

Analýza difuzních jevů probíhajících při řízeném uvolňování léčiv z nanovláken

Ing. Nikifor Asatiani <nikifor.asatiani@tul.cz>, Ing. Petr Mikeš, PhD (KCH, FP TUL),
prof. RNDr. David Lukáš, CSc (KCH FP TUL).

V současnosti existuje velká poptávka po hledání nových systémů řízeného uvolňování léčiv. Bohužel stále je málo publikací týkajících se kinetiky uvolňování léčiva z elektrostaticky zvlákněných nanovláken. Ještě méně studií se dnes snaží ověřit a porovnat experimentálně získaná data s matematickými modely. Tento projekt je zaměřen na výzkum možnosti integrace nových druhů léčiv do polymerních nanovlákněných struktur, které mají aplikaci zejména v kožní medicíně. Inkorporovanými látkami mohou být například vybrané krátké peptidy a aminokyseliny, které stimulují růst granulační tkáně, urychlují epitelizační proces a průběh hojení ran. Zároveň projekt otevírá nové možnosti pro integraci látek, které by nahradily stále více problematická antibiotika

Klíčová slova: difuze, elektrostatické zvláknění, alaptid, kinetika uvolňování léčiv

Úvod

Vývoj a výzkum elektrostaticky zvlákněných nosičů léčiv (DDS, angl. *Drug Delivery Systems*) jsou relativně novou záležitostí. Za první publikaci k tomuto tématu se často považuje článek Kenawy et al. z roku 2002 [1]. Během posledních 17 let od vydání Kenawihho článku, zájem o kontrolované DDS založené na elektrostaticky zvlákněných nanovlákněných strukturách intenzivně roste. Nicméně, stále existuje jen omezený počet publikací týkajících se této problematiky.

Mezi články o DDS založeném na elektrostatickém zvláknění lze zjednodušeně rozlišovat tři hlavní trendy: a) články, které se primárně zaměřují na výrobu a charakterizaci nosiče léčiv, a následně poskytují pouze obecné informace o průběhu uvolňování modelového léčiva (např. [2]); b) články podrobně popisující kinetiku uvolňování bez komplexního matematického hodnocení (např. [3]); c) články týkající se jen simulací a vývoje nových matematických modelů (např. [4]). Pouze zlomek publikací poskytuje porovnání experimentálně získaných dat s matematickými modely.

Tento SGS projekt je navržen tak, aby docházelo ke kombinaci zkušeností z předchozích studií v této oblasti a k vyplnění mezery chápání základů kinetiky uvolňování a faktorů, které tento proces ovlivňují. Zvláštní důraz je kladen nejen na zkoumání vlivu dávky (tzv. *loading*) inkorporovaného léčiva na jeho kinetiku uvolňování, ale také na porovnání získaných dat s existujícími matematickými modely.

Obecně studium kinetiky uvolňování je založeno primárně na chromatografické metodě (HPLC). Tento postup je však velmi náročný a zdlouhavý, neboť pro každou novou kombinaci polymeru a aktivní látky musí být metoda provedena individuálně. Z tohoto důvodu chceme najít matematický model, který by zjednodušil experimentální postupy. Model bude založen na difuzním koeficientu získaném z experimentálních dat. Ta budou následně sloužit pro numerický výpočet kinetiky uvolňování pro danou kombinaci léčivo – polymer.

Metodika

Výroba funkcionalizovaných nanovlákněných vrstev je realizována pomocí technologie elektrostatického zvláknění s využitím zařízení Nanospider™. K morfologické analýze se využívá rastrovací elektronová mikroskopie (SEM). Kinetika uvolňování léčiv byla analyzována chromatograficky (HPLC). Připravené materiály byly také ověřeny v *in vitro* podmínkách.

Výsledky a diskuze

Projekt navazuje na výsledky dosažené v diplomové práci. V této návaznosti již byla otestována řada léčiv z hlediska rozpustnosti v prekurzorních roztocích. Z těchto roztoků byly následně vyrobeny modifikované nanovlákněné nosiče léčiv.

Byla provedena analýza pro charakterizaci vzniklých nanovlákněných vrstev. Zejména byla analyzována morfologie nanovláken z poly-ε-kaprolaktonu (PCL) modifikovaných přísadkou

Alaptidu. Alaptid je krátký peptid, stimulující růst regenerační tkáně a zrychlující hojení rán. Bylo zjištěno, že dávkou inkorporovaného léčiva bylo možné řídit průměry vláken, což může zároveň částečně předvídat kinetiku uvolňování a výskyt tzv. *burst release*. Navíc, bylo prokázáno, že se zvýšením dávky léčiva se mění i celková smáčivost vrstvy, což je klíčové pro následnou buněčnou adhezi a proliferaci.

Byl ověřen vliv konvenčních sterilizačních metod jak na morfologii, tak i na kinetiku uvolňování. Bylo ověřeno, že sterilizace pomocí ethylen oxidu nemá výrazný vliv na morfologii ani na kinetiku uvolňování léčiva. Naopak, sterilizace Ethanolem (EtOH) se ukázala jako nevhodná metoda, jelikož EtOH částečně rozpouští modelová léčiva. Navíc díky nízkému povrchovému napětí dochází ke snadné penetraci EtOH do vlákněných pórů a k rychlému vypláchnutí inkorporované látky z nanovlákněné vrstvy.

Připravené materiály byly vyzkoušeny v *in vitro* podmínkách, z hlediska jejich cytotoxicity a buněčné proliferace. V případě Alaptidu bylo prokázáno, že použité koncentrace nebyly pro buňky toxické, naopak, zvyšující se dávka Alaptidu zvyšovala úroveň buněčné proliferace.

Inkorporované léčivo bylo schopné se uvolňovat po dobu nejméně 14 dnů. Kinetika uvolňování modelových léčiv z nanovláken byla fitována pomocí vhodných matematických modelů s ohledem na specifické vlastnosti nanovlákněných vrstev (pórovitost, klikatost pórů, bimodální rozdělení průměrů vláken atd.) Výsledky potvrzují hypotézu, že při určité dávce inkorporované látky dochází ke změně mechanismu uvolnění látky, což je v souladu s literaturou [5]. Pro nejmenší koncentraci, kde docházelo k úplnému rozpouštění léčiva v prekurzorním roztoku, průběh uvolňování odpovídal Higuchiho modelu [6]. Což svědčí o tom, že difuze byla skutečně dominantním mechanismem. Avšak u vyšších koncentrací, vzhledem k bimodálnímu charakteru kinetiky a výraznému *burst release* v první fázi, lze diskutovat o dvou návazných mechanismech. Toto se částečně potvrdilo fitováním jednotlivých fází celkového průběhu za použití vhodných modelů.

Závěr

V dnešní době v rámci tohoto výzkumu již byly úspěšně stanoveny procesní podmínky pro výrobu a nanovlákněných nosičů léčiv z biodegradabilních poly-

merů (zejména PCL) a jejich funkcionalizaci pomocí vybraných krátkých peptidů. Vyrobené vrstvy byly schopné uvolňování inkorporovaných léčiv po dobu minimálně dvou týdnů.

V současné době se provádí experiment kombinující zejména nová léčiva, ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie a Popáleninovým centrem FNKV. Provádí se návrh a realizace podpůrných laboratorních experimentů pro ověření získaných výsledků.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2019.

Reference

- [1] E. R. Kenawy *et al.*, "Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend," *J. Control. Release*, vol. 81, no. 1–2, pp. 57–64, 2002.
- [2] H. Jiang, Y. Hu, Y. Li, P. Zhao, K. Zhu, and W. Chen, "A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents," *J. Control. Release*, vol. 108, no. 2–3, pp. 237–243, 2005.
- [3] J. Hrib *et al.*, "Nanofibers for drug delivery - Incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1939–1945, 2015.
- [4] M. Kojic, M. Milosevic, V. Simic, D. Stojanovic, and P. Uskokovic, "A radial 1D finite element for drug release from drug loaded nanofibers," *J. Serbian Soc. Comput. Mech.*, vol. 11, no. 1, pp. 82–93, 2017.
- [5] J. Siepmann, R. A. Siegel, and M. J. Rathbone, *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. Springer US, 2012.
- [6] T. Higuchi, "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices," *J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 12, pp. 1145–1149, 1963.