činidlo pevně adsorbuje (v MF obsahujících 0,01 – 0,1 mol/l iontově-párového činidla). [47; 48]

8.4. Iontově-výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie je založena na elektrostatických interakcích mezi separovanými ionty a stacionárními fázemi se skupinami nesoucími opačné náboje, tedy s ionexy. K separaci kationtů (protonovaných bazických látek) se používají silné katexy se záporně nabitými sulfonovými skupinami nebo slabé katexy s karboxylovými skupinami. Separace aniontů slabých či silných kyselin se provádí na silných anexech s kvarterními amoniiovými skupinami nebo na slabých anexech s terciárními nebo sekundárními aminoskupinami např. triethylaminovými. Silné ionexy jsou ionizovány v celé oblasti pH, slabé katexy pouze v oblasti alkalické a slabé anexy v oblasti kyselé. Retence látek se zvyšuje s rostoucím celkovým počtem iontově-výměnných skupin v jednotce objemu ionexu. Mobilní fáze musí obsahovat vhodné protionty (soli, pufrů, kyseliny nebo báze), protože dochází k soutěžení se separovanými látkami o interakce s opačně nabitými funkčními skupinami ionexů. Retence iontových látek se snižuje s rostoucí koncentrací protiontů v MF. Mobilní fáze bývají často obohaceny o organické rozpouštědlo a pracuje se za zvýšené teploty, protože v jeho přítomnosti a za vyšší teploty retenci snižuje a mění selektivitu separovaných organických látek. Retenci dále ovlivňuje pH mobilní fáze, kdy při pH, které potlačuje ionizaci se retence zvyšuje. Zvyšuje se i s počtem nábojů a hustotou na separovaných iontech. Využití nachází především pro separaci malých anorganických iontů a k dělení iontových látek s malými molekulami k separaci biopolymerů (např. peptidů, proteinů, nukleových kyselin). [47; 48]

Závěr

Bakalářská práce je zaměřena na polymerní materiály, které se využívají v medicíně a farmacii. Obecně mají polymery obrovské zastoupení v medicíně, kde nahrazují různé kovy a slitiny, díky jejich univerzálnosti a především biokompatibilitě. Využívají se jako různé implantáty, kontaktní čočky, materiály pro šití a krytí ran a další využití. V podstatě v medicíně se s nimi setkáme prakticky všude.

V první části této práce jde především o polymerní materiály, které se používají jako nosiče léčiv. Jako nosiče léčiv mohou být využity jak přírodní, tak syntetické polymery. Syntetické polymery mají oproti přírodním výhodu v tom, že je lze připravit s předvídatelnějšími vlastnostmi a přizpůsobením se konkrétní aplikaci. Polymerní nosiče léčiv se oproti nízkomolekulárním léčivům vyznačují zlepšenými farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi. Velmi významnou roli dnes hrají při léčbě nádorových onemocnění, kdy odezvou na léčbu jsou velmi silné nežádoucí účinky, protože je velmi obtížné selektivně zasáhnout pouze nádorovou tkáň. Nízkomolekulární léčivo se naváže na polymer za vzniku konjugátu, který je stabilnější v krevním řečišti. K uvolnění účinného léčiva dojde v nádorové tkáni, tím není zasažena okolní tkáň a polymerní nosič se po uvolnění léčiva vyloučí. V dnešní době se můžeme setkat s celou řadou nosičů léčiv. Může se jednat například i o nanočástice, dendrimery, lipozomy, micely, hydrogely a spoustou dalších.

Další část pojednává o charakterizaci hydrogelů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. U hydrogelů je spousta možností, co pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie charakterizovat. Může se jednat o charakterizaci buď přímo hydrogelů jako celku, která se využívá například u N-isopropylakrylamidu-ko-N,N'-methylen-bis-akrylamidu. Též se při přípravě hydrogelů mohou analyzovat pouze jejich nezreagované monomery. U hydrogelů lze HPLC využít i při dodávání inzulinu a u hydrogelů na bázi polymer-oleogel. Tyto hydrogely se využívají pro transdermální podávání léčiv a pomocí HPLC lze analyzovat množství léčiva, které je navázáno v hydrogelu, ze kterého se uvolňuje. K uvolnění napomáhají právě oleogely, což jsou jedlé oleje.

Literatura

- [1] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2011. ISBN isbn978-80-7080-788-0.
- [2] *Ullmann's Polymers and Plastics - Products and Processes, 4 Volume Set* [online]. Weinheim, Germany: John Wiley & Sons, 2016 [cit. 2020-07-09]. ISBN 978-1-5231-1122-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpUPPPPVS1/cid:kt011CABI6/viewerType:khtml//root_slug:ullmanns-polymers-plastics/url_slug:basic-concepts-molecular?b-q=basic%20distribution%20of%20polymers&sort_on=default&b-subscription=true&b-group-by=true&page=1&b-sort-on=default&b-content-type=references&include_synonyms=no&view=collapsed&zoom=1&fbclid=IwAR28YA0SzVQSnm-OGBC_yhcEvv9g_NNA3dVDd-K_aQ5kj68BLwswiwt6Qrl&q=basic%20distribution%20of%20polymers
- [3] NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007, **32**(8-9), 762-798. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.
- [4] PRAJAPATI, Shiv Kumar, Ankit JAIN, Aakanchha JAIN a Sourabh JAIN. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. *European Polymer Journal*. 2019, **120**, 109191.
- [5] VROMAN, Isabelle a Lan TIGHZERT. Biodegradable Polymers. *Materials*. 2009, **2**(2), 307-344.
- [6] LYU, SuPing a Darrel UNTEREKER. Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. *Int J Mol Sci*. 2009, **10**(9), 4033-4065.
- [7] WOODARD, Lindsay N. a Melissa A. GRUNLAN. Hydrolytic Degradation and Erosion of Polyester Biomaterials. *ACS Macro Letters*. 2018, **7**(8), 976-982.
- [8] GÖPFERICH, Achim. Mechanism of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 1996, **17**(2), 103-114.
- [9] HRUBÝ, Martin, Jan KUČKA, Ján KOZEMPEL a Ondřej LEBEDA. Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2006, **100**, 10-16.
- [1] PECHAR, Michal a Karel ULBRICH. Polymerní terapeutika u nás a ve světě. *Chemické listy*. 2009, **103**, 3-10.
- [1] TORCHILIN, Vladimir P. Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000, **11**(2), 81-91.
- [1] ELVIRA, C., A. GALLARDO, J. ROMAN a A. CIFUENTES. Covalent Polymer-Drug Conjugates. *Molecules*. 2005, **10**(1), 114-125.
- [1] LARSON, Nate a Hamidreza GHANDEHARI. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*. 2012, **24**(5), 840-853.

- [1 SRIVASTAVA, A., T. YADAV, S. SHARMA, A. NAYAK, A. KUMARI a N. MISHRA. Polymers in Drug
4] Delivery. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2016, **4**, 69-84.
- [1 RINGSDORF, Helmut. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of*
5] *Polymer Science: Polymer Symposia*. 1975, **51**(1), 135-153.
- [1 LLOYD, John B. a Ruth DUNCAN. Synthetic polymers as targetable carries for drugs. *Pure and*
6] *Applied Chemistry*. 1984, **56**(10), 1301-1304.
- [1 GAVASANE, Amit Jagannath a Harshal Ashok PAWAR. Synthetic Biodegradable Polymers Used in
7] Controlled Drug Delivery System: An Overview. *Clin Pharmacol Biopharm*. **3**(2).
- [1 JANA, S., A. GANDHI, K. K. SEN a Sk. BASU. Natural Polymers and their Application in Drug
8] Delivery and Biomedical Field. *Journal of PharmaSciTech*. 2011, **1**(1), 16-27.
- [1 TIWARI, Priyanka, Preeti PANTHARI, Deepshikha P. KATARE a Harsha KHARKWAL. Natural
9] Polymers in Drug Delivery. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014, **3**(9),
1395-1409.
- [2 YANG, Wan-Wan a Erik PIERSTORFF. Reservoir-Based Polymer Drug Delivery Systems. *Journal of*
0] *Laboratory Automation*. 2012, **17**(1), 50-58.
- [2 PILLAI, Omathanu a Ramesh PANCHAGNULA. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in*
1] *Chemical Biology*. 2001, **5**, 447-451.
- [2 KOPEČEK, Jindřich. Polymer–drug conjugates: Origins, progress to date and future directions.
2] *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, **65**, 49-59.
- [2 KADAJJI, Veeran Gowda a Guru V. BETAGERI. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical
3] Applications. *Polymers*. 2011, **3**, 1972-2009.
- [2 JAIN, Jay Prakash, Sweta MODI, A. J. DOMB a Neeraj KUMAR. Role of polyanhydrides as localized
4] drug carriers. *Journal of Controlled Release*. 2005, **103**(3), 541-563.
- [2 JAWAHAR, Natarajan a SN MEYYANATHAN. *Polymeric nanoparticles for drug delivery and*
5] *targeting: A comprehensive review*. 2012, **1**(4), 217-223. ISSN International Journal of Health and
Allied Sciec.
- [2 DUFÈS, Christine, Ijeoma F. UCHEGBU a Andreas G. SCHÄTZLEIN. Dendrimers in gene delivery.
6] *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, **57**, 2177-2202.
- [2 MADAAN, Kanika, Sandeep KUMAR, Neelam POONIA, Viney LATHER a Deepti PANDITA.
7] Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues.
Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences. 2014, **6**(3), 139-150.
- [2 CHAUHAN, Abhay Singh. Dendrimers for Drug Delivery. *Molecules*. 2018, **23**(4), 938.
8]
- [2 BRUCH, Gisele E., Lorena F. FERNANDES, Beatriz L.T. BASSI, Marco Túllio R. ALVES, Isabelle O.
9] PEREIRA, Frédéric FRÉZARD a André R. MASSENSINI. Liposomes for drug delivery in stroke. *Brain*
Research Bulletin. 2019, **152**, 246-256.

- [3 SHARMA, Amarnath a Uma S. SHARMA. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. 0] *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, **154**, 123-140.
- [3 DENG, Chao, Yanjiao JIANG, Ru CHENG, Fenghua MENG a Zhiyuan ZHONG. Strategies to improve 1] the stability of drug-loaded biodegradable micelles. *Nanotoday*. 2012, **7**(5), 467-480.
- [3 BAWA, Priya, Viness PILLAY, Yahya E. CHOONARA a Lisa C. du TOIT. Stimuli-responsive polymers 2] and their applications. *Biomedical Materials*. 2009, **4**(2).
- [3 SCHMALJOHANN, Dirk. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug 3] Delivery Reviews*. 2006, **58**(15), 1655-1670.
- [3 GIL, Eun Seok a Samuel M. HUDSON. Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates. 4] *Progress in Polymer Science*. 2004, **29**(12), 1173-1222.
- [3 ŠŤASTNÝ, Marek, Dana PLOCOVÁ, Tomáš ETRYCH, Marek KOVÁŘ, Karel ULBRICH a Blanka 5] ŘÍHOVÁ. HPMA-hydrogels containing cytostatic drugs: Kinetics of the drug release and in vivo efficacy. *Journal of Controlled Release*. 2002, **81**(1-2), 101-111.
- [3 KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 6] ISBN 80-86369-07-2.
- [3 PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická 7] univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [3 NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. 8] Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [3 How Does High Performance Liquid Chromatography Work?. *Waters Corporation* [online]. [cit. 9] 2020-07-16]. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ
- [4 CHETTY, A., J. KOVÁCS, Zs. SÜLYÖK, Á. MÉSZÁROS, J. FEKETE, A. DOMJÁN, A. SZILÁGYI a V. 0] VARGHA. A versatile characterization of poly(N-isopropylacrylamide-co-. *EXPRESS Polymer Letters*. 2013, **7**(1), 95-105.
- [4 ILIĆ-STOJANOVIĆ, Snežana, Maja UROŠEVIĆ, Ljubiša NIKOLIĆ, Djordje PETROVIĆ, Jelena 1] STANOJEVIĆ, Stevo NAJMAN a Vesna NIKOLIĆ. Intelligent Poly(N-Isopropylmethacrylamide) Hydrogels: Synthesis, Structure Characterization, Stimuli-Responsive Swelling Properties, and Their Radiation Decomposition. *Polymers*. 2020, **12**(5), 1112.
- [4 TUCKER, Robert M., Benjamin W. PARCHER, Ella F. JONES a Tejal A. DESAI. Single-Injection HPLC 2] Method for Rapid Analysis of a Combination Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech*. 2012, **13**(2), 605-610.
- [4 ZOLGHADR, Leila, Bahman Vasheghani FARAHANI, Hossein GHASEMZADEH a Nasrin JAVADI. 3] Physicochemical studies of closed loop insulin delivery system based on intelligent carboxymethyl cellulose hydrogel. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2019, **56**, 125-131.
- [4 GYLES, Desireé Alesa, Anivaldo Duarte Pereira JÚNIOR, Lorena Diniz CASTRO, Andressa Santa 4] BRIGIDA, Maria Louze Nobre LAMARÃO, Wagner Luiz Ramos BARBOSA, José Otávio Carrera Silva

- JÚNIOR a Roseane Maria RIBEIRO-COSTA. Polyacrylamide-Metilcellulose Hydrogels Containing Aloe barbadensis Extract as Dressing for Treatment of Chronic Cutaneous Skin Lesions. *Polymers*. 2020, **12**(3), 690.
- [4] REHMAN, Khurram, Mohd Cairul Iqbal Mohd AMIN a Mohd Hanif ZULFAKAR. Development and
5] Physical Characterization of Polymer-Fish Oil Bigel (Hydrogel/Oleogel) System as a Transdermal
Drug Delivery Vehicle. *Journal of Oleo Science*. 2014, **63**(10), 961-970.
- [4] MALVIYA, R., V. BANSAL, O. P. PAL a P. K. SHARMA. HIGH PERFORMANCE LIQUID
6] CHROMATOGRAPHY: A SHORT REVIEW. *Journal of Global Pharma Technology*. **2**(5), 22-26.
- [4] PĚKNICOVÁ, Markéta a Dagmar KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z*
7] *kurzu*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902432-9-0.
- [4] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu*
8] *"Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. 1.
vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.