

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STUDIUM DEGRADACE BIOKOMPATIBILNÍCH POLYMERŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

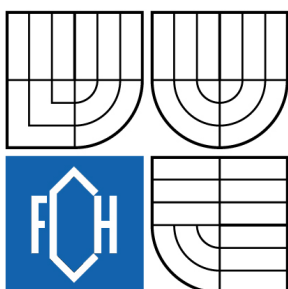
AUTHOR

JANA OBORNÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STUDIUM DEGRADACE BIOKOMPATIBILNÍCH POLYMERŮ

STUDY OF BIOCOMPATIBLE POLYMERS DEGRADATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

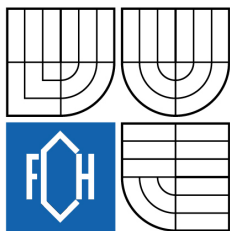
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JANA OBORNÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0313/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Jana Oborná	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí bakalářské práce:	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Studium degradace biokompatibilních polymerů

Zadání bakalářské práce:

- zpracování rešerše z dané oblasti
- vypracování optimálního analytického postupu a postupu pro degradaci
- posouzení získaných výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Jana Oborná
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na sledování degradace biokompatibilních polymerů. Sledovanými kopolymery byly kopolymer poly(mléčné-co-glykolové kyseliny) a poly(ethylenglykolu) a tyto kopolymery upravené kyselinou itakonovou. V této práci byl ověřen optimální analytický postup pro sledování degradace zkoumaných kopolymerů.

Degradace biokompatibilních polymerů probíhala při teplotě 37 °C v prostředí fosfátového pufru při pH = 7,4. Pro stanovení produktů degradace byla použita vysoko účinná kapalinová chromatografie s UV-VIS detekcí pomocí diodového pole. Pro stanovení změny molekulové hmotnosti polymerního řetězce po degradaci byla použita gelová permeační chromatografie s refraktometrickým detektorem.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on biocompatible polymers degradation study. Both poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-g-poly(ethyleneglycol)-g-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) copolymers and their forms modified with itaconic acid were monitored. This work verified the optimal analytical procedure for monitoring the degradation of investigated copolymers.

Bio-degradation of polymers occurred at 37 °C in phosphate buffer with pH=7.4. High performance liquid chromatography with UV-VIS detection of diode-array type was used for determination of the degradation products. Gel permeation chromatography with refractive index detector was used for the assesment of the change of molecular weight polymer chain after the degradation.

KLÍČOVÁ SLOVA

degradace, polymery

KEYWORDS

degradation, polymers

OBORNÁ, J. Studium degradace biokompatibilních polymerů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 64 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

DECLARATION

I declare that the bachelor thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the bachelor thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, BUT.

.....
student's signature

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a Ing. Ludmile Mravcové za jejich vstřícnost, čas, odborné vedení a cenné rady.

Velký dík patří i mé rodině, a to za podporu a pochopení při studiu na Fakultě chemické VUT v Brně.

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Biologicky rozložitelné polymery	6
2.1.1	Syntetické biologicky rozložitelné polymery	6
2.1.1.1	Polyestery	7
2.1.1.2	Polyanhydridy	7
2.1.1.3	Polyuretany	7
2.1.1.4	Polyethylenglykol (PEG)	8
2.2	Biodegradace polymerů	8
2.2.1	Rozklad poly(mléčné kyseliny) (PLA)	8
2.2.2	Rozklad poly(glykolové kyseliny) (PGA)	9
2.2.3	Odbourávání PLGA kopolymeru	10
2.2.3.1	Základní vlastnosti polymeru	10
2.3	Biokompatibilita a cytotoxicita	11
2.3.1	Toxicita kyseliny mléčné	11
2.3.2	Toxicita kyseliny glykolové	12
2.3.3	Toxicita kopolymeru PLGA	13
2.4	Polymery, gely, hydrogely	13
2.4.1	Aplikace hydrogelů	13
2.5	Využití hydrogelů	13
2.5.1	Hydrogely citlivé na teplo	14
2.5.2	Triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG	15
2.5.3	Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA	15
2.5.4	Kopolymery s poly(itakonovou kyselinou)	16
2.5.5	Diagramy fázového přechodu	17
2.5.6	Vliv složení kopolymeru na přechod sol - gel	17
2.5.7	Metoda s obrácenými zkumavkami	18
2.6	Metody charakterizace rozkladu polymerních produktů	19
2.6.1	Chromatografie	19
2.6.1.1	Rozdělení chromatografických metod	19
2.6.1.2	Separace pomocí HPLC	20
2.6.1.3	Detektory pro HPLC	21
2.6.1.4	Gelová permeační chromatografie	22
2.6.2	Použití GPC pro sledování degradace polymerů	23
2.6.2.1	Refraktometrický detektor	24
2.6.3	Lyofilizace	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Přístroje, zařízení, software	27
3.1.1	Příprava vzorků	27
3.1.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	27
3.1.3	Gelová permeační chromatografie	27
3.1.4	Software pro zpracování a prezentaci dat	27
3.2	Používané chemikálie a standardy	28
3.2.1	Chemikálie	28
3.2.2	Standardy	28
3.3	Pracovní postupy	28
3.3.1	Vlastnosti zkoumaných vzorků	28

3.3.2	Stanovované analyty a jejich vlastnosti	29
3.3.2.1	Kyselina mléčná	29
3.3.2.2	Kyselina glykolová	29
3.3.3	Příprava vzorků	29
3.3.4	Stanovení kritické koncentrace gelu a kritické teploty gelu	29
3.3.5	Degradace vzorků	29
3.3.6	Identifikace a kvantifikace degradačních produktů na HPLC	30
3.3.6.1	Nastavení HPLC	30
3.3.7	Příprava vzorků na GPC analýzu	31
3.3.8	Kvantifikace poklesu molekulové hmotnosti degradovaných vzorků na GPC.....	31
3.3.8.1	Nastavení GPC	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Kopolymer 210806 PLGA-PEG-PLGA	33
4.2	Kopolymer 280806 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	36
4.3	Kopolymer 220107 PLGA-PEG-PLGA	39
4.4	Kopolymer 180907 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	46
5	ZÁVĚR	50
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	56
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	57
9	PŘÍLOHY	58

1 ÚVOD

V oblasti vývoje nových druhů polymerů se v posledních letech upíná pozornost na materiály, které podléhají přirozené degradaci. Tyto materiály nacházejí své významné využití v medicíně, zejména pro jejich několik nesporných výhod. Za prvé - nevyvolávají trvalé chronické reakce na cizí těleso přítomné v těle, protože jsou postupně vstřebávány. Za druhé - není zapotřebí následné operace pro odstranění implantátu. Důležité uplatnění nachází také v tkáňovém inženýrství, kde se používají jako nosiče buněk. Po vytvoření nové tkáně není už „kostra“ z polymeru potřeba, a proto je pro tyto účely používán vstřebavatelný materiál [1].

Snahy o napodobení přírodních materiálů, které mají jak hydrofilní, tak hydrofobní vlastnosti, vedly k vývoji biokompatibilních amfifilních syntetických polymerů [2]. Do této klasifikace jsou zahrnuty hydrogely, které mohou být fyzikální nebo chemické povahy, se schopností absorbovat více než 20 % vody v poměru k jejich celkové hmotnosti [3]. Biomedicínská aplikace hydrogelů je velmi široká, od kontaktních čoček přes diagnostické a terapeutické nástroje na implantabilních biosenzorech s krátkou nebo dlouhou životností.

V poslední době byly připraveny tzv. „chytré“ hydrogely, u kterých je jejich gelace způsobena externími podněty [4]. Tato citlivost na okolní prostředí může být řízena změnou teploty, pH, iontovou povahou, elektrickým polem, rozpouštědlem, tlakem, světlem nebo napětím [5]. Aktuálně se hydrogely připravují technikou, která je založena na zesíťování makromonomerů pomocí fotopolymerizace nebo přes přechodnou fázi mezi roztokem a gelem [6, 7]. V případě reverzibilního procesu přechodné fáze je výsledkem gel, který má reverzibilní vlastnosti (sol-gel, gel-sol). Jednotlivé přechody mohou být ovlivněny např. změnou teploty. Tyto vlastnosti mají gely obsahující hydrofilní poly(ethylen glykol) PEG a hydrofobní poly(mléčnou kyselinu) PLA a poly(glykolovou kyselinu) PGA [8]. Termoreversibilní gely mohou být použity jako injekční implantáty[9].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biologicky rozložitelné polymery

Použití biologicky rozložitelných polymerů je zaměřeno na tři hlavní oblasti: lékařství, zemědělství a balení spotřebního zboží. Vzhledem k jejich specializovaným vlastnostem a vyšší ceně za výrobek se aplikace v oblasti medicíny rozvinula mnohem rychleji, než u ostatních dvou oborů. Z lékařského hlediska jsou biomateriály definovány jako látky jiné než potraviny nebo léky, které jsou obsaženy v léčebných nebo diagnostických systémech a jsou v kontaktu s tělními tekutinami [10]. Materiál, který může být použit pro lékařské aplikace, musí splňovat řadu požadavků. Patří mezi ně biokompatibilita, biodegradace na netoxické látky, schopnost podporovat růst buněk. Musí mít mechanickou pevnost, která je důležitá během procesu regenerace tkání [11].

Výběr vhodných polymerních materiálů (přírodních nebo syntetických) pro biomedicínské aplikace je i nadále klíčovým faktorem při vytváření a rozvoji tkáňového inženýrství [12]. Syntetické polymery mají poměrně dobrou mechanickou pevnost, jejich tvar a rychlost rozkladu lze lehce upravit, ale jejich povrch je hydrofobní a postrádá interakci mezi materiálem a buňkami. Na druhou stranu, přírodní polymery mají dobré schopnosti pro buněčné interakce a jsou hydrofilní, avšak mechanicky jsou příliš křehké [13]. Vlastnosti biomateriálů mohou být řízeny pomocí kombinace obou systémů.

Příkladem jsou rozpustné biologicky rozložitelné polymery (ve vodě nebo v tělních tekutinách), které jsou často používány jako podpora pro zvýšení objemu krevní plazmy (dextriny [14], želatina [15], polyethylenglykol (PEG), atd.), pro detoxikaci těla (např. polyvinylalkohol [5] nebo pro systémy podávání léků (např. poly(α -aminokyseliny)). Nerozpustné biologicky rozložitelné polymery (hydrofobní nebo zesíťované) se nejčastěji používají jako tkáňové implantáty (např. kolagen, chitosan) nebo pro makromolekulární systémy podávání léků. Polyuretan může být použit jako tkáňové pojivo. Více jsou ale v tkáňovém inženýrství používány polyester, např. semikrystalický poly(ϵ -kaprolaktan) a poly(α -hydroxykyseliny), polymery a kopolymery založené na semikrystalické nebo amorfni kyselině mléčné (PLA) a semikrystalické kyselině glykolové (PGA).

2.1.1 Syntetické biologicky rozložitelné polymery

Obecně lze říci, že celá řada přírodních, syntetických a biosyntetických polymerů je biologicky i environmentálně odbouratelná. Polymery, jejichž základní řetězec obsahuje pouze uhlíkové atomy, se degradují obtížněji než polymery, které obsahují heteroatomy. Tohoto poznatku se cíleně využívá a degradovatelnost může být do polymeru projektována přesným zařazením chemických vazeb jako např. anhydridů, esterů nebo amidů.

Mechanismus degradace potom spočívá především v hydrolýze, ať již nekatalyzované nebo spojené s enzymatickou katalýzou. V důsledku hydrolýzy dochází k rozštěpení polymerního řetězce a postupné degradaci. Biodegradabilní polymery s hydrolyzujícími chemickými vazbami jsou intenzivně zkoumány nejen pro biomedicínské, farmaceutické nebo zemědělské účely, ale také pro využití při výrobě obalů. Aby nějaký materiál mohl být použit v lékařství nebo pro cílenou aplikaci léčiv, musí být biokompatibilní a musí být kvalifikován jako biomateriál. O biokompatibilitě polymerů často rozhodují produkty štěpení více než samotný polymer. Jako biomateriály jsou nejčastěji využívány polyester založené na polylaktidu (PLA), polyglykolidu (PGA) a polykaprolaktonu (PCL) a jejich kopolymery. Degradace těchto materiálů vytváří odpovídající hydroxykyseliny, které jsou netoxické a proto bezpečné pro použití in vivo [18].

2.1.1.1 Polyestery

Alifatické polyestery, jako jsou hydrofobní polylaktidy (PLA), polyglykolidy (PGA), poly(ϵ -kaprolactony) (PCL), poly(β -butyrolactony) (PBL) a hydrofilní poly([R,S]-3,3-dimethyl-2-hydroxybutandiová kyselina) (PDMMLA), představují důležitou třídu biologicky rozložitelných makromolekul s výbornou biokompatibilitou a variabilní rozložitelností. Všechny tyto látky jsou získávány z obnovitelných zdrojů.

Degradační čas závisí na složení a původní molekulové hmotnosti a může být v rozsahu od několika dnů až roků [19]. Výše specifikované sloučeniny byly v širokém měřítku studovány nejen jako šetrné k životnímu prostředí, ale také z hlediska biomedicínského výzkumu jako resorbovatelné polymery pro biomedicínské aplikace s atraktivními vlastnostmi a cenou.

Poly(mléčná kyselina) (PLA), poly(glykolová kyselina) (PGA) a jejich kopolymery poly(mléčná-co-glykolová kyselina) (PLGA) jsou součástí většiny zkoumaných polymerů ze skupiny polyesterů. Tyto polymery byly použity jako chirurgické nitě, vyztužovací pláty a pomůcky pro fixaci zlomeniny a výztuže pro buněčné transplantace. Diblokový kopolymer PLGA může být použit pro další vývoj nových kopolymerů s novým potenciálem pro klinické využití (např. systémy podávání léků, injekční polymery) [17]. Poprvé byly tyto polyestery použity v chirurgii před 40 lety, jako nitě a materiál pro kostní fixaci a stále patří mezi nejčastěji používané synteticky rozložitelné polymery [20].

2.1.1.2 Polyanhydridy

Polyanhydridy (PA) jsou vlákna, která tvoří polymery, které jsou velmi náchylné k hydrolyze a povrchovému rozkladu [11]. Tyto materiály jsou zajímavé vzhledem k jejich dobré biokompatibilitě [16]. Degradační stupeň může být změněn výměnou hlavního řetězce polymeru. Alifatické PA se rozloží během několika dnů, zatímco aromatické PA se mohou rozkládat pomalu, dokonce až několika let. Jejich hlavní aplikace je v řízeném uvolňování léků [11].

2.1.1.3 Polyuretany

Polyuretany (PU) představují hlavní třídu syntetických elastomerů, které byly hodnoceny z hlediska různých medicínských implantátů, zejména pro dlouhodobé implantáty. Mají vynikající mechanické vlastnosti a dobrou biokompatibilitu. Jsou používány při výrobě lékařských implantátů, jako jsou kardiostimulátory a cévní štěpy [11].

PU mohou být navrženy tak, aby chemické vazby byly rozložitelné v biologickém prostředí. Obecně lze říci, že u biologicky rozložitelných polyuretanů bylo prokázáno, že jsou závislé na tom, zda vícesytný alkohol je založen na polyesteru nebo polyetheru. Polyuretany založené na polyetheru jsou rezistentní vůči biodegradaci, zatímco PU založené na polyesterech jsou snadno napadnutelné mnoha mikroorganismy a enzymy [16].

2.1.1.4 Polyethylenglykol (PEG)

Polyethylenglykol je syntetický polymer rozpustný ve vodě, který byl široce využíván v mnoha aplikacích jako je lékařství, kosmetický a farmaceutický průmysl, a to po mnoho desetiletí [21, 22, 23].

Po perorální a intravenózní expozici je (PEG) vylučován močí a výkaly převážně v nezměněné podobě. Podmínkou ledvinové filtrace a tím i odstranění PEG z těla je, že PEG blok musí mít nižší molekulovou hmotnost ($<5\,000$) [24]. Část (PEG) se vstřebává. PEG je metabolizován do oligomerů, glykolové kyseliny, hydroxyglykolové kyseliny a diglykolové kyseliny jako jejího homologu. Procento vyloučené ve formě CO_2 se snižuje se vzrůstající intenzitou dávky. Procentuální vylučování ve formě CO_2 klesá také s rostoucí molekulovou hmotností homologické řady [23].

Polyethylenglykol a jeho kopolymery byly navrženy jako expandéry krevní plazmy a jako nosiče biologicky aktivních látek.

2.2 Biodegradace polymerů

Degradace je charakterizována poklesem molekulové hmotnosti vzorku, jež je doprovázena zvýšením koncentrace nízkomolekulárního řetězce v převážné části okolního prostředí.

Obecně lze říci, že veškeré biologicky rozložitelné polymery obsahují některé hydrolyzovatelné vazby (labilní vazby, jako jsou estery, orthoestery, anhydridy, uhličitany, amidy, urethany a močovina, atd.). Jejich nejvýznamnější degradační mechanismus je chemická hydrolýza nebo enzymaticky katalyzovaná hydrolýza. V případě hydrolýzy, která vyžaduje vodu pro přístup k vazbám, má silný vliv na rychlost rozkladu struktura polymeru. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují rychlost hydrolýzy, např. relativní stabilita vazeb, hydrofobnost, hydrofilnost, sterický efekt, produkce autokatalyzovaných produktů, rozpustnost degradačních produktů, mikrostruktura, schopnost krystalizace.

2.2.1 Rozklad poly(mléčné kyseliny) (PLA)

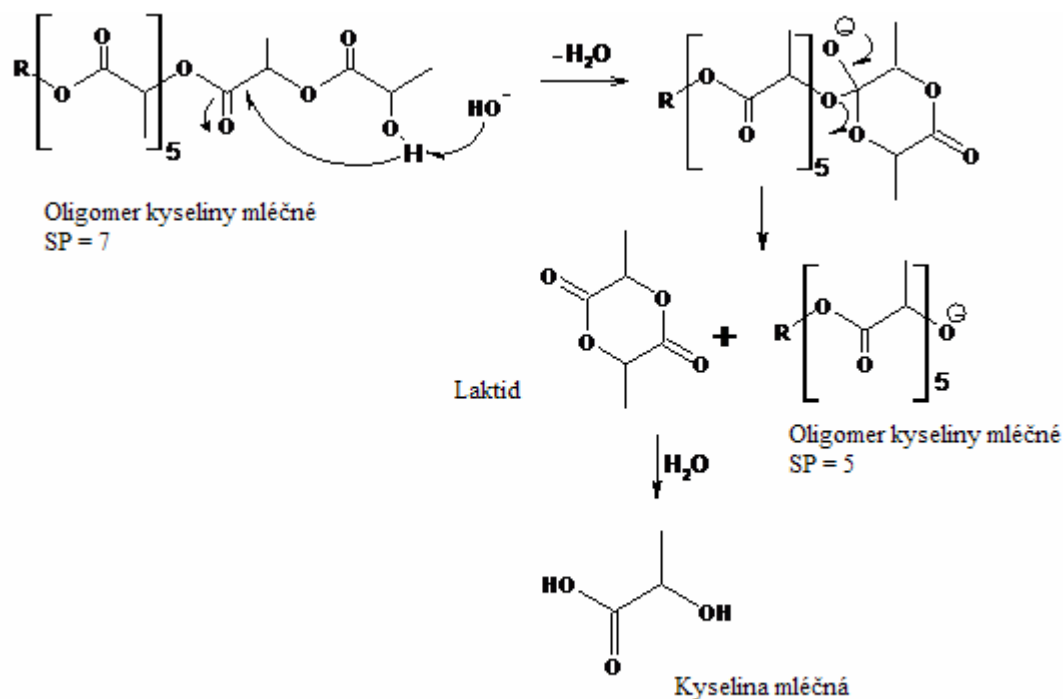
Poly(mléčná kyselina) se vyskytuje ve třech izomerních formách D (-), L (+) a v racemické směsi (D, L). Polymery jsou obvykle zkráceně označovány pomocí jejich chiralit. Poly(L-mléčná kyselina) a poly(D-mléčná kyselina) jsou semikrystalické pevné látky s podobným stupněm hydrolytické degradace jako PGA. PLA je více hydrofobní, než PGA a zároveň je více odolná vůči hydrolytickému štěpení. V kontrastu s poly(glykolovou kyselinou) se poly(mléčná kyselina) rozkládá pomaleji vzhledem k objemné methylové skupině, která blokuje přístup vody. Pro většinu aplikací je (L) izomer kyseliny mléčné vybrán, protože je přednostně metabolizován v lidském těle [11].

V neutrálním nebo zásaditém prostředí lze vysvětlit pozorovaný rozklad oligomeru PLA mezimolekulární transesterifikací, která se také nazývá zpětné štěpení [25, 26].

Mechanismus hydrolýzy: při kyselém pH postupuje štěpení od konce řetězce. V alkalickém prostředí je dimer kyseliny mléčné tvořen prostřednictvím mezimolekulární reakce.

Nukleofilní štěpení hydroxylové skupiny na konci druhé karbonylové skupiny vede k vytvoření stabilního šestičlenného uzavřeného cyklu jako meziprojektu (obr. 1). Tato reakce je katalyzována zásadou, protože zásada interaguje s koncem hydroxylové skupiny, čímž se zvyšuje nukleofilita na atomu kyslíku. Podle tohoto mechanismu se tvoří během rozkladu oligomer kyseliny mléčné (stupeň polymerace $SP = 5$) a laktát. Přestože laktát nebyl zjištěn při rozkladu vzorků, to ještě nedokazuje, že tento mechanismus není pravdivý. Poločas rozkladu laktátu je v rámci zadaných podmínek méně než 1 minuta [25].

Při nízkém pH [27] probíhá štěpení prioritně na esterové vazbě koncového hydroxylu tohoto oligomeru. To lze vysvětlit takto: rozklad je zahájen protonací na OH koncových skupinách, po kterém následuje vytvoření mezimolekulárních vodíkových můstků. Ze všech možných struktur meziproductů je nejvíce stabilní uzavřený pětičlenný kruh. Elektrofilita karbonylové skupiny vzrostla po vytvoření vodíkových můstků. Kyselina mléčná bude odštěpena, přičemž zůstane oligomer kyseliny mléčné, jehož SP bude mít o jeden monomer méně, než výchozí sloučenina [25].



Obr. 1: Schéma mechanismu hydrolýzy v zásaditém prostředí [25]

2.2.2 Rozklad poly(glykolové kyseliny) (PGA)

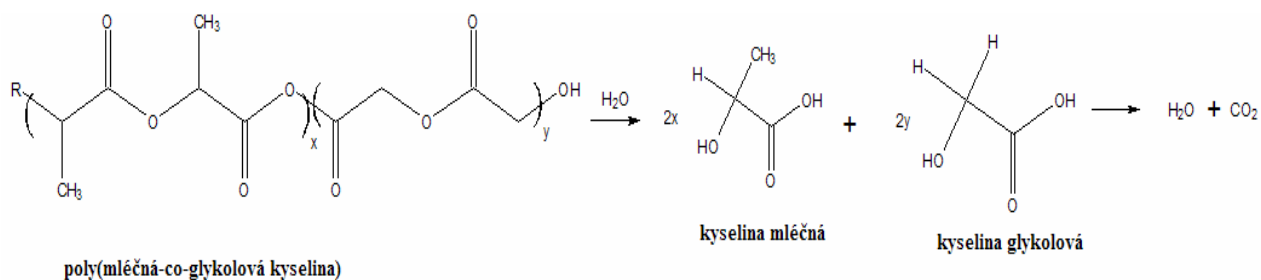
Poly(glykolová kyselina) (PGA) je tuhý termoplastický materiál s vysokou schopností krystalizace (46-50 %). Vzhledem k vysoké schopnosti krystalizovat není PGA rozpustná ve většině organických rozpouštědel; výjimkou jsou vysoce fluorovaná organická rozpouštědla jako je hexafluoroisopropanol [11].

Přitažlivost PGA v lékařské aplikaci je její využití jako biologicky rozložitelného polymeru, protože produkt rozkladu kyseliny glykolové je přirozeným metabolitem organismu. Hlavní použití PGA je v materiálech používaných k šití, které jsou resorbovatelné (Dexon, American Dynamice Co) [20].

Degradační proces probíhá ve dvou fázích. První fáze spočívá v difúzi vody do amorfních částí matrice a v jednoduchém hydrolytickém štěpení řetězce na esterové skupiny. Druhá fáze degradace zahrnuje převážně krystalizaci částí polymeru, kdy většina z amorfních částí jsou rozrušeny [11].

2.2.3 Odbourávání PLGA kopolymeru

V posledních letech byly provedeny studie o degradaci PLGA polymeru u běžně používaných lékařských pomůcek, jako jsou např. fólie, kostní fixace, nitě, atd.. Hydrolytické štěpení jedné esterové vazby v PLGA kopolymeru nám poskytne jednu karboxylovou a jednu hydroxylovou skupinu. Takto vytvořené konce karboxylových skupin jsou schopny katalyzovat hydrolýzu esterů ostatních vazeb, což je autokatalýza.



Obr. 2: Schéma mechanismu degradace PLGA

Faktory ovlivňující rychlost hydrolýzy pomůcky (předmětu) z PLGA jsou například: příprava, velikost a tvar předmětu, teplota a pH, autokatalýza, délka vytvářejícího se oligomeru, základní vlastnosti polymeru [66].

2.2.3.1 Základní vlastnosti polymeru

Obecně platí, že míra degradace alifatických polyesterů se určí podle jejich molekulové hmotnosti a struktury. Struktury jsou amorfni nebo krystalické. Dále pak mohou být hydrofilně-hydrofobní [30]. Velmi malý rozdíl je pozorován v rychlosti rozkladu na různých místech těla.

Zhoršování degradace nanočásticových systémů závisí na hydrofilitě polymeru. Čím více hydrofilní je polymer, tím rychlejší je degradace. Hydrofilita polymeru je ovlivněna poměrem amorfni části k části krystalické [32], která zase určuje stereochemii monomeru a složení kopolymeru. PLGA kopolymer připravený z L-PLA a PGA patří mezi krystalické kopolymeru, zatímco kopolymeru připravené z D,L-PLA a PGA jsou amorfni. Kopolymer PLGA obohacen kyselinou mléčnou je méně hydrofilní, protože kyselina mléčná je více hydrofobní než kyselina glykolová, což zpomaluje proces rozkladu kopolymeru [33].

Složení polymerních řetězců (tzn. obsah L-LA, D-LA, anebo GA jednotek) výrazně určuje rychlost rozkladu PLGA polymeru [28, 29, 30, 31]. Kopolymer obsahující vyšší procento jednotek kyseliny glykolové v hlavním řetězci polymeru, následně generuje více L-mléčné kyseliny v substrátu. To je způsobeno tím, že monomery kyseliny glykolové jsou propojeny mezi sebou nebo s kyselinou mléčnou, a proto primárně podléhají hydrolýze během rozkladu. U testovaných polymerů (PLA/PGA: 90/10, 80/20, 70/30 a 50/50) bylo prokázáno, že nejrychlejší degradace je u polymeru PLA/PGA: 50/50 [31]. Velmi rychlá degradace je pozorována u kopolymerů s vyšším obsahem kyselin glykolové. Biologický rozklad PLGA in vivo je rychlejší než biodegradace semikrystalického kopolymeru PLA. Kromě toho se amorfni kopolymer PLGA rozkládá rychleji, než jeho semikrystalická forma [34]. Při rozkladu pomocí hydrolýzy in vitro jsou produkty převážně rozpustné dioly.

2.3 Biokompatibilita a cytotoxicita

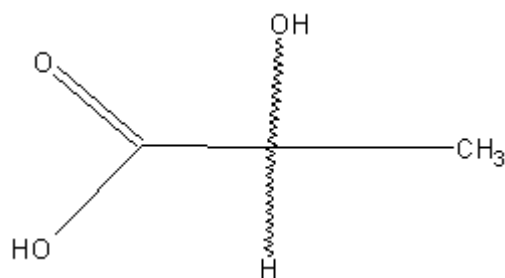
Biologické hodnocení prostředků zdravotnické techniky je prováděno s cílem zjistit možnou toxicitu vyplývající z kontaktu mezi tělem a konstrukčním materiálem předmětu. Materiál by neměl mít nepříznivé místní nebo systematické účinky (karcinogenní, škodlivé účinky na reprodukci a vývoj), a to ať již přímo nebo prostřednictvím uvolnění jejich složek z materiálu. Systematické testování zajišťuje, že přínosy plynoucí z konečného výrobku budou mít převažující kladné vlastnosti nad potenciálními riziky.

Při určování vhodných testů je nutné vzít v úvahu vlastnosti zařízení, materiálů a povahu stupně četnosti a trvání expozice mající vliv na orgán. Bylo zjištěno, že materiál využitý v jednom výrobku, nemusí být vhodný pro jiné využití. Závěrečné hodnocení musí sice zahrnovat všechny součásti výrobku, avšak důležitější je hodnocení celých hotových výrobků. Obecně platí, že se testuje akutní subchronická a chronická toxicita, testování negativního vlivu na kůži, oči a sliznice, přecitlivělost na složky materiálu, hemokompatibilita, genotoxicita, karcinogenita, vliv na reprodukci a vývoj. V závislosti na charakteristickém použití přístroje mohou být tyto testy zcela nezbytné nebo jen dostačující. Dalšími nezbytnými testy jsou mimo jiné testy na neurotoxicitu a imunotoxicitu [35].

Metody využívající buněčné kultury jsou známy jako testy na cytotoxicitu a mohou být také použity k hodnocení toxicity hydrogelů. Většina problémů spojená s toxicitou hydrogelů jsou nezreagované monomery, oligomery a iniciátory, které se vyluhují v průběhu používání. Proto pochopení toxicity různých monomerů, které jsou používány jako stavební kameny hydrogelů, je velice důležité [36].

2.3.1 Toxicita kyseliny mléčné

Kyselina mléčná má dráždivé účinky především na kůži a sliznici. Podle toho je laktát, který vzniká v důsledku metabolismu buňky, velmi málo toxický. Pro lidský organismus se objevuje tolerance při perorálním dávkování až 1 500 mg/kg tělesné hmotnosti. Letální koncentrace v krvi je okolo 20 mM. Perorální podávání D, L-kyseliny mléčné u potkanů, v oblasti smrtelné koncentrace, způsobuje úbytek tělesné hmotnosti, chudokrevnost a také snižuje koncentraci oxidu uhličitého v krvi [37].



Obr. 3: Struktura D, L-mléčné kyseliny

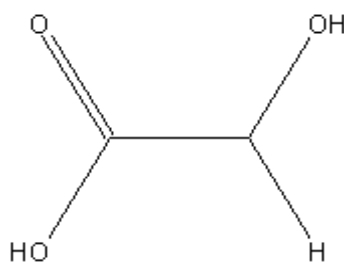
Klinický obraz intoxikace kyselinou mléčnou je kompenzován metabolickou acidózou se zvýšeným podrážděním, dušností a zrychlením srdeční frekvence. Existuje stále více důkazů, že existuje souvislost mezi vysokou plazmatickou koncentrací D,L-laktátu a stavem úzkosti a panickým strachem [37].

Tabulka 1: Akutní toxicita D, L-mléčné kyseliny [37]

Druh	Aplikace	DL ₅₀ mg.kg ⁻¹
potkan	perorální, subkutánní	3 730
potkan	intraperitoneální	2 000
myš	perorální, subkutánní	4 875
morče	perorální	1 810

2.3.2 Toxicita kyseliny glykolové

Akutní toxicita kyseliny glykolové je nízká. Stejně jako v případě kyseliny mléčné má dráždivé účinky. Předpokládá se, že glykolová kyselina vznikla z ethylenglykolu metabolickým procesem. Kyselina šťavelová, která je vytvářena v průběhu glykolového cyklu se slučuje s vápenatými ionty, se kterými tvoří mírně rozpustné soli. Tyto soli se mohou ve vysokých koncentracích vysrážet do tubulů. Vzniklé tubuly se převážně vyskytují v moči a způsobují celkovou poruchu ledvin [37].



Obr. 4: Vzorec kyseliny glykolové

Tabulka 2: Akutní toxicita kyseliny glykolové [37]

Druh	Aplikace	DL ₅₀ mg.kg ⁻¹
potkan	perorální	1 950
potkan	intravenózní	1 000
morče	perorální	1 920

2.3.3 Toxicita kopolymeru PLGA

Biodegradace produktů, které jsou tvořeny z PLGA kopolymeru je velmi pomalá, a proto nemá vliv na normální buněčnou funkci. PLGA polymery byly testovány na toxicitu a nezávadnost. Tyto dlouhodobé a rozsáhlé studie byly prováděny na zvířatech. Byly testovány preparáty, které jsou v současné době používány u člověka, jako jsou vstřebávací materiály používané k šití, kostní implantáty, šrouby a antikoncepční implantáty. Hodnocené polymery jsou také používány, jako štepovací materiál pro umělé orgány a v poslední době jako podpůrná výztuha ověřovaná ve výzkumu tkáňového inženýrství [33]. Obecně lze říci, že PLA-PGA biomateriály prokázaly uspokojivou biokompatibilitu a absenci výrazné toxicity, i když byla zaznamenána některá snížení buněčné proliferace. Biokompatibilita a toxicita PLGA byla testovaná in vitro na zvířatech i na lidech [37].

2.4 Polymery, gely, hydrogely

Gel je definován jako trojrozměrná síť obtékaná rozpouštědlem. Obvykle je rozpouštědlo hlavní složkou gelového systému. Gely lze rozdělit do dvou kategorií; hodnotícím kritériem je způsob, jakým jsou propojeny sítě: tzn. chemické gely, jejichž sítě jsou vytvořeny pomocí kovalentních vazeb a fyzikální gely, které jsou tvořeny pomocí druhotných sil [38]. Pokud je rozpouštědlem voda, v níž se struktura gelu nachází, pak se gel nazývá hydrogel.

2.4.1 Aplikace hydrogelů

Hydrogely jsou používány v mnoha aplikacích, jako např.:

- Výztuha v tkáňovém inženýrství
- Řízené uvolňování léků
- Biosenzory (hydrogely, které mají schopnost reagovat se specifickými molekulami, např. glukózou nebo antigeny)
- Kontaktní čočky (silikonové hydrogely polyakrylamidu)
- Zdravotnické elektrody (poly (ethylenoxid), poly (vinylpyrrolidon))
- Bio-lepidla
- Prsní implantáty
- Granule (např. pro hospodářství s nízkou půdní vlhkostí v suchých oblastech)
- Obvazy (např. pro hojení popálenin nebo jiné těžko se hojící rány).

2.5 Využití hydrogelů

Polymery mohou reagovat na změnu vnějšího prostředí změnou svých vlastností a svého chování, jako např. změna struktury, prodyšnosti, mechanické pevnosti. Podle schopností reagovat na vnější podněty mohou být rozděleny do skupin polymerů ovlivněných teplotou, pH, iontovou silou, světlem, elektrickým a magnetickým polem [5]. U některých polymerů je možné pozorovat reakci na více druhů vnějších impulzů [36].

Velký potenciál pro uplatnění v oblasti medicíny mají převážně hydrogely citlivé na změnu pH a teploty. Z těchto důvodů bývají často použity pro řízené uvolňování léků. Hydrogely jsou také schopny reagovat na specifické molekuly, např. na glukózu nebo antigeny; z toho plyne, že mohou být použity jako biosenzory.

Častým nedostatkem hydrogelů citlivých na vnější prostředí je to, že doba odezvy na signál je v mnoha případech příliš dlouhá. Proto se stále vyvíjejí nové materiály, které budou i z tohoto ohledu splňovat náročné požadavky. Efektivní způsob, jak dosáhnout tohoto cíle, je vytvoření malých, tenkých prostředků implantátů (např. v podobě nanočástice). Nevýhodou v tomto případě je to, že systémy hydrogelů se potom stávají příliš křehké a nemají mechanickou pevnost potřebnou pro mnoho aplikací.

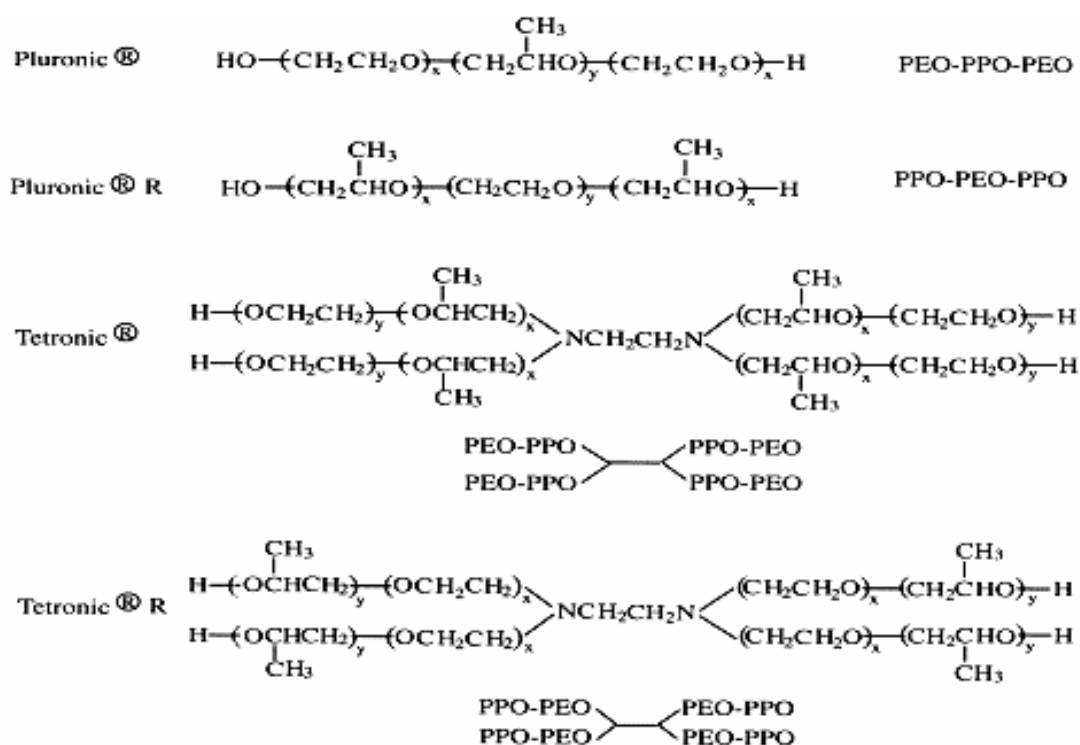
Využití hydrogelů jako vstřikovacích matric patří mezi jejich novější aplikace. Injekční podávání roztoku tvořící gel může nabídnout řadu výhod. Materiálem lze vyplnit jakýkoliv tvar vady, např. může obsahovat různé terapeutické látky (např. růstový faktor, antibiotikum). Obvykle neobsahuje zbytky rozpouštědel, která mohou být přítomna ve formované konstrukci a nakonec se nevyžaduje ani chirurgický zákrok pro umístění nebo vyjmutí [38]. Tzv. in situ hydrogely se uplatňují pro tvorbu makromolekulárních léků a v tkáňovém inženýrství [9]. Mechanismy, které mohou být zapojeny do utváření in situ gelu jsou následující: gelace v závislosti na změně teploty nebo pH, stupeň ionizace, změna v procesech rozpouštění a krystalizace [38].

2.5.1 Hydrogely citlivé na teplo

Teplota je nejrozšířenějším používaným environmentálním stimulem reagujících polymerních systémů. Změna teploty není jen relativně snadno kontrolovatelná, ale rovněž je snadno použitelná pro testy jak in vitro tak in vivo [17, 39].

Hydrogely citlivé na teplotu získaly značnou pozornost ve farmaceutické oblasti díky schopnosti těchto hydrogelů botnat nebo se smršťovat v důsledku změny okolní teploty tekutiny. V četných výzkumech byly studovány různé aplikace těchto hydrogelů, jako je regulace uvolňování látek, biosensory a buněčné kultury [1, 40].

Řada PEO-PPO blokových kopolymerů, které při tělesné teplotě tvoří gel, jsou komerčně dostupné pod názvy Pluronic[®] (nebo Poloxamers[®]) a Tetronics[®] (obr. 5) [39]. Potenciální nevýhodou poloxamer gelů je jejich slabá mechanická pevnost, rychlé narušení struktury a jejich biologická nerozložitelnost. Tento fakt brání využití jejich vysokomolekulárních polymerů [17]. Komplexní přehled o nových ABA-triblokových kopolymerů z biologicky rozložitelného hydrofilního polyesteru a poly(ethylenoxidu) byl publikován Kisselem [41].



Obr. 5: Komerční využívané PEO-PPO bloky kopolymerů [39]

2.5.2 Triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG

Syntézy nového typu biologicky rozložitelného kopolymeru PEG-PLGA-PEG byla zveřejněna jako první Jeongem [8, 42, 43]. Za laboratorní teploty zůstává vodný roztok kopolymeru tekutý, při tělesné teplotě se však z něho stává gel. Tento proces je vratný. Průběh změny stavu je zaznamenán ve fázovém grafu, kde v závislosti na koncentraci polymeru a dané teplotě jsou sledovány fázové přechody. Z grafu jsou určeny dvě důležité charakteristiky pro daný kopolymer, kterými jsou kritická gelační teplota (CGT) a kritická gelační koncentrace (CGC). Je to bod v grafu, který označuje nejnižší teplotu a koncentraci, při které se z roztoku začne tvořit gel. Jeong se zabýval určením vlivu molekulové hmotnosti PLGA na CGT a CGC. Dospěl k názoru, že zvyšující se molekulová hmotnost (2 320 – 2 840) způsobila posun CGC na nižší hodnotu (od 26 % až 15 %), přičemž CGT se nezměnila.

Vzhledem k tomu, že předchozí studie již ukázaly, že triblokový kopolymeru PEG-PLGA-PEG byl vhodný pro použití jako injekční systém, v další publikaci Jeong a kol. zkoumali formace gelu in situ u potkanů [44]. Byl proveden pokus na potkanech, kterým byl injekčně vpraven 33% hm. vodný roztok PEG-PLGA-PEG kopolymeru. Gel ukázal dobrou mechanickou pevnost a integrita gelu trvala déle než 1 měsíc. Studie rozkladu gelu in situ ukázaly, že přednostně docházelo ke snížení molekulové hmotnosti úseku bohatého na PEG.

2.5.3 Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA

Jako první syntetizovali hydrogel z triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA Zentner a kol. [48]. Tento kopolymer byl registrován jako ReGel® a byl vyvinut jako biologicky odbouratelný systém pro nosiče léků. Byl injektován jako kapalina a v závislosti na tělesné teplotě dochází k vytvoření gelu. Postupná degradace gelu umožnila řízené uvolňování léků ze zásob v rozmezí 1 až

6 týdnů. Těmito vlastnosti je ReGel ® vhodný pro lokální aplikaci nebo systematické podávání léků.

Kritický jev, který ovlivňuje vratný fázový přechod ve vodě, je rovnováha mezi hydrofobní a hydrofilní délkou bloku [24]. Triblokový kopolymer se zakládá na centrálním PEG bloku ($M_n = 1\,000$) s dvěma PLGA koncovými bloky o molekulové hmotnosti nad 1 600. Tyto kopolymery jsou nerozpustné ve vodě. Naopak triblokový kopolymer s bloky PLGA a molekulovou hmotností pod 900 je rozpustný ve vodě. Proto pouze triblokové polymery bloku PLGA s molekulovou hmotností v rozmezí od 900 do 1 600 vykazují termoreversibilní přechod solů na gel.

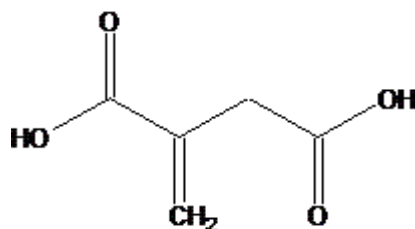
Je třeba poznamenat, že CGC pro ABA (PLGA-PEG-PLGA) typ triblokového kopolymeru je nižší než u BAB (PEG-PLGA-PEG) typu [49].

2.5.4 Kopolymery s poly(itakonovou kyselinou)

Itakonová kyselina (ITA) je nenasycená dikarboxylová organická kyselina, kterou lze získat z obnovitelných zdrojů, jako jsou sacharidy, melasa a hydrolyzovaný škrob [50]. Ionizovaná ITA se skládá ze dvou skupin, s odlišnými pK_a hodnotami, které mohou tvořit vodíkové vazby. V důsledku toho je ITA velmi hydrofilní a očekává se, že bude vykazovat vysokou biokompatibilitu [51].

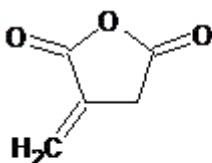
Itakonová kyselina snadno kopolymerizuje a poskytuje polymerní řetězec s karboxylovými skupinami. Tyto skupiny jsou vysoce hydrofilní a jsou schopny vytvářet vodíkové vazby s odpovídajícími skupinami. Malé množství kyseliny itakonové ve formě co-monomeru v gelu, zvyšuje stupeň botnění a citlivost na pH [52]. Zavádění co-monomerů může přispět ke vzniku vodíkových vazeb; tímto způsobem lze zvyšovat mechanickou pevnost s hydrogelem [51].

V posledních letech byla poly(itakonová kyselina) použita pro syntézu řady kopolymerních hydrogelů, jako je poly(N-isopropylakrylamiditakonová kyselina) (PNIPAM/ITA) [53], poly(N-vinyl-2-pyrrolidonitakonová kyselina) (PNVP/ITA) [52] a poly(2-hydroxyethylmethakrylitakonová kyselina) (PHEMA/ITA) [54]. Byly studovány jejich vlastnosti, botnění a reakce na teplotu.



Itakonová kyselina (ITA)

Obr. 6: Vzorec kyseliny itakonové



anhydrid kyseliny itakonové

Obr. 7: Vzorec anhydridu kyseliny itakonové

2.5.5 Diagramy fázového přechodu

Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA vykazuje dvě fáze přechodu, a to solu na gel a gelu na sol. Jak již bylo uvedeno výše, je zpevňování závislé na teplotě a také na koncentraci polymeru. Ve fázovém diagramu jsou zaznamenány přechody probíhající v závislosti na koncentraci a teplotě. Lze z něj určit kritickou gelační koncentraci (CGC) a kritickou gelační teplotu (CGT).

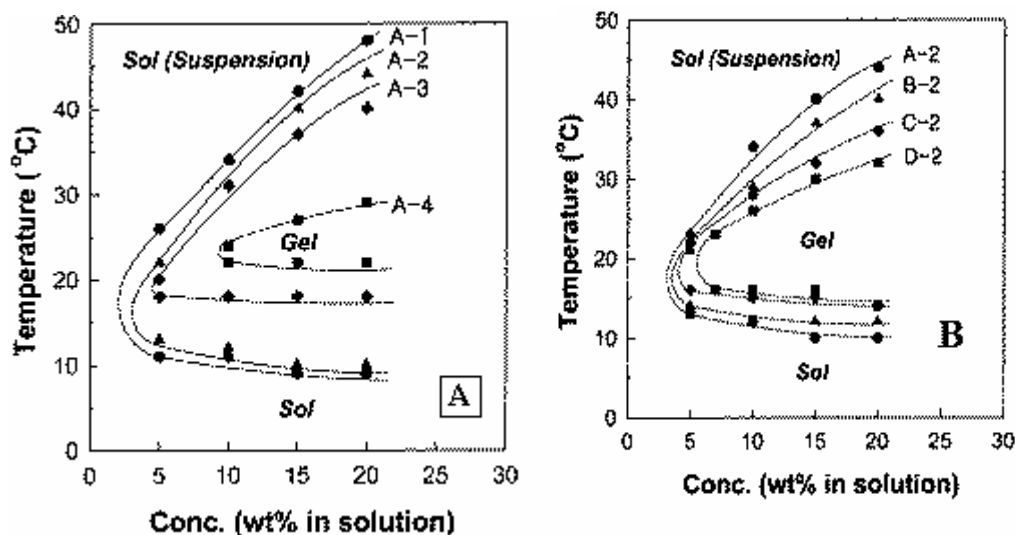
2.5.6 Vliv složení kopolymeru na přechod sol - gel

Složení triblokového kopolymeru výrazně ovlivňuje jeho gelační chování. Lze to pozorovat v posunu hodnot CGC a CGT a na změně tvaru křivky [8, 24, 42, 43, 44, 45, 46, 47].

Rovnováha hydrofobní a hydrofilní délky bloku má zásadní význam pro reverzibilní fázový přechod ve vodě. Pouze triblokový kopolymer s PLGA bloků s molekulovou hmotností v rozmezí od 900 do 1 600 vykazuje termoreverzibilní přechod solu na gel [24]. Hodnoty CGT a CGC jsou se snižujícím se poměrem PEG/PLGA vyšší, ale oblast tvorby transparentního gelu je výrazně užší (obr. 8, obr. 9 A). Při snížení poměru PLA/PGA nedochází k výraznému posunu CGT ani CGC, ale pouze k mírnému zúžení oblasti tvorby gelu (obr.9 B).

DLGA/GA (mol/mol)	3.4	3.0	2.5	2.0	1.5	1.3
PEG/PLGA (wt/wt)						
1/3.2 (1600-1000-1600)	I	I	I	I	I	I
1/3.0 (1500-1000-1500)	I	A-1	B-1	C-1	D-1	—
1/2.7 (1350-1000-1350)	—	A-2	B-2	C-2	D-2	—
1/2.5 (1200-1000-1200)	—	A-3	B-3	C-3	D-3	—
1/2.0 (1000-1000-1000)	—	A-4	B-4	C-4	D-4	S
1/1.8 (900-1000-900)	S	S	S	S	S	S

Obr. 8: Charakteristika sledovaných kopolymerů (PLGA-b-PEG-b-PLGA) různého složení ve vodném prostředí (I - nerozpustný ve vodě, S - rozpustný ve vodě) [24].



Obr. 9: Fázový diagram triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA: (A) porovnání různých poměrů PEG/PLGA; (B) porovnání různých poměrů LA/GA [24].

2.5.7 Metoda s obrácenými zkumavkami

Pro sestavení fázového sol-gel digramu se v literatuře nejčastěji používá jednoduchá metoda s tzv. obrácenými zkumavkami. Výhodou metody je možnost pozorovat i barevné přechody sledovaných roztoků, popř. jeho zakalení.

Vzorky o různých koncentracích jsou umístěny do 4ml lahviček. Vialky jsou upevněny do stojanu a pak ponořeny do vodní lázně. Teplota vodní lázně se mění po 1 °C . Vialky jsou při každé teplotě 10 minut temperovány. Po uplynutí tohoto intervalu jsou lahvičky vyjmuty a obrácením vialek pozorujeme pouhým okem, jak roztok tuhne. Z měření je pak určena hodnota kritické gelační koncentrace (CGC) a kritická gelační teplota (CGT) [65].

2.6 Metody charakterizace rozkladu polymerních produktů

Pro sledování průběhu degradace polymeru na bázi PEG a PLGA se používá několik analytických metod. Je to především kapalinová chromatografie a elektroforéza (analýza degradačních produktů polymeru) a gelová permeační chromatografie (sledování změn molekulové hmotnosti polymeru).

2.6.1 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k dělení směsi látek na základě jejich rozdílných vlastností. Vzorek je vnesen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, stacionární a mobilní. Pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a nakonec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zdržované [55].

2.6.1.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod existuje velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek:

- Podle skupenství mobilní fáze:
 - Kapalinová chromatografie (*Liquid Chromatography – LC*) – mobilní fází je kapalina.
 - Plynová chromatografie (*Gas Chromatography – GC*) – mobilní fází je plyn.
- Podle uspořádání stacionární fáze:
 - Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).
 - Plošné techniky:
 - Papírová chromatografie (*Paper Chromatography – PC*) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.
 - Tenkovrstvá chromatografie (*Thin Layer Chromatography – TLC*) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochem podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii).
- Podle povahy děje, který převládá při separaci:

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.

- Rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fází (kapalina) a mobilní fází (kapalina nebo plyn).
- Adsorpční chromatografie – o separaci rozhodují různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka).
- Afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu)
- Iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku.
- Gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fází (gelu); menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt) [55].

2.6.1.2 Separace pomocí HPLC

Kapalinová chromatografie se využívá k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní. Kapalná mobilní fáze zde hraje důležitou roli, je hlavním faktorem ovlivňujícím retenci jednotlivých složek směsi, a tím jejich vzájemné rozdělení. Vysoko účinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která využívá kolony s vhodnou stacionární fází. Vlastnosti těchto fází umožňují dosáhnout rychlé separace složitých směsí s vysokým rozlišením zón. Kolony se stacionární fází obsahují velmi malé částice (3-10 μm), které tvoří homogenní náplň, díky úzké distribuci jejich velikosti. Účinnost takových kolon se pohybuje v rozsahu 30 – 90 000 teoretických pater na metr [56]. Proto je pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze zapotřebí protlačit ji kolonou pomocí čerpadla vysokým tlakem [55].

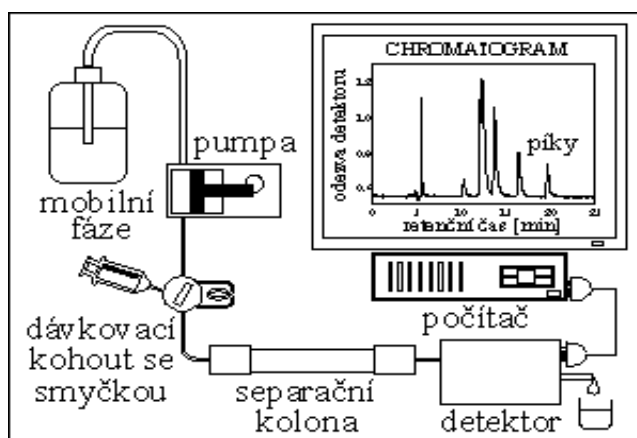
Při stanovení degradačních produktů PLGA-PEG-PLGA se využívá chromatografie na obrácených fázích. Stacionární fáze je nepolární (uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagelu) a mobilní fáze je polární (voda, acetonitril). Jedná se o rozdělovací kapalinovou chromatografii, při které se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalné fáze a to mobilní, která unáší analyty a stacionární fází, která je pevně zakotvena na pevném nosiči. Růst polariry mobilní fáze vede k růstu retenčních časů analytů. Retence složek roste s jejich klesající polaritou a zvětšující se nepolární částí molekul. Separace na obrácených fázích se hodí pro látky jakékoliv polariry. Je univerzální technikou pro separaci nepolárních, polárních a disociovaných vzorků [55].

Kapalinový chromatograf je tvořen zásobníky mobilní fáze, směšovacím zařízením, čerpadlem, dávkovacím zařízením, termostatem, kolonou a detektorem.

Pokud se během separace pomocí HPLC mění složení mobilní fáze, jedná se o tzv. gradientovou eluci, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Při izokratické eluci se složení mobilní fáze nemění.

K dávkování vzorku se dnes ve většině případů používá automatický dávkovač. Podle zvoleného systému je možné nadávkovat velké rozmezí objemu vzorku (od jednotek μl po stovky μl).

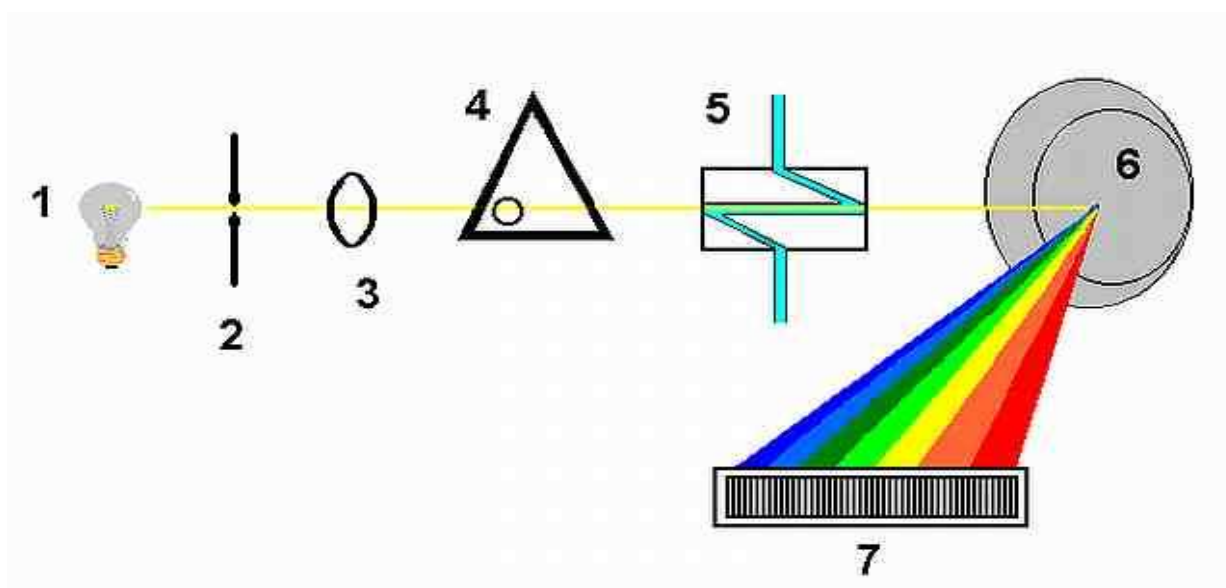
Jako separační kolony se používají náplňové kolony lišící se délkou, vnitřním průměrem a náplní. Kolony jsou většinou nerezové. Jako ochrana hlavní kolony se hojně využívají předkolony, které zabraňují kontaminaci pocházející z různých nečistot.



Obr. 10: Schéma kapalinového chromatografu [57]

2.6.1.3 Detektory pro HPLC

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost [55]. K dalším požadovaným vlastnostem patří rychlá a lineární odezva, vysoká citlivost, nízký šum a minimální vliv změny tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty. Nejčastěji používaným detektorem je v HPLC spektrofotometrický detektor umístěný v diodovém poli (*Diode Array Detector – DAD*), detektor fluorescenční (FLD) a hmotnostní (*Mass Spectrometry - MS*) [56]. Spektrofotometrický detektor patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbance eluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru by měla být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kyvety, kterou prochází paprsek. Lineární diodové pole je multikanálový detektor, jehož elementy měří najednou paprsek rozložený disperzním prvkem. Obsahuje mnoho malých fotodiod na jediném křemíkovém čipu. Nejběžněji užívaný počet je 1 024 fotodiod. Nejdokonalejší fotometrické detektory jsou schopny pomocí diodového pole proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. Jeho detekční limit je až 10^{-10} g/ml, citlivost a selektivita je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu. DAD detektor je tvořen zdrojem záření, zdrojovou čočkou, průtočnou kyvetou, mřížkou a fotodiodovým polem [55].



Obr. 11: Schéma spektrofotometrického detektoru [58]

2.6.1.4 Gelová permeační chromatografie

U gelové permeační chromatografie (*Gel Permeation Chromatography* – GPC neboli *Size Exclusion Chromatography* – SEC) se využívá separace látek podle velikosti molekul. Dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrnny gelu a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř póru gelu. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání (permeace) do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly. Interakce molekul analytů se stacionární fází nenastává.

Požadavky na vlastnosti gelů jsou velmi náročné. Matrice gelu musí být inertní k analyzované látce i k mobilní fázi. Gel musí odolávat zvýšené pracovní teplotě a nesmí se během separace rozkládat a uvolňovat produkty rozkladu [59]. Výběr gelu se volí podle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely, například *Sephadex* (dextrin zesítený epichlorhydrinem). Mobilní fází je voda s případným přídavkem organického rozpouštědla. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely. Mezi ně patří kopolymery styrenu a divinylbenzenu (*Styragel*). Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel jsou vhodné pro separaci hydrofobních i hydrofilních látek [55].

Spojení této techniky s vhodným detektorem může být exaktně určeno rozložení molekulární hmotnosti ve vzorcích. Ve většině případů je syntéza makromolekulární sloučeniny výsledkem tvorby polymerních řetězců s různou délkou, jinými slovy, jsou vytvořeny polymerní řetězce lišící se molekulovou hmotností. Statistický charakter reakce, podle kterého jsou makromolekuly připraveny, je příčinou relativně široké distribuce molekulové hmotnosti konečného polymerního vzorku. Rozmezí molekulové hmotnosti a distribuce průměrné molekulové hmotnosti jsou důležité pro studii polymerních mechanismů i pro charakteristiku každého polymeru. Rozdíl mezi nízkomolekulární sloučeninou a polymerem spočívá v tom, že většina vlastností polymerů závisí na molekulové hmotnosti polymeru, případně na distribuci molekulové hmotnosti (polydisperzity). Průměrná molekulová hmotnost se vypočte podle rovnic (viz níže uvedených) a je charakterizována v různých místech svého vrcholu.

$$\text{Průměrná číselná molekulová hmotnost: } M_n = \frac{\sum h(M) \cdot M}{\sum h(M)} = \frac{\sum w(M)}{\sum w(M) / M} \quad (1)$$

$$\text{Průměrná hmotnostní molekulová hmotnost: } M_w = \frac{\sum h(M) \cdot M^2}{\sum h(M)} = \frac{\sum w(M) \cdot M}{\sum w(M)} \quad (2)$$

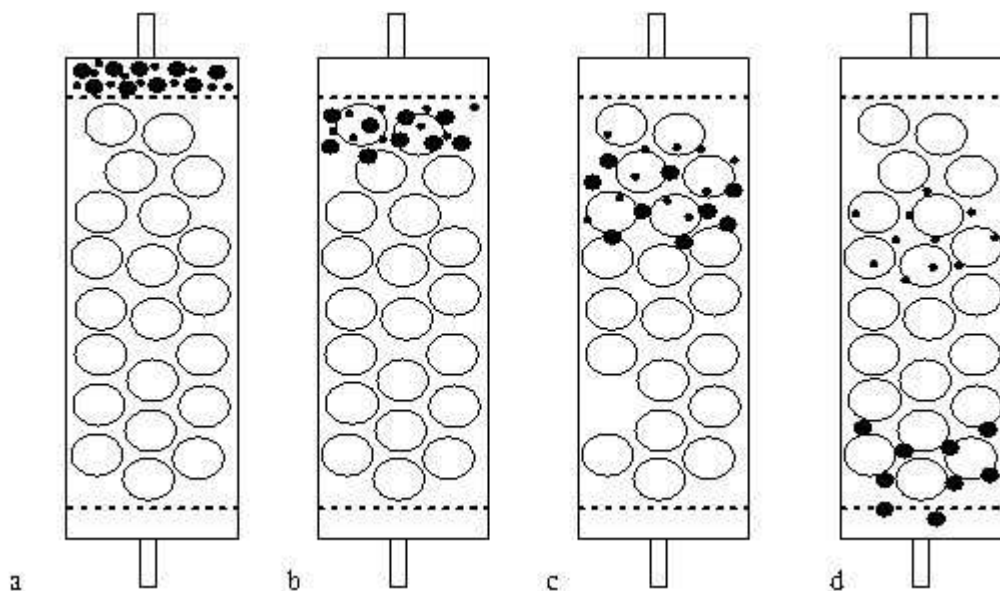
$$\text{Molekulová hmotnost z-průměru: } M_z = \frac{\sum h(M) \cdot M^3}{\sum h(M)^2} = \frac{\sum w(M) \cdot M^2}{\sum w(M) \cdot M} \quad (3)$$

Z výše uvedených vztahů vyplývá, že musí platit $M_z \geq M_w \geq M_n$.

$$\text{Distribuce molekulové hmotnosti je obvykle popsána indexem polydisperzity: } P = \frac{M_w}{M_n} \quad (4)$$

Zjednodušené ideální dělení směsi dvou velikostí makromolekul je prezentováno na obrázku 12. Na prvním obrázku je vzorek zobrazen ihned po nástřiku v čele kolony. Kapalná mobilní fáze prochází celým sloupcem kolony. Mobilní fáze má přesně definovaný průtok, který vytváří tlakový gradient v celé délce kolony. Na dalším snímku vzorek polymerních molekul prochází kolonou v důsledku tohoto tlakového gradientu. Částice stacionární fáze (náplň kolony) je porézní s přesně definovanou velikostí pórů. Malé makromolekuly jsou schopny proniknout do těchto pórů a takto

projit kolonou; větší molekuly jsou příliš velké, aby pronikly do pórů gelu a tak zůstávají v intersticiálním prostoru, jak je uvedeno na obrázku (12 c). Velké molekuly se tak pohybují mnohem rychleji, protože je nebrzdí pronikání přes póry gelu. Nakonec jsou obě molekulární velikosti rozděleny do dvou odlišných chromatografických pásem, jak je uvedeno na příslušném obrázku (12 d). Reálný GPC chromatogram obvykle vykazuje kontinuitu v molekulové hmotnosti složek obsažených ve vrcholu píku [59].



Obr. 12: Princip dělení pomocí GPC [59]

Nejjednodušší způsob, jak vytvořit kalibraci, z nichž lze získat molární hmotnost pro daný eluční objem, je metoda vnějších standardů. Tato metoda může být použita pouze v případě, že je k dispozici řada standardů s úzkou distribucí o známých molekulových hmotnostech (MMD). Vzhledem k tomu, že se příslušné standardy staly komerčně dostupnými pro mnoho polymerů, lze tuto kalibraci běžně využívat. Obvykle se používají standardy jako jsou polystyren, poly(methylmethakrylát), polyisopren, polybutadien, poly(ethylenoxid), poly(methakrylová kyselina), atd. [60].

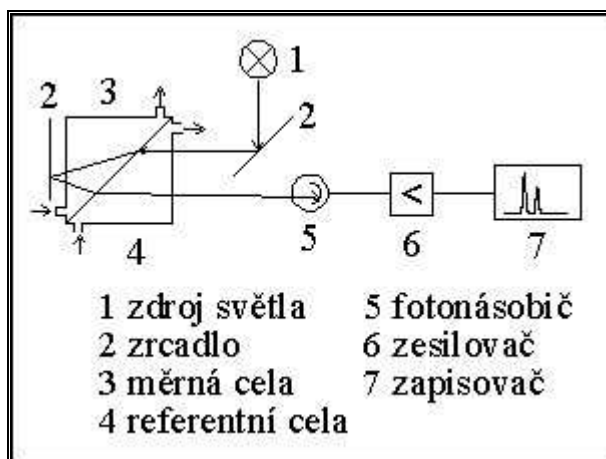
2.6.2 Použití GPC pro sledování degradace polymerů

Proces degradace je charakterizován poklesem molekulové hmotnosti, což představuje nárůst polydisperzity ($PD = M_w/M_n$) a ztrátu hmotnosti polymeru provázenou zvýšením koncentrace v okolním prostředí o krátké molekulové řetězce. GPC lze používat pro sledování degradace chování triblokového kopolymeru. Zbytek hydrogelu z rozkladu je podroben lyofilizaci a analýze pomocí GPC.

Pro stanovení molekulové hmotnosti a polydisperzity GPC systému se doporučuje vybavení refraktometrickým detektorem. Jako mobilní fáze se používá tetrahydrofuran. Průměrné molekulové hmotnosti se vypočítají s využitím řady norem polystyrenu [28, 30, 31, 43, 61, 62, 64].

2.6.2.1 Refraktometrický detektor

U gelové permeační chromatografie se nejvíce používá refraktometrický detektor (obr. 13) (*Refractive Index detector – RID*), který měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se odchylka. Tento typ detektoru sice není příliš citlivý (detekční limit 10^{-7} g.ml⁻¹), ale je velmi univerzální. Při jeho použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu [55].

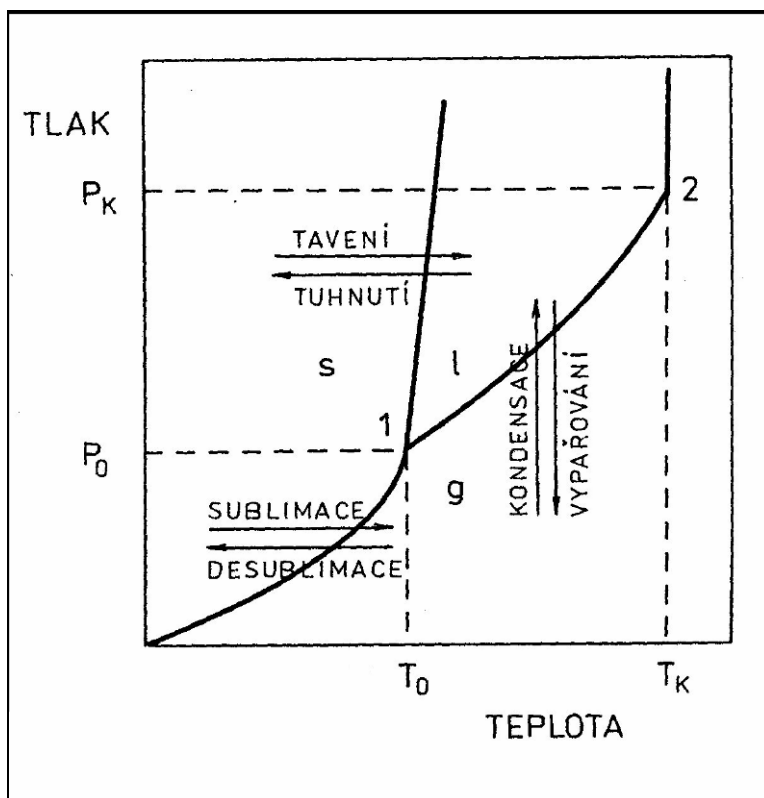


Obr. 13: Schéma refraktometrického detektoru [57].

2.6.3 Lyofilizace

Sublimace, resp. desublimace patří mezi difúzní operace, které probíhají v oblasti relativně nízkých teplot a tlaků. Jejich průběh je ovlivňován přenosem hmoty a tepla na fázovém rozhraní tuhá fáze-plyn a v případě lyofilizace sdílením hmoty a tepla v porézní, dynamicky se měnící struktuře tuhé fáze.

Sublimační sušení materiálu je ve farmaceutickém průmyslu nazýváno lyofilizací. Lyofilizace tedy představuje proces odvodňování preparátu v zamrznutém stavu, kdy led, nacházející se uvnitř kapilár a pórů, sublimuje do parní fáze při teplotě a tlaku nižším než jsou podmínky odpovídající trojnému bodu vody. Pro ilustraci je trojný fázový diagram znázorněn na obr. 14, kde jsou vyznačeny jednotlivé fázové přechody [63].



Obr. 14: Fázový diagram hmoty (1 – trojný bod, 2 – kritický bod) [63]

Hlavní přednost lyofilizace spočívá v následujících směrech:

- Za podmínek nízkých teplot a tlaků jsou potlačeny chemické změny složek sušeného materiálu včetně jeho oxidace vzduchem;
- Při procesu jsou výrazně sníženy ztráty těkavých složek sušeného materiálu;
- Při sušení lze zachovat sterilitu produktu;
- Vysušený materiál je disperzní, nedochází ke koagulaci jeho složek a je vyloučena aglomerace jednotlivých částic materiálu.

Vlhkost, zadržovaná sušeným materiálem, může mít následující formy:

- Chemicky vázaná voda (včetně krystalové vody),
- Adsorbovaná voda na povrchu pórezního materiálu,
- Voda vázaná kapilárními silami v pórech materiálu,
- Osmoticky vázaná voda (voda v roztoku spolu s dalšími složkami).

První operací při sublimačním sušení je zmrazení výchozího materiálu. V závislosti na klesající teplotě dochází k jevům, uvedeným v tabulce 3.

Tabulka 3: Etapy přecházející sublimačnímu sušení materiálu [63]

teplota [°C]	jev
-1 → -1,5	ochlazování materiálu
-1 → -3	zmrznutí strukturně volné vody
-2 → -20	zamrzání imobilizované nebo volné vlhkosti
-20	eutektické hranice pro roztoky soli v buňkách resp. tkáních
-20 → -65	vymrzání vázané vlhkosti
-65 a níže	sublimační sušení

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje, zařízení, software

3.1.1 Příprava vzorků

- analytické váhy KERN 770, Version 2.3, Německo
- pH metr pH 730, wtw series, inoLab, Německo
- inkubátor Nüve cooled incubator ES 110, Turecko
- magnetická míchačka s ohřevem a elektrickým kontaktním teploměrem IKA ETS-D5, Německo
- lyofilizátor Freezone 4.5 Freeze Dry System, Labconco, USA
- běžné analytické vybavení

3.1.2 Vysoko účinná kapalinová chromatografie

- kapalinový chromatograf Agilent 1 100 Series, USA
 - gradientová pumpa
 - vakuový odplyňovač
 - automatický dávkovač
 - termostat kolon
 - UV-VIS detektor s diodovým polem
- kolona Restek Aqueous C18, velikost 250×4,6 mm, velikost částic 5 µm, Restek, USA
- předkolona Restek Aqueous C18, velikost 4×2 mm, velikost částic 5 µm, Restek, USA

3.1.3 Gelová permeační chromatografie

- kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, USA
 - izokratická pumpa
 - vakuový odplyňovač
 - automatický dávkovač
 - termostat kolon
 - refraktometrický detektor
- kolona PLgel Mixed C, velikost 300×7,5 mm, velikost částic 5 µm, Polymer Laboratories, USA
- předkolona PLgel Mixed C, velikost 50×7,5 mm, velikost částic 5 µm, Polymer Laboratories, USA

3.1.4 Software pro zpracování a prezentaci dat

- Microsoft® Word 2003
- Microsoft® Excel 2003
- Chemstation Rev. A 02.01.
- Mn Agilent GPC – Addon Rev. A 02.02.
- Chemstation Rev. B 01.01.

3.2 Používané chemikálie a standardy

3.2.1 Chemikálie

- kyselina mravenčí, čistota p.a., Riedel-de Haën, Německo
- tetrahydrofuran, čistota gradient grade for liquide chromatography, LiChrosolv, Merck KGaA, Německo
- acetonitril, čistota gradient grade for liquide chromatography, Lach:ner, Česká republika
- dihydrofosforečnan draselný, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo
- hydrogenfosforečnan draselný, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo

3.2.2 Standardy

- kyselina glykolová p.a., Merck KGaA, Německo
- D, L-kyselina mléčná 90%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- polystyrenové standardy EasyCal Mp = 580 – 377 400, Polymer Laboratories, USA

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Vlastnosti zkoumaných vzorků

Tabulka 4: Přehled vlastností zkoumaných kopolymerů

vzorek	teoretický poměr PLGA/PEG	teoretický poměr LA/GA	Mn [g/mol]	Mn [g/mol] PEG
210806 PLGA-PEG- PLGA	2,5	3	6 310	1 500
280806 ITA-PLGA-PEG- PLGA-ITA	2,5	3	6250	1 500
220107 PLGA-PEG- PLGA	2,5	3	7 108	1 500
180907 ITA-PLGA-PEG- PLGA-ITA	2,5	3	6 773	1 500

3.3.2 Stanovované analyty a jejich vlastnosti

3.3.2.1 Kyselina mléčná

- ($C_3H_6O_3$)
- D,L-2-hydroxypropanová kyselina
- $M_r = 90,08 \text{ g.mol}^{-1}$
- Teplota tání 53°C (pro racemickou směs $T_t = 16,8^\circ\text{C}$).
- Teplota varu 122°C
- Hustota $1,209 \text{ g.cm}^{-3}$
- V pevném stavu bílý prášek. Vyskytuje se ve stavu kapalném jako bezbarvá hygroscopická kapalina.

3.3.2.2 Kyselina glykolová

- ($C_2H_4O_3$)
- Hydroxyethanová kyselina
- $M_r = 76,05 \text{ g.mol}^{-1}$
- Teplota tání $70 - 74^\circ\text{C}$
- Hustota $1,27 \text{ g.cm}^{-3}$
- Bílý prášek dobře rozpustný ve vodě.

3.3.3 Příprava vzorků

Kopolymer PLGA-PEG-PLGA i kopolymer modifikovaný kyselinou itakonovou je vysoce viskózní. Pro přípravu vzorků bylo zapotřebí vždy navážít určité množství těchto kopolymerů pro danou hmotnostní koncentraci. K naváženému množství kopolymeru bylo přidáno vypočtené množství Milli-Q vody. Takto připravené vzorky se nechaly za laboratorní teploty rozpouštět ve vialkách i několik dní.

3.3.4 Stanovení kritické koncentrace gelu a kritické teploty gelu

Vzorky o různých koncentracích byly umístěny do 4ml vialek. Vialky byly upevněny do stojanu a pak ponořeny do vodní lázně. Měření bylo prováděno v rozmezí teplot od 23°C do 59°C . Teplota vodní lázně byla zahřívána po 1°C . Tento krok trvá vždy pět minut při stálé teplotě. Po uplynutí tohoto intervalu byly lahvičky vyjmuty. Byla pozorována změna viskozity a zbarvení každého vzorku.

3.3.5 Degradace vzorků

Byly připraveny zásobní vzorky PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA kopolymerů o různých koncentracích. Do vialek bylo pipetováno $300 \mu\text{l}$ od každého vzorku. Takto byly vialky ponechány v inkubátoru, dokud se z roztoku nestal gel. Následně bylo přidáno $700 \mu\text{l}$ temperovaného fosfátového pufru o pH 7,4. Připravené vzorky byly ponechány v inkubátoru při 37°C . Od prvního dne počátku inkubace bylo odebíráno $400 \mu\text{l}$ fosfátového pufru, který tvořil fázové rozhraní hydrogelu a samotného fosfátového pufru. Tento odebraný pufr byl následně podroben HPLC analýze a zbytek hydrogelu byl lyofilizován.

3.3.6 Identifikace a kvantifikace degradačních produktů na HPLC

Odebraný fosfátový pufr, který obsahoval degradační produkty, byl analyzován pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s DAD detektorem na přístroji Agilent 1100 Series (obr.č. 15). Analýza byla prováděna na koloně Restek Aqueus C18, která byla opatřena předkolonou.



Obr. 15: Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series

3.3.6.1 Nastavení HPLC

- mobilní fáze: 0,01 mol/l roztok kyseliny mravenčí, acetonitril
- poměr mobilních fází: (1:99) 0,01M HCOOH : acetonitril
- průtok mobilní fáze: 0,8 ml/min
- nástřik: 5 μ l
- teplota kolony: 30 °C
- vlnová délka: 192 nm
- izokratická eluce

3.3.7 Příprava vzorků na GPC analýzu

Po odebrání 400 μ l fosfátového pufru byla inkubace vzorku ukončena. Po ukončení inkubace byl každý vzorek podroben lyofilizaci. Před lyofilizací byl vzorek zmražen v mrazničce na teplotu mínus 30 °C. Samotná lyofilizace probíhala při teplotě -80 °C a tlaku 15 Pa po dobu 24 hodin. Následně bylo z každého lyofilizovaného vzorku odebráno zhruba 5 μ g degradovaného kopolymeru, který byl rozpuštěn v 1 ml tetrahydrofuranu. Po rozpuštění byl vzorek podroben analýze pomocí gelové permeační chromatografie.

3.3.8 Kvantifikace poklesu molekulové hmotnosti degradovaných vzorků na GPC

Lyofilizované a rozpuštěné vzorky v tetrahydrofuranu byly analyzovány pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickým detektorem na přístroji Agilent 1 100 Series.

Analýza byla prováděna na koloně PLgel MixedC, před níž byla zařazena předkolona. Jako standardy byly použity polystyrenové standardy EasyCal.

3.3.8.1 Nastavení GPC

- mobilní fáze: tetrahydrofuran
- průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- nástřik: 50 μ l
- teplota kolony: 30 °C
- teplota detektoru: 30 °C



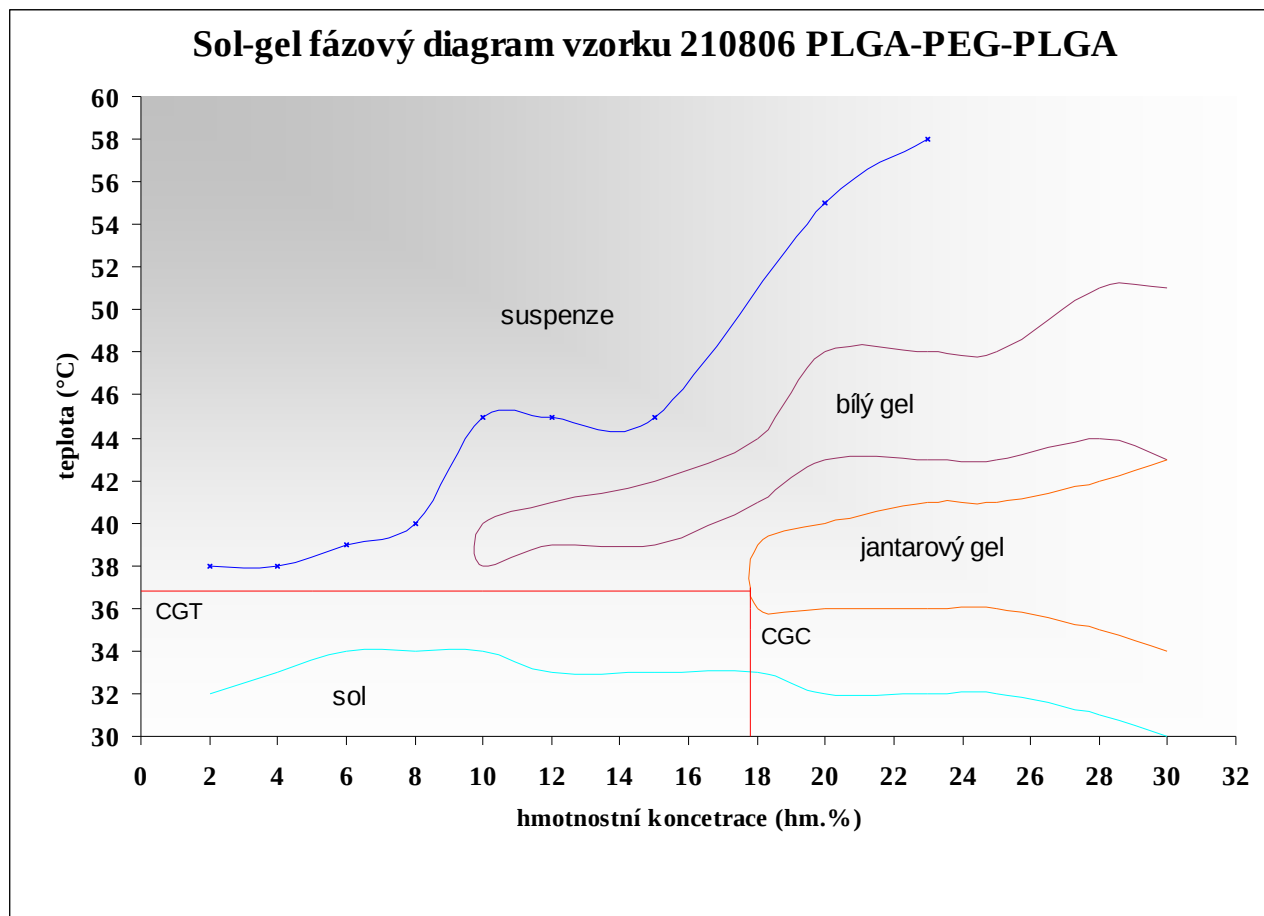
Obr. 16: Gelová chromatografie Agilent 1 100 Series

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

U každého kopolymeru byla nejprve zjištěna kritická gelační koncentrace a kritická gelační teplota. Následně byly připraveny různé koncentrace těchto kopolymerů, které byly podrobeny degradaci ve fosfátovém pufru. Každý den v průběhu degradace byl odebírán přesně definovaný objem směsi pufru a uvolněných kyselin. Po ukončení degradace byly vzorky lyofilizovány. Změna molekulové hmotnosti degradovaných kopolymerů byla zjišťována na GPC. Množství uvolněných kyselin bylo prokázáno pomocí HPLC.

Výsledky měření byly zpracovány do následujících tabulek a grafů pro každý kopolymer.

4.1 Kopolymer 210806 PLGA-PEG-PLGA



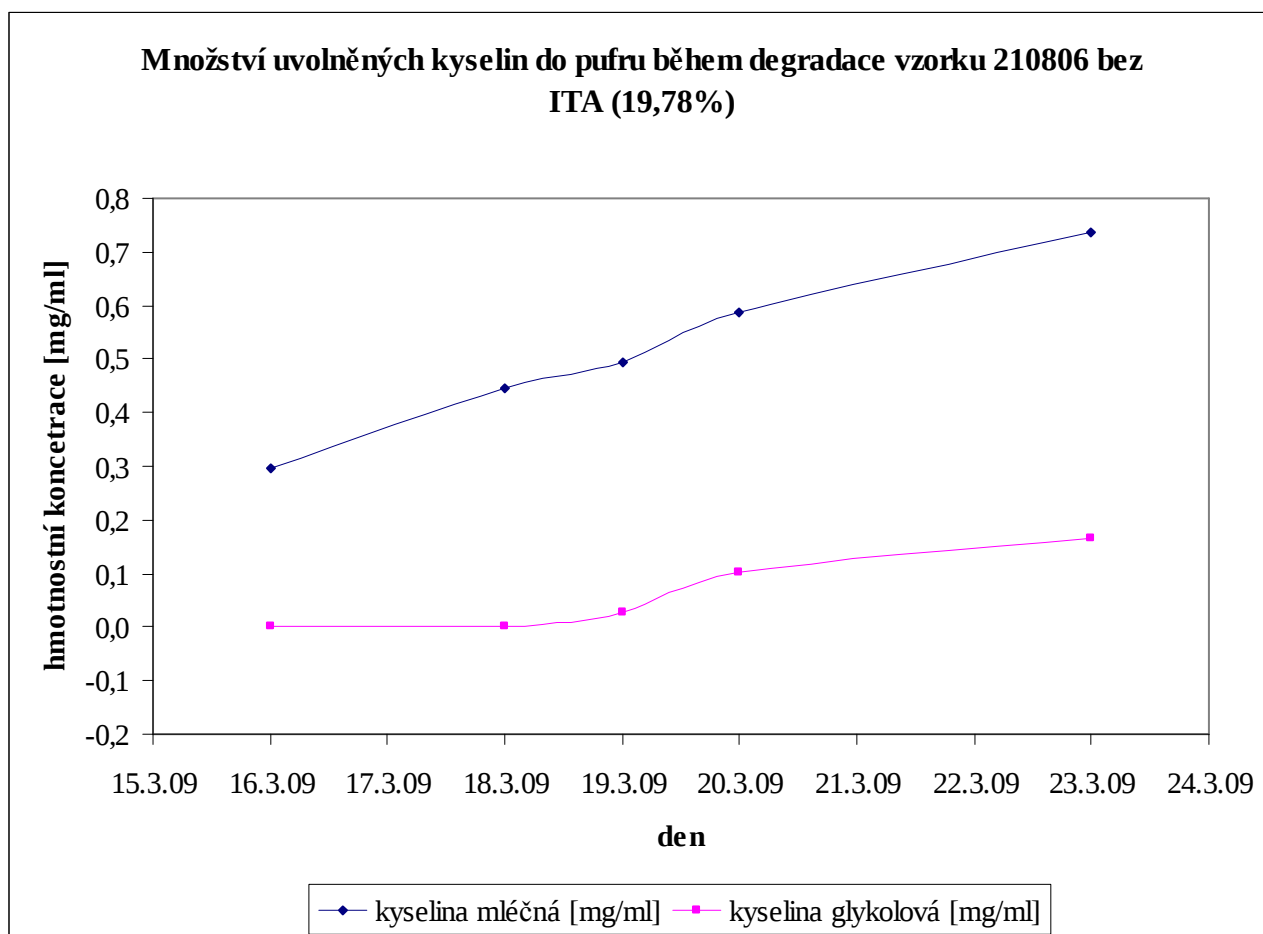
Obr. 17: Sol-gel diagram pro kopolymer PLGA-PEG-PLGA 210806

Během sledování průběhu gelace roztoků kopolymeru bylo pozorováno několik přechodů fázových i barevných. Pro naše sledované aplikace je důležitá forma gelu jantarové barvy. V této fázi byl ponechán vzorek na degradaci.

Ze sol-gel fázového diagramu pro kopolymer 210806 PLGA-PEG-PLGA vyplývá, že kritická gelační koncentrace se pohybuje okolo 18% hm. a kritická gelační teplota je 37 °C.

Tabulka 5: Přehled výsledků HPLC analýzy pro vzorek PLGA-PEG-PLGA 210806 s hmotnostní koncentrací (19,78%)

den odběru	kyselina mléčná [mg/ml]	kyselina glykolová [mg/ml]	kyselina mléčná [mg v 400 μ l]	kyselina glykolová [mg v 400 μ l]
16. 3. 2009	0,2967	0	0,1187	0
17. 3. 2009	nenaměřeno	nenaměřeno	nenaměřeno	nenaměřeno
18. 3. 2009	0,4461	0,0031	0,1785	0,0012
19. 3. 2009	0,4956	0,0263	0,1982	0,0105
20. 3. 2009	0,5885	0,1021	0,2354	0,0408
23. 3. 2009	0,7352	0,1666	0,2941	0,0666



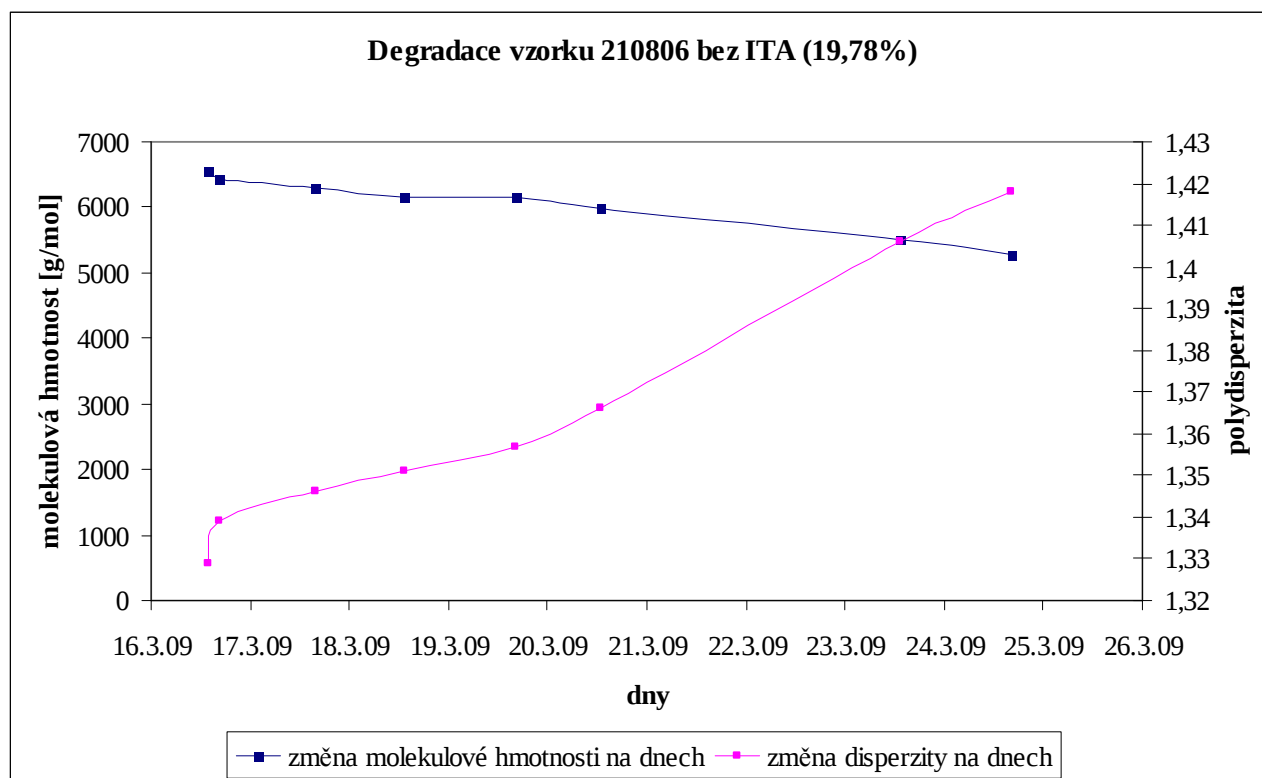
Obr. 18: Graf závislosti koncentrace kyseliny glykolové a mléčné na době degradace polymeru PLGA-PEG-PLGA

V tabulce č. 5 a grafu (obr. 18) (kopolymer PLGA-PEG-PLGA 210806) je prezentována závislost změn koncentrací kyseliny glykolové a mléčné v pufru během několika dní. Z grafu je patrné, že v roztoku je více kyseliny mléčné. To je způsobeno zejména složením výchozího kopolymeru a daným množstvím kyseliny mléčné, které je trojnásobné než kyseliny glykolové. Pro

den 17. 3. 2009 nebylo možné vyhodnotit výsledek, pravděpodobně z důvodu špatného odběru vzorku.

Tabulka 6: Přehled výsledků GPC analýzy pro vzorek 210806 PLGA-PEG-PLGA (19,78%)

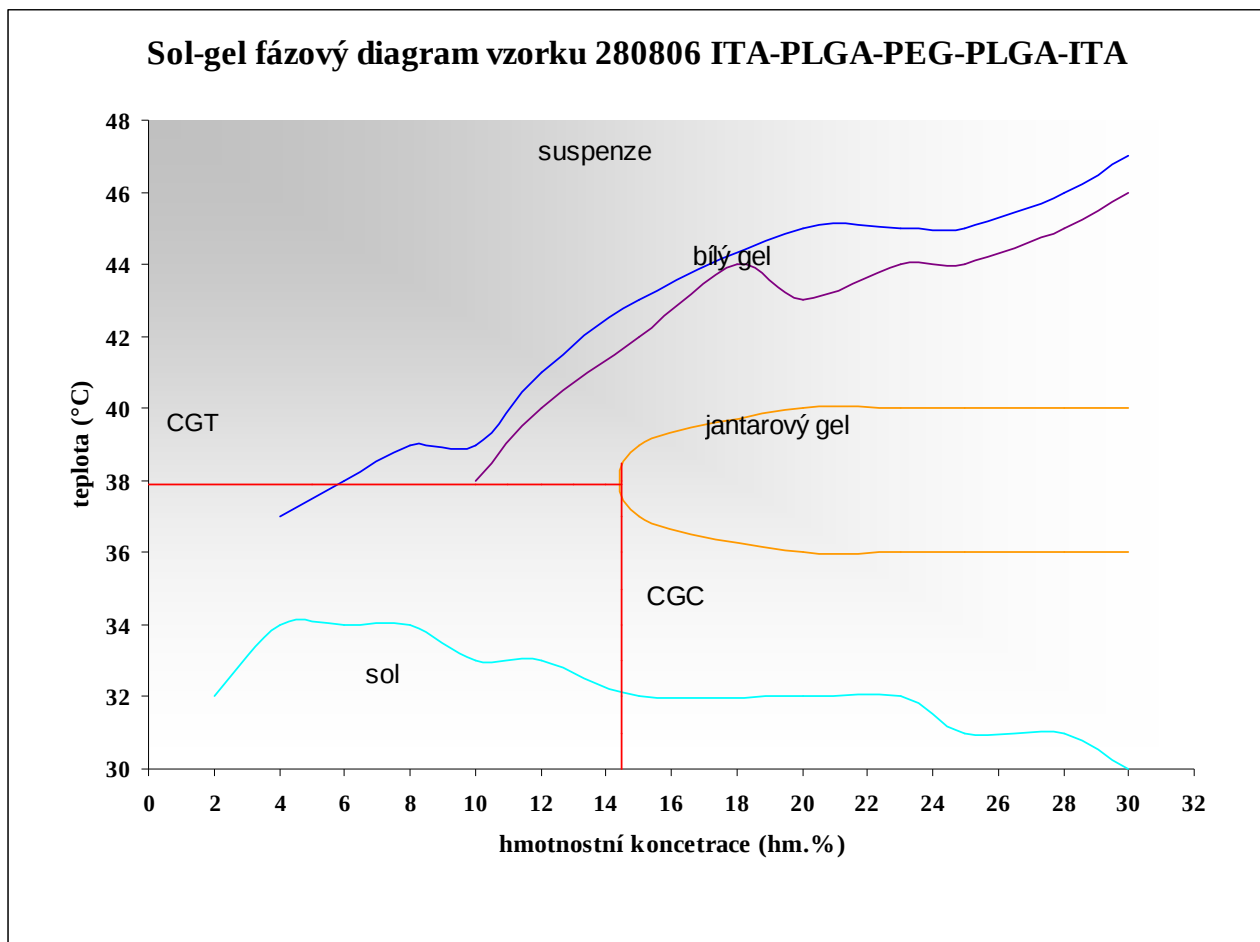
den	vzorek 210806 bez ITA (19,78%)	
	Mn [g/mol]	polydisperzita
16. 3. 2009	6 438	1,339
17. 3. 2009	6 296	1,346
18. 3. 2009	6 151	1,351
19. 3. 2009	6 151	1,357
20. 3. 2009	5 981	1,366
23. 3. 2009	5 491	1,406
24. 3. 2009	5 286	1,418



Obr. 19: Závislost molekulové hmotnosti a polydisperzity na době degradace

Z tabulky číslo 6 a z následujícího grafu vyplývá, že v průběhu degradace kopolymeru PLGA-PEG-PLGA 210806 s hmotnostní koncentrací 19,78% klesá střední číselná molekulová hmotnost a zároveň stoupá polydisperzita, která je dána poměrem průměrné molekulové váhy a střední číselnou molekulovou hmotnostní kopolymeru. Dochází tedy ke štěpení dlouhého polymerního řetězce na kratší řetězce. S postupující dobou degradace je pokles molekulové hmotnosti rychlejší.

4.2 Kopolymer 280806 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA

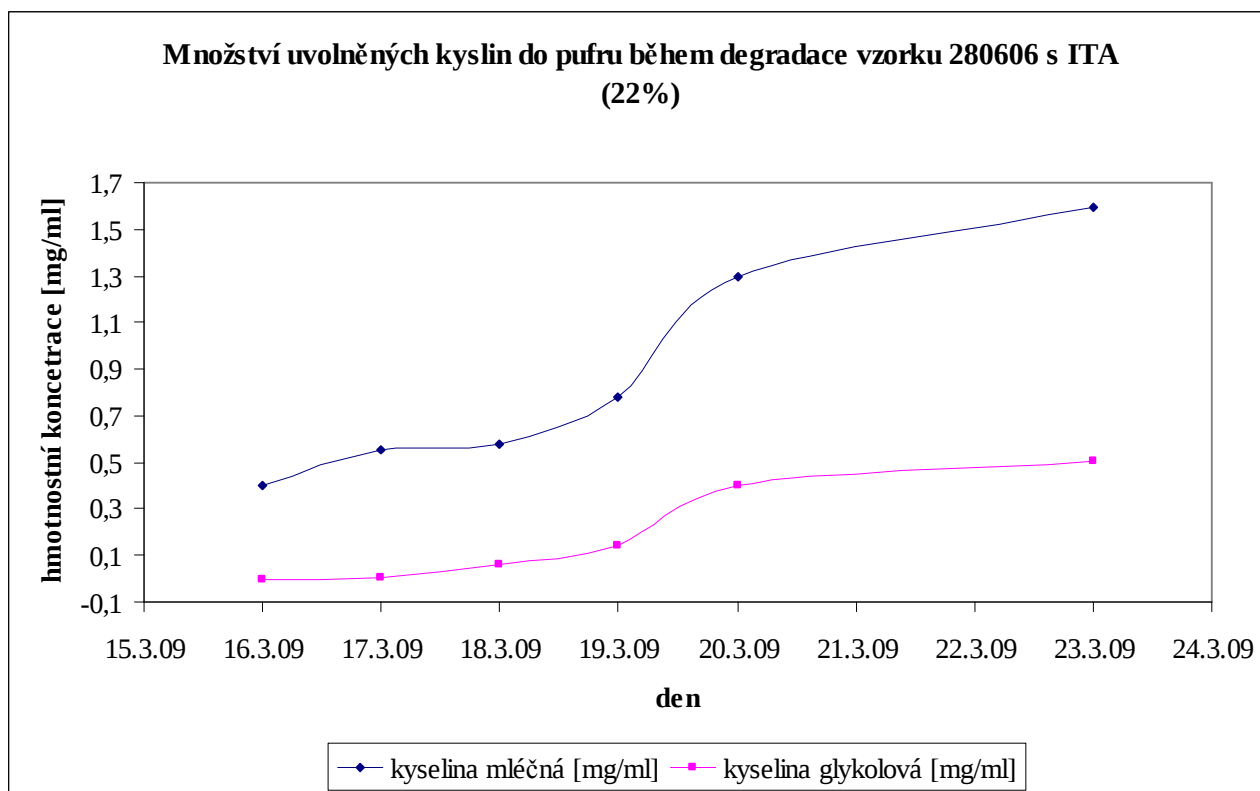


Obr. 20: Sol-gel diagram pro kopolymer PLGA-PEG-ITA 280806

Na sol-fázovém diagramu pro kopolymer PLGA-PEG-ITA 280806 je znázorněna kritická gelační koncentrace, která se pohybuje okolo 14% hm. a kritická gelační teplota, která dosahuje až 38 °C. V oblasti suspenze už docházelo k rozdělení roztoku na 2 fáze, pevnou – polymer a kapalnou – vodu. Při koncentracích nižších než 10% nedošlo vůbec k vytvoření gelu.

Tabulka 7: Přehled výsledků HPLC analýzy pro vzorek ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 280806 s hmotnostní koncentrací (22%)

den odběru	kyselina mléčná [mg/ml]	kyselina glykolová [mg/ml]	kyselina mléčná [mg v 400μl]	kyselina glykolová [mg v 400μl]
16. 3. 2009	0,4002	n. d.	0,1601	n. d.
17. 3. 2009	0,5569	0,0019	0,2227	0,0007
18. 3. 2009	0,5761	0,0598	0,2304	0,0239
19. 3. 2009	0,7831	0,1454	0,3132	0,0581
20. 3. 2009	1,2935	0,4045	0,5174	0,1618
23. 3. 2009	1,5953	0,5052	0,6381	0,2021

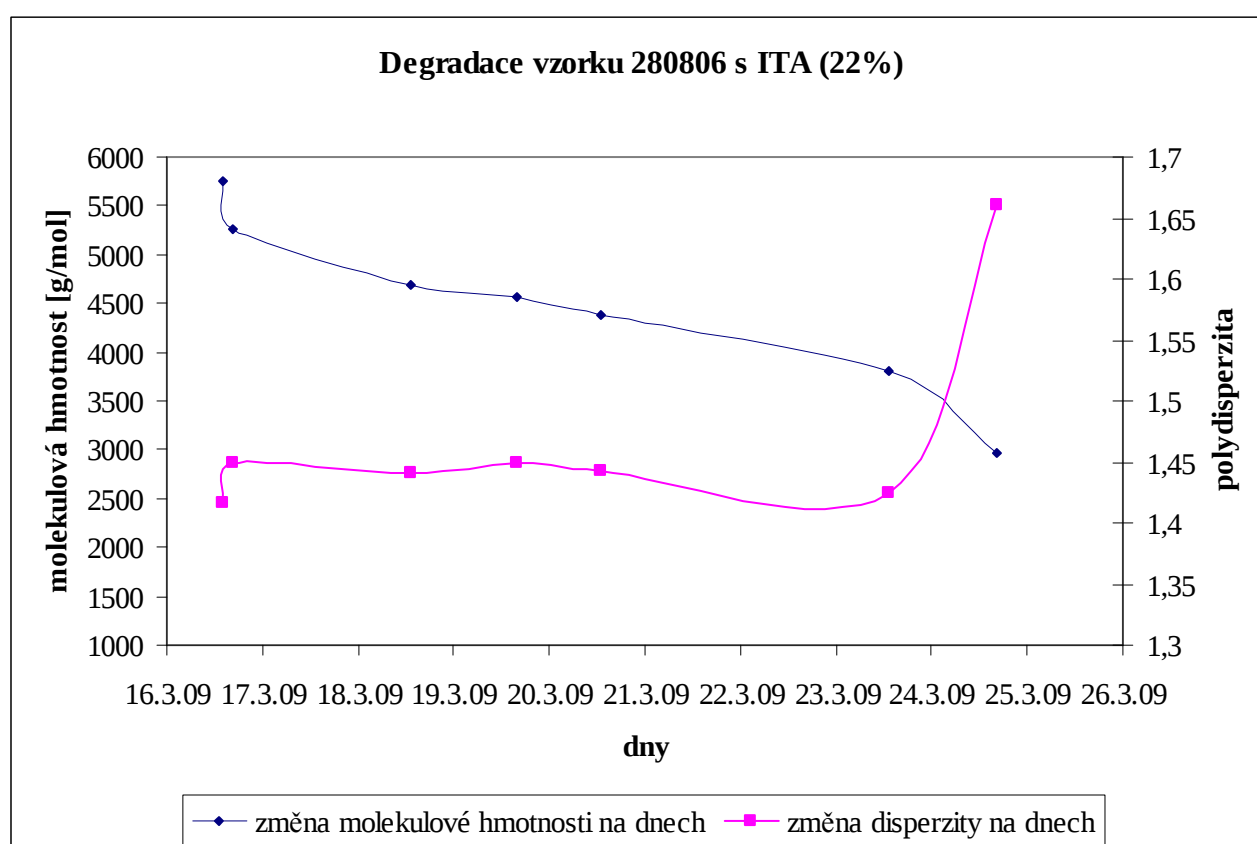


Obr. 21: Graf závislosti koncentrace kyseliny mléčné a glykolové na době degradace polymeru ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA

Z tabulky číslo 7 a následujícího grafu, který je sestaven pro 22% kopolymer 280806 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA vyplývá, že byl prokázán stejný trend uvolňování kyselin jako v předchozím případě. Je to dáno stejným poměrem LA/GA, který je tři. V případě kopolymeru s kyselinou itakonovou došlo k degradaci polymeru rychleji než u vzorku bez této kyseliny. Při posledním odběru byl původní gel již zase v tekuté formě. Vzorek pufru pro analýzu byl odebrán nad vzorkem polymeru.

Tabulka 8: Přehled výsledků GPC analýzy pro vzorek 280806 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 22%

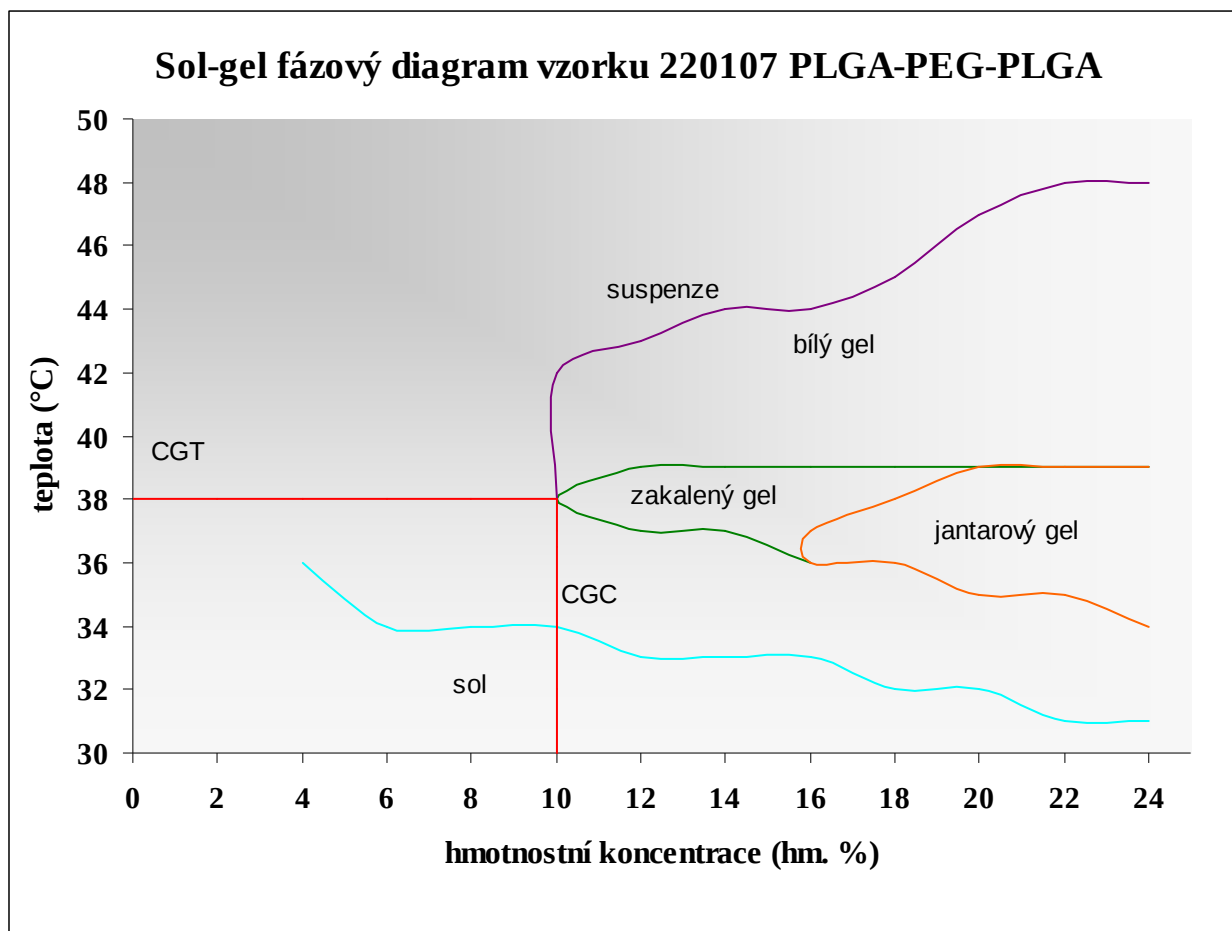
den	vzorek 280806 s ITA (22%)	
	Mn [g/mol]	polydisperzita
16. 3. 2009	5 262	1,449
17. 3. 2009	nenaměřeno	nenaměřeno
18. 3. 2009	4 694	1,441
19. 3. 2009	4 568	1,45
20. 3. 2009	4 378	1,443
23. 3. 2009	3 810	1,425
24. 3. 2009	2 968	1,661



Obr. 22: Závislost molekulové hmotnosti a polydisperzity na době degradace

Z tabulky číslo 8, ve které je znázorněn přehled výsledků biodegradace vzorku 280806 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA je zřejmé, že klesá střední číselná molekulová hmotnost v závislosti na délce degradace a zároveň stoupá polydisperzita.

4.3 Kopolymer 220107 PLGA-PEG-PLGA

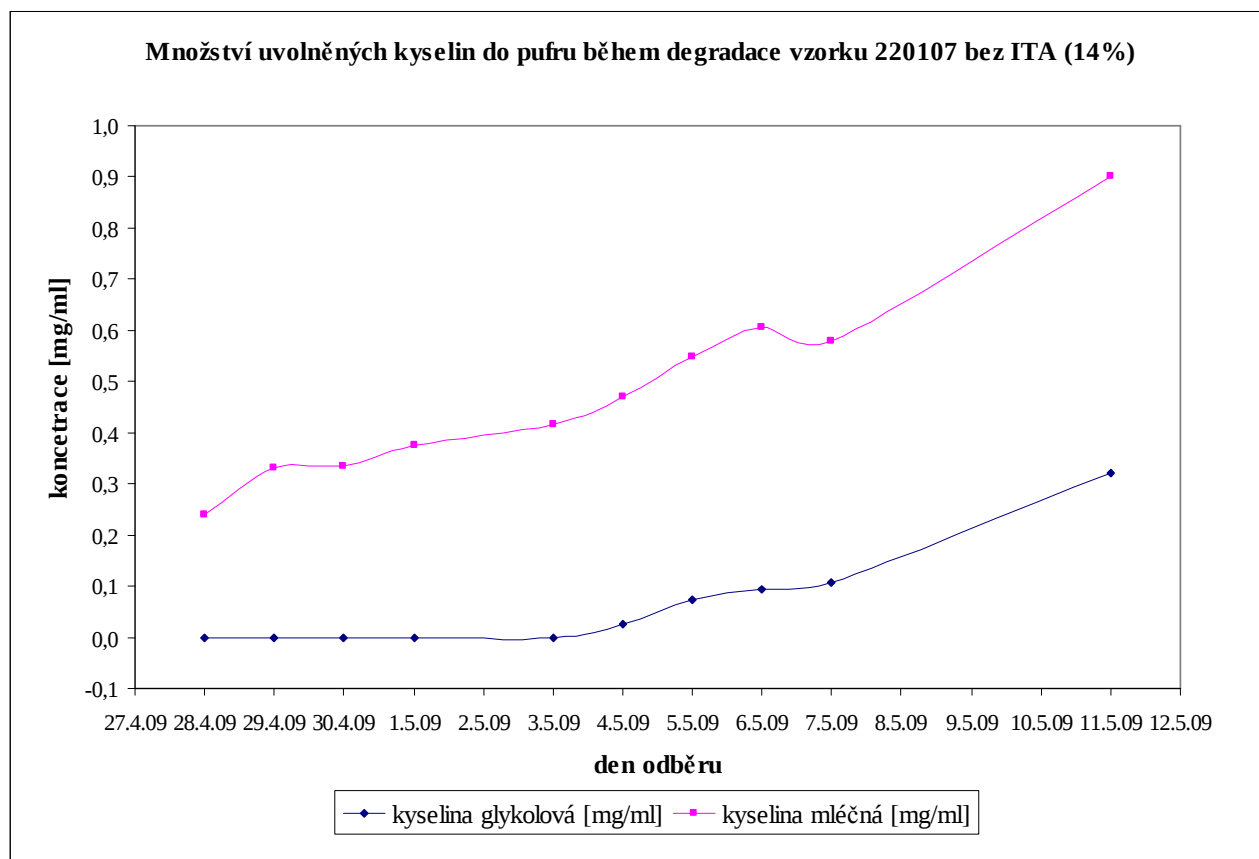


Obr. 23: Sol-gel diagram kopolymeru 220107 PLGA-PEG-PLGA

Na sol-fázovém diagramu pro kopolymer PLGA-PEG-PLGA 220107 je znázorněna kritická koncentrace gelu, která se pohybuje okolo 10% a kritická teplota dosahující až k 38 °C. Opět bylo prokázáno, že při koncentraci nižší než 10% nedošlo vůbec k tvorbě gelu. Pro další experimenty byl proto jako vhodný vzorek posouzen vzorek od koncentrace 16%, který již tvořil čirý gel jantarové barvy.

Tabulka 9: Přehled výsledků HPLC analýzy pro vzorek PLGA-PEG-PLGA číslo 220107 s hmotnostní koncentrací (14%)

den odběru	kyselina mléčná [mg/ml]	kyselina glykolová [mg/ml]	kyselina mléčná [mg v 400 μ l]	kyselina glykolová [mg v 400 μ l]
28. 4. 2009	n. d.	0,2388	n. d.	0,0955
29. 4. 2009	n. d.	0,3301	n. d.	0,1320
30. 4. 2009	n. d.	0,3337	n. d.	0,1335
1. 5. 2009	n. d.	0,3757	n. d.	0,1503
3. 5. 2009	n. d.	0,4153	n. d.	0,1661
4. 5. 2009	0,0268	0,4710	0,0107	0,1884
5. 5. 2009	0,0740	0,5496	0,0296	0,2198
6. 5. 2009	0,0930	0,6067	0,0372	0,2427
7. 5. 2009	0,1055	0,5800	0,0422	0,2320
11. 5. 2009	0,3221	0,9032	0,1288	0,3613



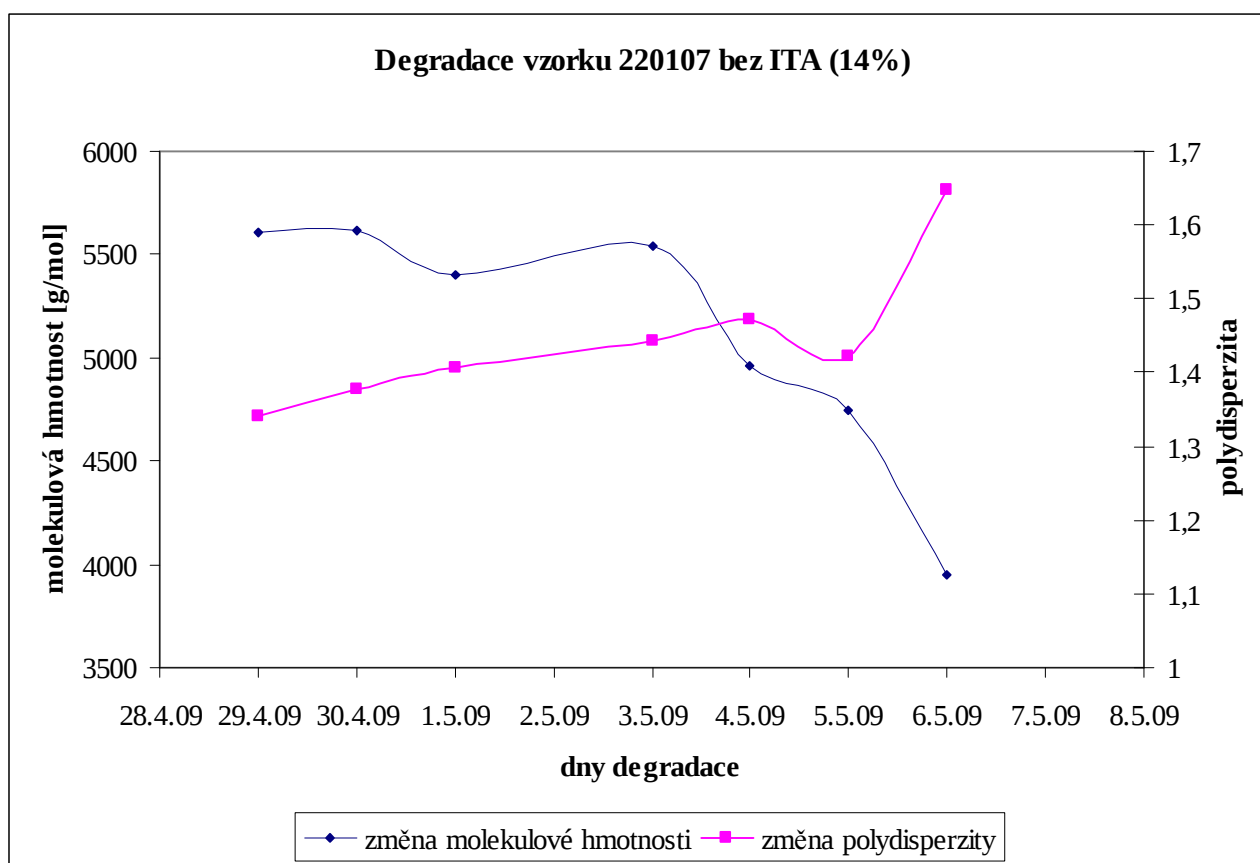
Obr. 24: Graf závislosti koncentrace kyseliny glykolové a mléčné na době degradace polymeru PLGA-PEG-PLGA

Z tabulky číslo 9 a následujícího grafu, který je sestaven pro kopolymer 220107 PLGA-PEG-PLGA o koncentraci 14% vyplývá, že systém vykazuje stejný trend uvolňování kyselin jako v předchozích případech. Lze se domnívat, že je to dáno stejným poměrem LA/GA, který je tři.

Bylo zjištěno, že prvních pět dní se neuvolnilo detekovatelné množství kyseliny glykolové. Od šestého dne začala být koncentrace kyseliny glykolové měřitelná, od 10. dne degradace dochází k rychlejšímu nárůstu koncentrací. Je to způsobeno rychlejší degradací kratších řetězců kopolymeru na sledované kyseliny.

Tabulka 10: Přehled výsledků GPC analýzy pro vzorek 220107 PLGA-PEG-PLGA (14%)

den	vzorek 220107 bez ITA (14%)	
	Mn [g/mol]	polydisperzita
29. 4. 2009	5 607	1,34
30. 4. 2009	5 616	1,378
1. 5. 2009	5 404	1,406
3. 5. 2009	5 541	1,443
4. 5. 2009	4 963	1,472
5. 5. 2009	4 750	1,423
6. 5. 2009	3 952	1,648
7. 5. 2009	4 961	1,533

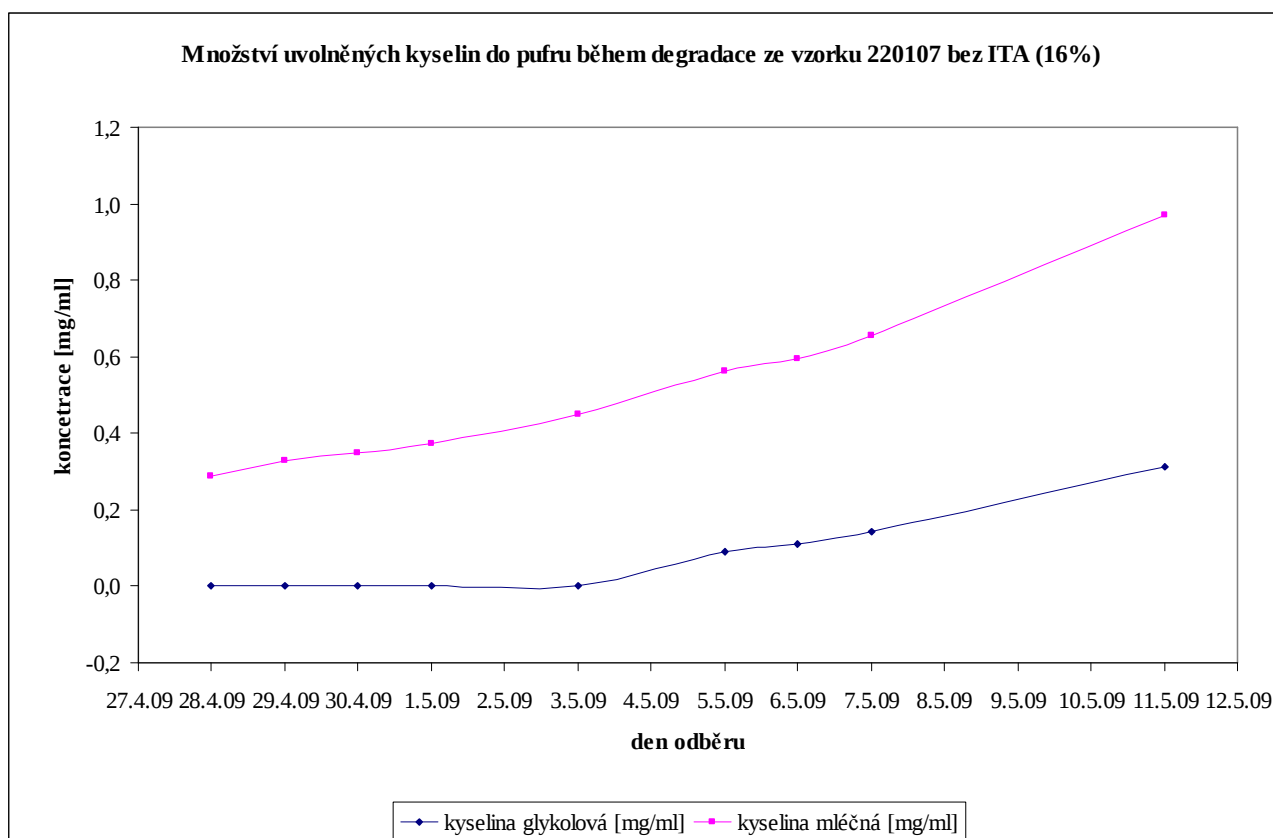


Obr. 25: Závislost molekulové hmotnosti a polydisperzity na době degradace

Z tabulky číslo 10, ve které je přehled výsledků biodegradace vzorku 220107 PLGA-PEG-PLGA je zřejmé, že klesá střední číselná molekulová hmotnost v závislosti na délce degradace a zároveň stoupá polydisperzita.

Tabulka 11: Přehled výsledků HPLC analýzy pro vzorek PLGA-PEG-PLGA číslo 220107 s hmotnostní koncentrací (16%)

den odběru	kyselina mléčná [mg/ml]	kyselina glykolová [mg/ml]	kyselina mléčná [mg v 400μl]	kyselina glykolová [mg v 400μl]
28. 4. 2009	0,2869	n. d.	0,1148	n. d.
29. 4. 2009	0,3292	n. d.	0,1317	n. d.
30. 4. 2009	0,3500	n. d.	0,1400	n. d.
1. 5. 2009	0,3739	n. d.	0,1495	n. d.
3. 5. 2009	0,4503	n. d.	0,1801	n. d.
4. 5. 2009	0,0236	n. d.	0,0094	n. d.
5. 5. 2009	0,5639	0,0894	0,2256	0,0358
6. 5. 2009	0,5968	0,1119	0,2387	0,0447
7. 5. 2009	0,6560	0,1415	0,2624	0,0566
11. 5. 2009	0,9715	0,3107	0,3886	0,1243



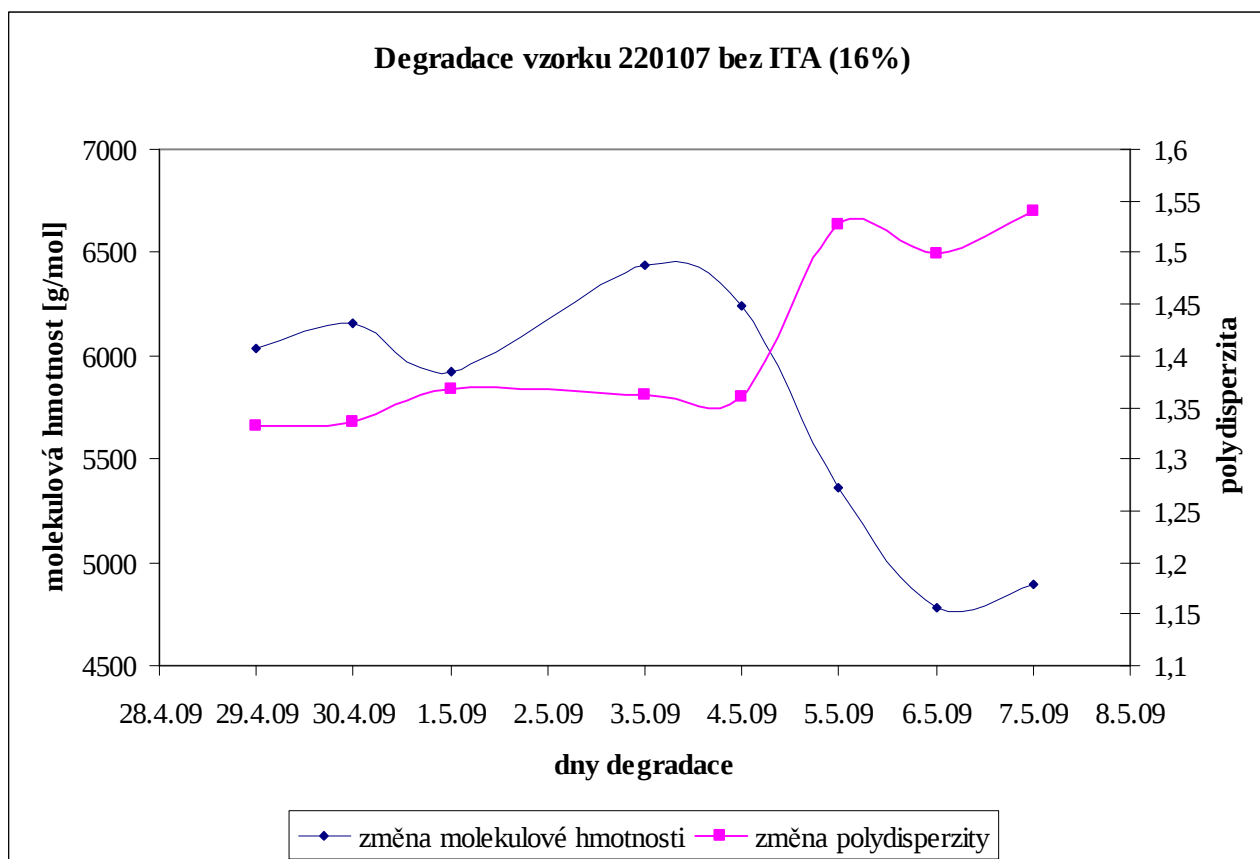
Obr. 26: Graf závislosti koncentrace kyseliny glykolové a mléčné na době degradace polymeru PLGA-PEG-PLGA

Z tabulky číslo 11 a následujícího grafu, který je sestaven pro 16% kopolymer 220107 PLGA-PEG-PLGA jednoznačně vyplývá, že je vykazován stejný trend uvolňování kyselin jako

v předchozích případech. Opět je to dáno stejným poměrem LA/GA, který je tři. Prvních šest dní se uvolnilo téměř mizivé množství kyseliny glykolové, které nemohlo být zhodnoceno s ohledem na rozsah kalibrační křivky.

Tabulka 12: Přehled výsledků GPC analýzy pro vzorek 220107 PLGA-PEG-PLGA (16%)

den	vzorek 220107 bez ITA (16%)	
	Mn [g/mol]	polydisperzita
29. 4. 2009	6 031	1,332
30. 4. 2009	6 153	1,336
1. 5. 2009	5 921	1,367
3. 5. 2009	6 441	1,362
4. 5. 2009	6 246	1,36
5. 5. 2009	5 365	1,527
6. 5. 2009	4 785	1,498
7. 5. 2009	4 891	1,54

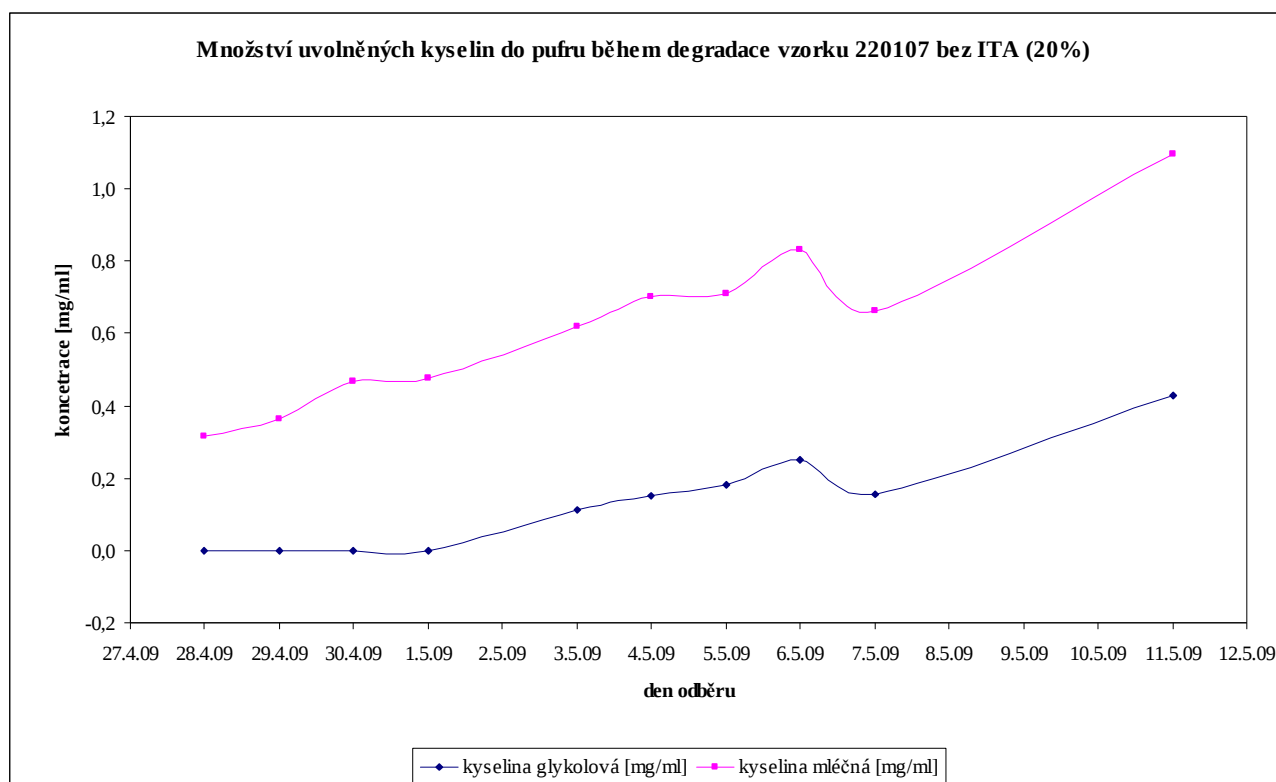


Obr. 27: Závislost molekulové hmotnosti a polydisperzity na době degradace

Z tabulky číslo 12, ve které je prezentován přehled výsledků biodegradace vzorku 220107 PLGA-PEG-PLGA 16% jednoznačně vyplývá, že klesá střední číselná molekulová hmotnost, a to v závislosti na délce degradace; zároveň stoupá polydisperzita.

Tabulka 13: Přehled výsledků HPLC analýzy pro vzorek PLGA-PEG-PLGA číslo 220107 s hmotnostní koncentrací (20%)

den odběru	kyselina mléčná [mg/ml]	kyselina glykolová [mg/ml]	kyselina mléčná [mg v 400μl]	kyselina glykolová [mg v 400μl]
28. 4. 2009	0,3146	n. d.	0,1258	n. d.
29. 4. 2009	0,3615	n. d.	0,1446	n. d.
30. 4. 2009	0,4689	n. d.	0,1875	n. d.
1. 5. 2009	0,4764	n. d.	0,1906	n. d.
3. 5. 2009	0,6186	0,1114	0,2474	0,0446
4. 5. 2009	0,7001	0,1514	0,2800	0,0606
5. 5. 2009	0,7094	0,1825	0,2838	0,0730
6. 5. 2009	0,8315	0,2501	0,3326	0,1001
7. 5. 2009	0,6610	0,1562	0,2644	0,0625
11. 5. 2009	1,0971	0,4303	0,4388	0,1721



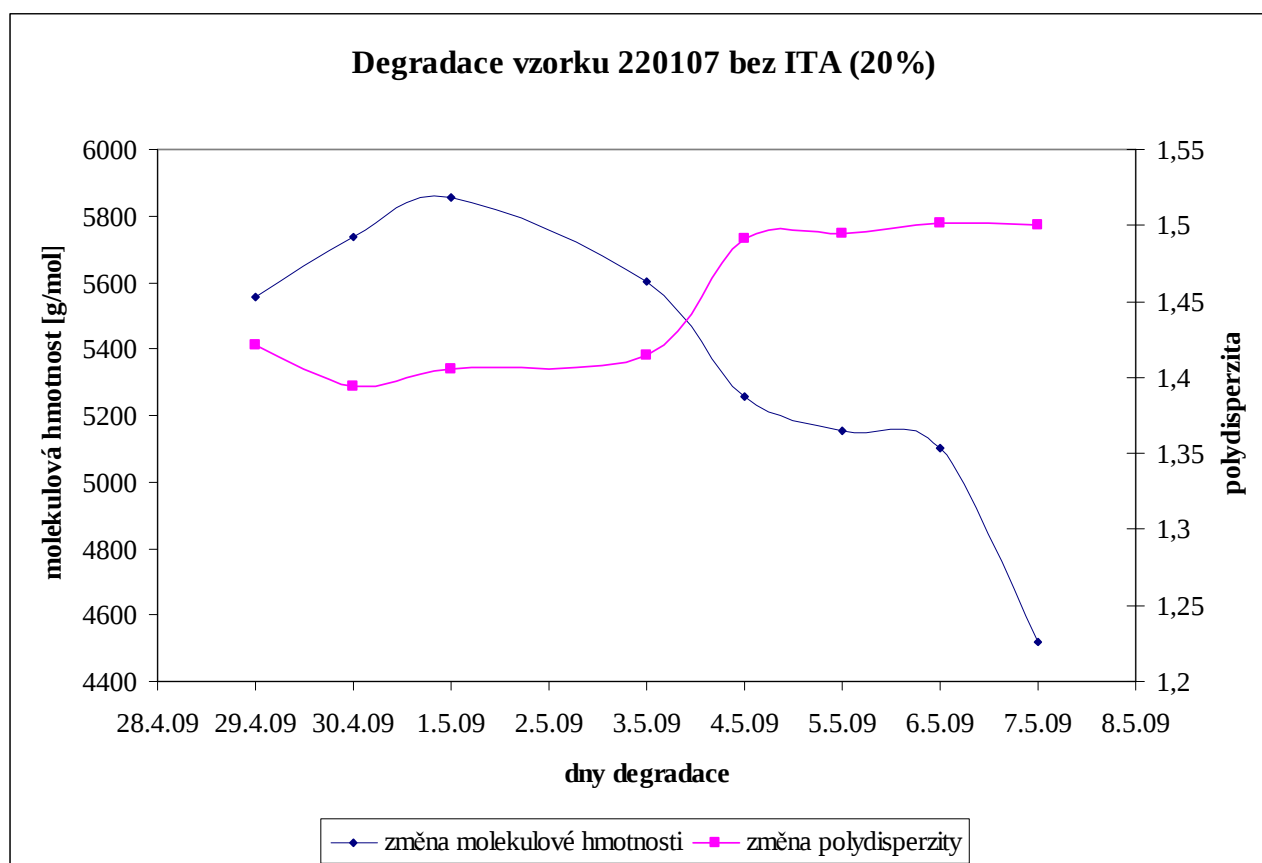
Obr. 28: Graf závislosti koncentrace kyseliny glykolové a mléčné na době degradace polymeru PLGA-PEG-PLGA

Z tabulky číslo 13 a následujícího grafu, který je sestaven pro 20% kopolymer 220107 PLGA-PEG-PLGA je zřejmé, že byl prokázán stejný trend uvolňování kyselin jako v předchozích případech. Je to dáno opět stejným poměrem LA/GA, který je tři. První čtyři dny se uvolnilo téměř mizivé množství kyseliny glykolové, které nemohlo být naměřeno kvůli rozsahu kalibrační křivky.

Mírný pokles množství kyselin, které je patrné z odběru provedeného 7. 5. 2009 je pravděpodobně způsobeno špatným odběrem vzorku, který byl jednorázový a nebylo možné ho opakovat.

Tabulka 14: Přehled výsledků GPC analýzy pro vzorek 220107 PLGA-PEG-PLGA (20%)

den	vzorek 220107 bez ITA (20%)	
	Mn [g/mol]	polydisperzita
29. 4. 2009	5 558	1,421
30. 4. 2009	5 737	1,394
1. 5. 2009	5 854	1,406
3. 5. 2009	5 604	1,415
4. 5. 2009	5 257	1,491
5. 5. 2009	5 155	1,495
6. 5. 2009	5 102	1,501
7. 5. 2009	4 519	1,5

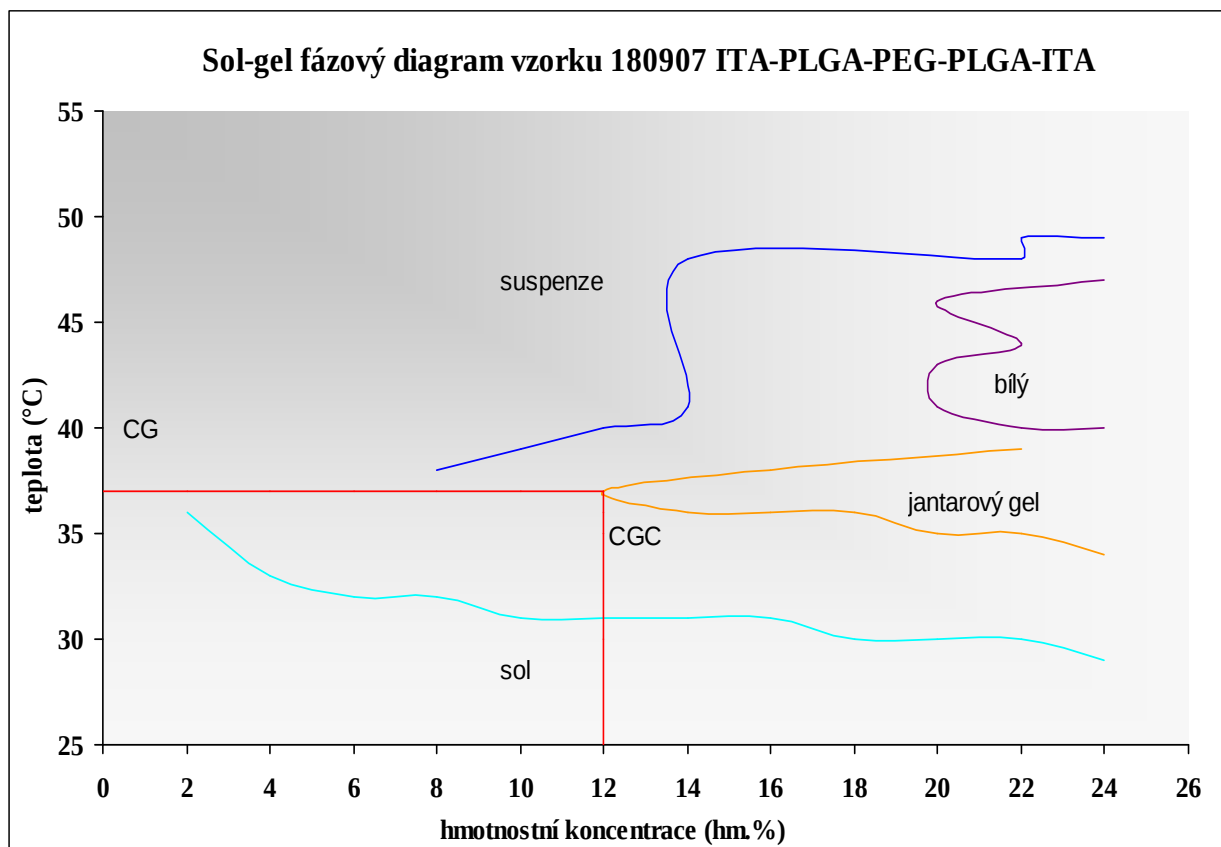


Obr. 29: Závislost molekulové hmotnosti a polydisperzity na době degradace

Z tabulky číslo 14, ve které je prezentován přehled výsledků biodegradace vzorku 220107 PLGA-PEG-PLGA 20% je zřejmé, že klesá střední číselná molekulová hmotnost v závislosti na délce degradace; zároveň stoupá polydisperzita.

U všech koncentrací kopolymeru 220107 byl trend průběhu degradace obdobný, nezávislý na hmotnostní koncentraci výchozího roztoku. Samozřejmě platí, že čím vyšší byla koncentrace polymeru, tím větší byly zjištěné hodnoty kyselin glykolové a mléčné.

4.4 Kopolymer 180907 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA

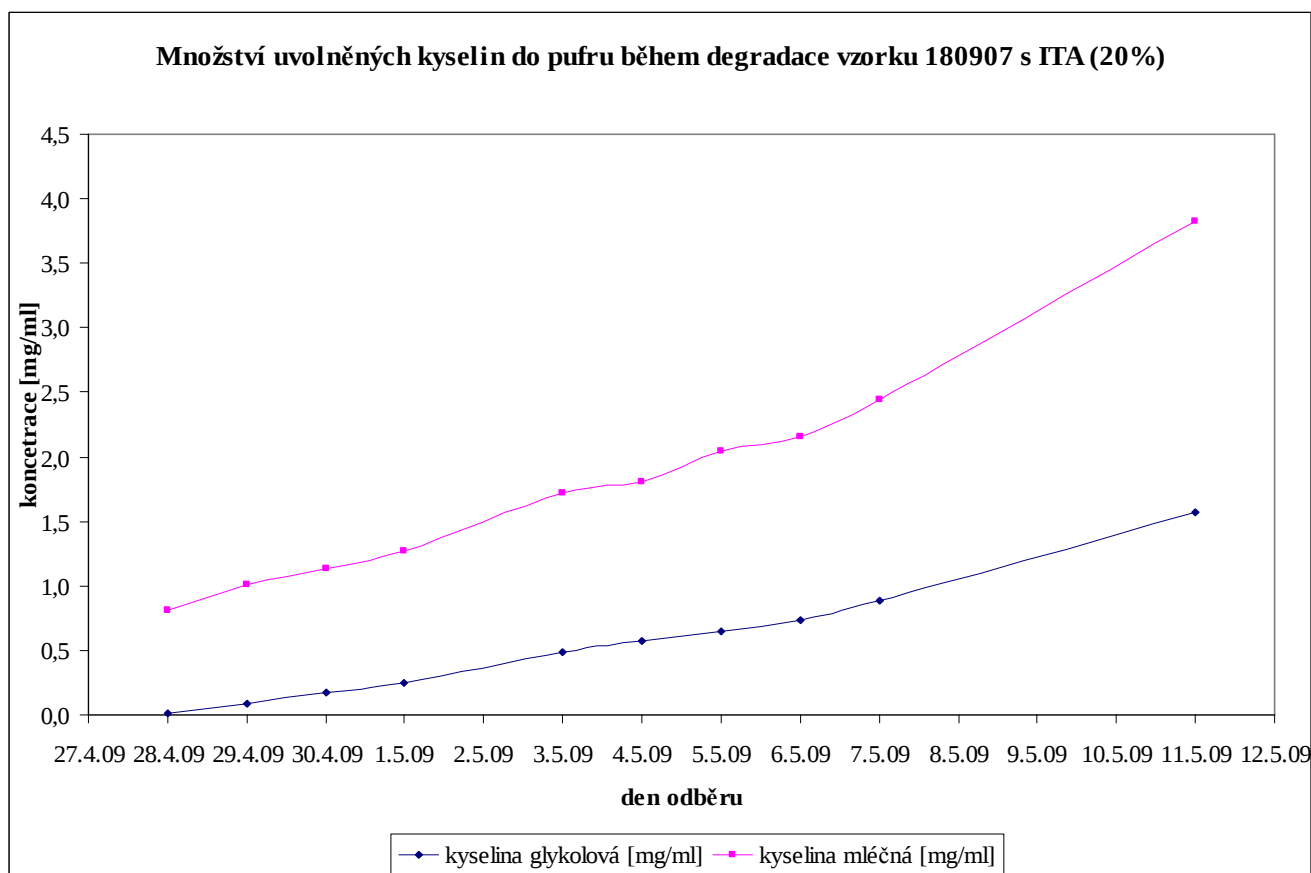


Obr. 30: Sol-gel fázový diagram kopolymeru ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 180907

Na sol-fázovém diagramu pro kopolymer ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 180907 je znázorněna kritická gelační koncentrace, která je rovna 12% a kritická gelační teplota, která dosahuje až k 37 °C.

Tabulka 15: Přehled výsledků HPLC analýzy pro vzorek ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 180907 s hmotnostní koncentrací (20%)

den odběru	kyselina mléčná [mg/ml]	kyselina glykolová [mg/ml]	kyselina mléčná [mg v 400μl]	kyselina glykolová [mg v 400μl]
28. 4. 2009	0,8101	0,0137	0,3240	0,0055
29. 4. 2009	1,0077	0,0927	0,4031	0,0371
30. 4. 2009	1,1295	0,1696	0,4518	0,0679
1. 5. 2009	1,2705	0,2475	0,5082	0,0990
3. 5. 2009	1,7219	0,4857	0,6888	0,1943
4. 5. 2009	1,8085	0,5699	0,7234	0,2280
5. 5. 2009	2,0502	0,6533	0,8201	0,2613
6. 5. 2009	2,1625	0,7335	0,8650	0,2934
7. 5. 2009	2,4447	0,8828	0,9779	0,3531
11. 5. 2009	3,8304	1,5721	1,5322	0,6288



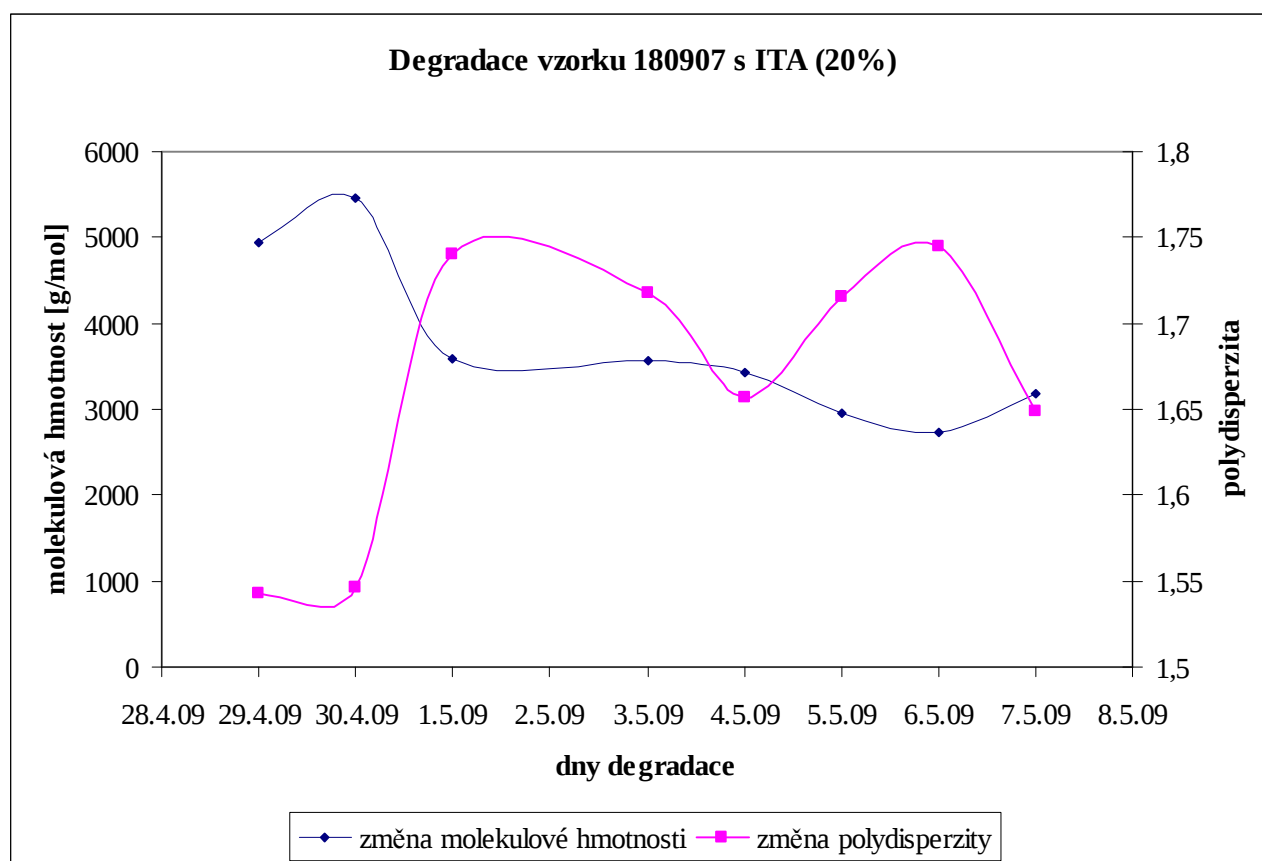
Obr. 31: Graf závislosti koncentrace kyseliny mléčné a glykolové na době degradace polymeru ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA

Z tabulky číslo 15 a následujícího grafu, který je sestaven pro 20% kopolymer 180907 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA jednoznačně vyplynul stejný trend uvolňování kyselin jako v předchozích

případech. Je to dáno shodným poměrem LA/GA, který je tři. Při porovnání stejně koncentrovaného vzorku bez modifikace ITA je zřetelně vidět, že degradace modifikovaného polymeru probíhala mnohem rychleji. Koncentrace kyselin jsou ve stejných dnech vyšší. Tento fakt byl pozorován rovněž pouhým okem při odběru vzorků, kdy bylo zřejmé, v kterém okamžiku byl gel již spíše rozpuštěn.

Tabulka 16: Přehled výsledků GPC analýzy pro vzorek 180907 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA (20%)

den	vzorek 180907 s ITA (20%)	
	Mn [g/mol]	polydisperzita
29. 4. 2009	4 941	1,543
30. 4. 2009	5 459	1,546
1. 5. 2009	3 595	1,74
3. 5. 2009	3 555	1,718
4. 5. 2009	3 438	1,657
5. 5. 2009	2 955	1,715
6. 5. 2009	2 721	1,745
7. 5. 2009	3 185	1,649



Obr. 32: Závislost molekulové hmotnosti a polydisperzity na době degradace

Z tabulky číslo 16, pomocí které je prezentován přehled výsledků biodegradace vzorku 180907 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 20% opět jednoznačně vyplývá, že klesá střední číselná molekulová hmotnost, a to v závislosti na délce degradace. Zároveň bylo zjištěno, že stoupá polydisperzita.

Stejně jako při analýzy provedené pomocí HPLC tak také analýzy molekulových hmotností potvrdily rychlejší degradaci vzorku s ITA. Konečná M_n byla asi o 1000 menší než u vzorku bez ITA.

5 ZÁVĚR

Degradovanými polymery byly poly(mléčná-co-glykolová kyselina) naroubovaná na polyethylenglykol a tento kopolymer upravený kyselinou itakonovou.

Cílem práce bylo ověřit optimální podmínky pro degradaci. Optimálními podmínkami bylo prostředí fosfátového pufru o pH 7,4 a teplotě 37 °C. Za vhodnou metodu pro stanovení produktů degradace byla zvolena vysoko účinná kapalinová chromatografie s UV-VIS detekcí s diodovým polem. Pro stanovení změny řetězce polymeru po degradaci byla použita gelová permeační chromatografie s refraktometrickým detektorem.

Nejdůležitější výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- Pro každý typ kopolymeru byla stanovena kritická gelační koncentrace a kritická gelační teplota, která je důležitá pro stanovení podmínek degradace.
- Z důvodů nedostatku materiálu byly ověřeny pouze ideální podmínky prostředí pro degradaci.
- Metodou GPC bylo zjištěno, že dochází ke klesání střední číselné molekulové hmotnosti kopolymerů a tudíž k samotné degradaci.
- Metodou HPLC byly identifikovány v odebíraném fosfátovém pufru především kyselina mléčná a glykolová.
- Degradace kopolymeru s itakonovou kyselinou probíhala rychleji a konečná molekulová hmotnost byla asi o 1 000 g/mol menší než u polymeru bez ITA.
- Z chromatogramů, které jsou v příloze číslo 4 si však lze také povšimnout, že se zde nalézají další látky. Mohlo by se jednat o kratší řetězce kopolymerů. Stanovení a přesná identifikace těchto látek bude již součástí experimentů prováděných v rámci řešení budoucí diplomové práce.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VADGAMA, P., et al. Surfaces and interfaces for biomaterials. 1st edition. Cambridge: Woodhead, 2005. 802 s. ISBN 0-8493-3446-2.
- [2] NAGATA, M., et al. Preparation and characterization of novel biodegradable optically active network polyesters from malic acid. *Macromolecules*. 1999, vol. 32, s. 7762-7767.
- [3] KIM, S.W., et al. Hydrogels: Swelling, drug loading, and release. *Pharmaceutical Research*. 1992, vol. 9, is. 3, s. 283-290.
- [4] GALAEV, I. Y., MATTIASSON, B. 'Smart' polymers and what they could do in biotechnology and medicine. *Trends in Biotechnology*. 1999, vol. 17, is. 8, s. 335-340.
- [5] JEONG, B., GUTOWSKA, A. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications . *Trends in Biotechnology*. 1 July 2002, vol. 20, is. 7, s. 305-311.
- [6] STILE, R. A., BURGHARDT, W. R., HEALY, K. E. Synthesis and characterization of injectable poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels that support tissue formation in vitro. *Macromolecules*. 1999, vol. 32, s. 7370-7379.
- [7] JEONG, B., et al. New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 1999, vol. 62, s. 109-114.
- [8] JEONG, B., BAE, Y. H., KIM, S. W. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules*. 1999, vol. 32, s. 7064-7069.
- [9] JEONG, B., KIM, S. W., BAE, Y. H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, vol. 54, s. 37-51.
- [10] LANGER, R. Biomaterials and biomedical engineering. *Chemical Engineering Science*. 1995, vol. 50, is. 24, s. 4109-4121.
- [11] GUNATILLAKE, P. A., ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. 2003, vol. 5, s. 1-16.
- [12] UNGARO, P., et al. Bioactivated polymer scaffolds for tissue engineering. *Topics in Tissue Engineering*. 2005, vol. 2.
- [13] SATO, T., et al. Evaluation of PLLA–collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*. 2004, vol. 24, is. 3, s. 365-372 .
- [14] SCHUERCH, C.: *Advanced Polymer Science*. 1972, vol. 10, s. 173.
- [15] DOENICKE, A., GROTE, B., LORENZ, W. Blood and blood substitutes. *British Journal of Anaesthesia*. 1977, vol. 49, s. 681-688.
- [16] CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. November 1998, vol. 23, is. 7, s. 1273-1335.
- [17] CHITKARA, D., et al. Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience*. 2006, vol. 6, s. 977-990.

- [18] KIZLINK, J. *Technologie chemických látek*. 3. přeprac. vyd. Brno: VUTIUM, 2005. ISBN 80-214-2913-5. Biodegradabilní polymery, s. 231.
- [19] GRIFFITH, L.G. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*. January 2000, vol. 48, is. 1, s. 263-277.
- [20] GILDING, D.K., REED, A.M. Biodegradable polymers for use in surgery - polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers. *Polymer*. December 1979, vol. 20, is. 12, s. 1459-1464.
- [21] FOX, S.A. A new type of surgical Peg. *American Journal of Ophthalmology*. 1946, vol. 29, s. 586-587.
- [22] KINAHAN, I. M., SMYTH, M. R. High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Peg-600 in human urine. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*. 19 April 1991, vol. 565, is. 1-2, s. 297-307.
- [23] FRUITIER-POLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*. 2005, vol. 214, s. 1-38.
- [24] SHIM, M.S., et al. Poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) triblock copolymer and thermoreversible phase transition in water. *Biomedical Materials Research*. 2002, vol. 61, s. 188-196.
- [25] DE JONG, S.J., et al. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus. *Polymer*. 2001, vol. 42, s. 2795-2802.
- [26] VAN NOSTRUM, C.F., et al. Hydrolytic degradation of oligo(lactic acid): a kinetic and mechanistic study. *Polymer*. 2004, vol. 45, s. 6779-6787.
- [27] SHIN, C. Chain-end scission in acid-catalyzed hydrolysis of poly(D,L-lactide) in solution. *Journal of Controlled Release*. April 1995, vol. 34, is. 1, s. 9-15.
- [28] GRAYSON, A. C. R., CIMA, M. J., LANGER, R. Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, s. 2137-2145.
- [29] GRIZZI, I., et al. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*. 1995, vol. 16, s. 305-311.
- [30] PARK, T.G. Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres - Effect of molecular-weight. *Journal of Controlled Release*. 1994, vol. 30, s. 161-173.
- [31] PARK, T.G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres - Effect of copolymer composition. *Biomaterials*. 1995, vol. 16.
- [32] SANABRIA-DELONG, N., et al. Controlling hydrogel properties by crystallization of hydrophobic domains. *Macromolecules*. 2006, vol. 39, s. 1308-1310.
- [33] BALA, I., HARIHARAN, S., KUMAR, M. PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2004, vol. 21, s. 387-422.

- [34] GILDING, D.K., REED, A.M. Biodegradable polymers for use in surgery - poly(ethylene oxide) poly(ethylene-terephthalate) (Peo-Pet) copolymers. *Polymer*. 1979, vol. 20, s. 1454-1458.
- [35] WEXLER, P. Encyclopedia of toxicology. 2nd edition. Oxford : Elsevier, 2005. 748 s. ISBN 0-12-745355-5.
- [36] PEPPAS, N.A., et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 3 July 2000, vol. 50, is. 1, s. 27-46.
- [37] ATHANASIOU, K. A., NIEDERAUER, G. G., AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. January 1996, vol. 17, is. 2, s. 93-102.
- [38] GUTOWSKA, A., JEONG, B., JASIONOWSKI, M. Injectable gels for tissue engineering. *Anatomical Record*. 2001, vol. 263, s. 342-349.
- [39] QIU, Y., PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 31 December 2001, vol. 53, is. 3, s. 321-339.
- [40] HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 17 January 2002, vol. 54, is. 1, s. 3-12.
- [41] KISSEL, T., LI, Y., UNGER, F. ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 17 January 2002, vol. 54, is. 1, s. 99-134.
- [42] JEONG, B., et al. Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA. *Macromolecules*. 2000, vol. 33, s. 8317-8322.
- [43] JEONG, B., BAE, Y. H., KIM, S. W. Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. November 1999, vol. 16, is. 1-4, s. 185-194.
- [44] JEONG, B., BAE, Y. H., KIM, S. W. In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000, vol. 50, s. 171-177.
- [45] JEONG, B., GUTOWSKA, A. Biodegradable thermoreversible hydrogel and their biomedical applications. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. 2001, vol. 222, s. U315-U315.
- [46] JEONG, B., WANG, L.Q., GUTOWSKA, A. Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-g-PEG copolymers. *Chemical Communications*. 2001, s. 1516-1517.
- [47] JEONG, B., et al. Phase transition of the PLGA-g-PEG copolymer aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry*. 2003, vol. 107, s. 10032-10039.
- [48] ZENTNER, G. M., et al. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *Journal of Controlled Release*. 14 May 2001, vol. 72, is. 1-3, s. 203-215.
- [49] JEONG, J. H., et al. Synthesis, characterization and protein adsorption behaviors of PLGA/PEG di-block co-polymer blend films. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. October 2000, vol. 18, is. 3-4, s. 371-379.

- [50] WILLKE, T., VORLOP, K.D. Biotechnological production of itaconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, vol. 56, s. 289-295.
- [51] TOMIC, S.L., SULJOVRUJIC, E.H., FILIPOVIC, J.M. Biocompatible and bioadhesive hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate, monofunctional poly(alkaline glycol)s and itaconic acid. *Polymer Bulletin*. 2006, vol. 57, s. 691-702.
- [52] CHEN, K., et al. Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels. *Materials Chemistry and Physics*. 2005, vol. 91, s. 484-489.
- [53] KRUŠIČ, M. K., FILIPOVIČ, J. Copolymer hydrogels based on N-isopropylacrylamide and itaconic acid. *Polymer*. 3 January 2006, vol. 47, is. 1, s. 148-155.
- [54] CAYKARA, T., OZYUREK, C., KANTOGLU, O. Investigation of thermal behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) networks. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007, vol. 103, s. 1602-1607.
- [55] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. rozš. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [56] SOMMER, L., et al. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0. Vybrané chromatografické postupy, s. 185-220.
- [57] COUFAL, P. *High Performance Liquid Chromatography* [online]. c2004, 28.7.2004 [cit. 2009-04-19]. Dostupný z WWW: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
- [58] *UV/VIS HPLC detektory : Detektory diodového pole* [online]. 2000 [cit. 2009-04-19]. Čeština. Dostupný z WWW: http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html.
- [59] WU, C. Handbook of size exclusion chromatography and related techniques. 2nd rev. edition. New York : Marcel Dekker, 2004. 694 s. ISBN 0-8247-47-10-0.
- [60] PASH, H. HPLC of polymers. Berlin : Springer-Verlag, 1998. 224 s. ISBN 3-540-61689-6.
- [61] JEONG, B., BAE, Y. H., KIM, S. W. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Journal of Controlled Release*. 3 January 2000, vol. 63, is. 1-2, s. 155-163.
- [62] LI, X.H., et al. In vitro degradation and release profiles of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped proteins. *Journal of Applied Polymer Science*. 2000, vol. 78, s. 140-148.
- [63] HANIKA, J. *Speciální separační procesy*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1995. 77 s. ISBN 80-7080-242-1.
- [64] GIUNCHEDI, P., et al. In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *Journal of Controlled Release*. 4 December 1998, vol. 56, is. 1-3, s. 53-62.

- [65] HUYNH, D. P., et al. PH/temperature sensitive poly(ethylenglycol)-based biodegradable polyester block copolymer hydrogels. *Polymer*. 2006, is. 47, s. 7918-7926.
- [66] FORCINO, R. G.; JONNALAGADDA, S.: The effect of fabrication methods on the mechanical and thermal properties of poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science* 2007, 104, 944-949.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Zkratka	Význam
PEG	polyethylenglykol
PLA	poly(mléčná kyselina)
PGA	poly(glykolová kyselina)
ITA	itakonová kyselina
PCL	polycaprolaktan
PBL	poly(β -butyrolactony)
PdMMLA	poly([R,S] -3,3- dimethy-2-hydroxybutandiová kyselina)
PLGA	poly(mléčná-co-glykolová kyselina)
PA	polyanhydridy
PU	polyuretany
SP	stupeň polymerace
GA	kyselina glykolová
LA	kyselina mléčná
MW	molekulová hmotnost
PNIPAAM	poly(N-isopropylakrylamid)
PEO	poly(ethylenoxid)
PPO	poly(propylenoxid)
CGT	kritická gelační teplota
CGC	kritická gelační koncentrace
(PNIPAM/ITA)	poly(N-isopropylakrylamiditakonová kyselina)
(PNVP/ITA)	poly(N-vinyl-2-pyrrolidonitakonová kyselina)
(PHEMA/ITA)	poly(2-hydroxyethylmethakrylitakonová kyselina)
HPLC	vysoko účinná kapalinová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
LD ₅₀	označení pro množství substance, které je po podání určité látky smrtelnou dávkou pro daného živočicha v 50% případu
n. d.	nedetekováno

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Chromatogram z GPC analýzy pro vzorek 14% PLGA-PEG-PLGA 220107

Příloha č. 2: Chromatogram z GPC analýzy pro vzorek 20% ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 180907

Příloha č. 3: Chromatogram z HPLC analýzy pro 20% PLGA-PEG-PLGA 220107 ukazující růst množství uvolněných kyselin během degradace

Příloha č. 4: Porovnání chromatogramů z HPLC analýzy pro osmý den degradace 20% vzorků PLGA-PEG-PLGA 220107 a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA 180907

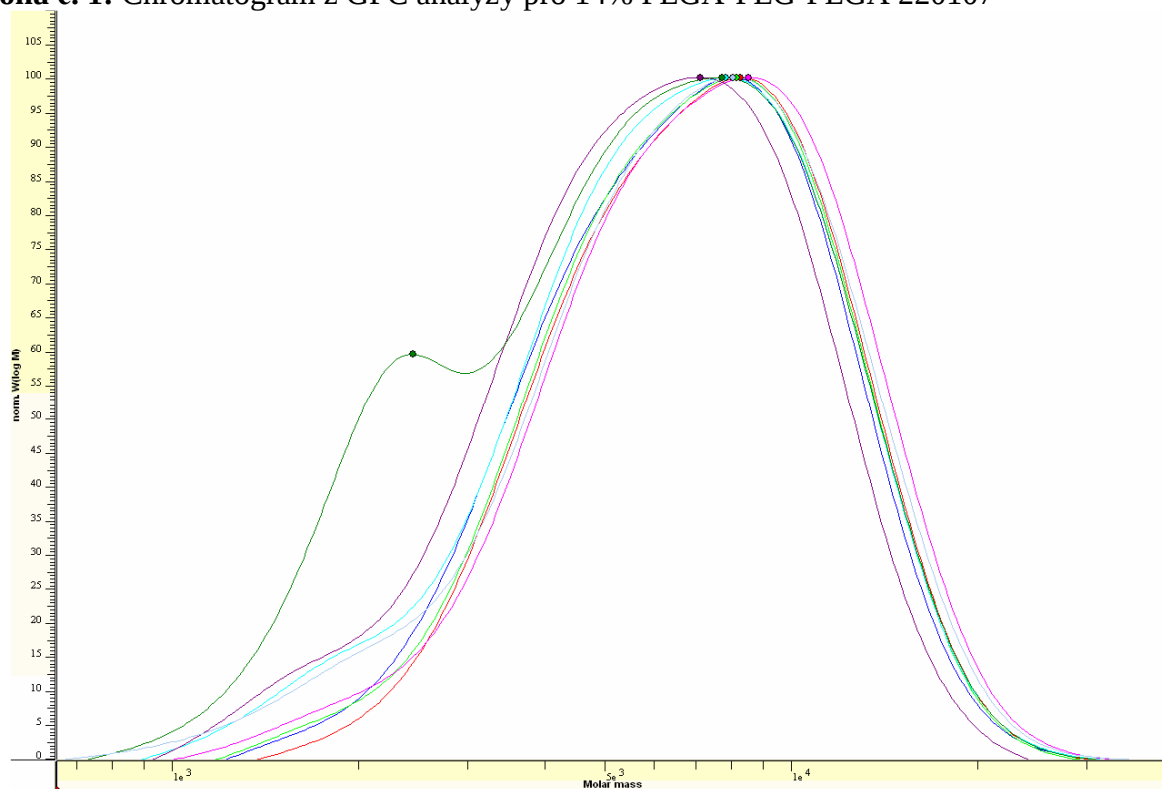
Příloha č. 5: Ukázka kopolymerů – bezbarvý vzorek náleží PLGA-PEG-PLGA a medově zabarvený vzorek ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA

Příloha č. 6: Určování změny zabarvení při sestrojování sol-gel fázových diagramů

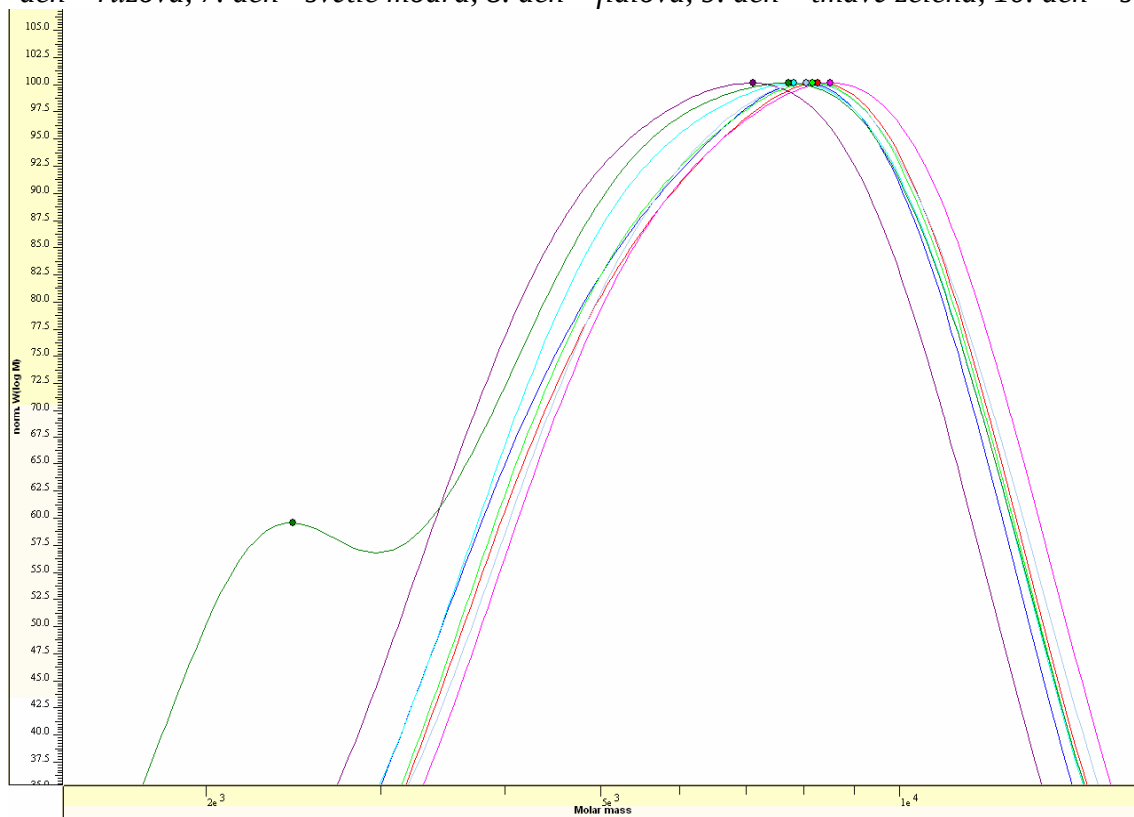
Příloha č. 7: Temperace vzorků ve vodní lázni při stanovování sol-gel fázových diagramů

9 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Chromatogram z GPC analýzy pro 14% PLGA-PEG-PLGA 220107

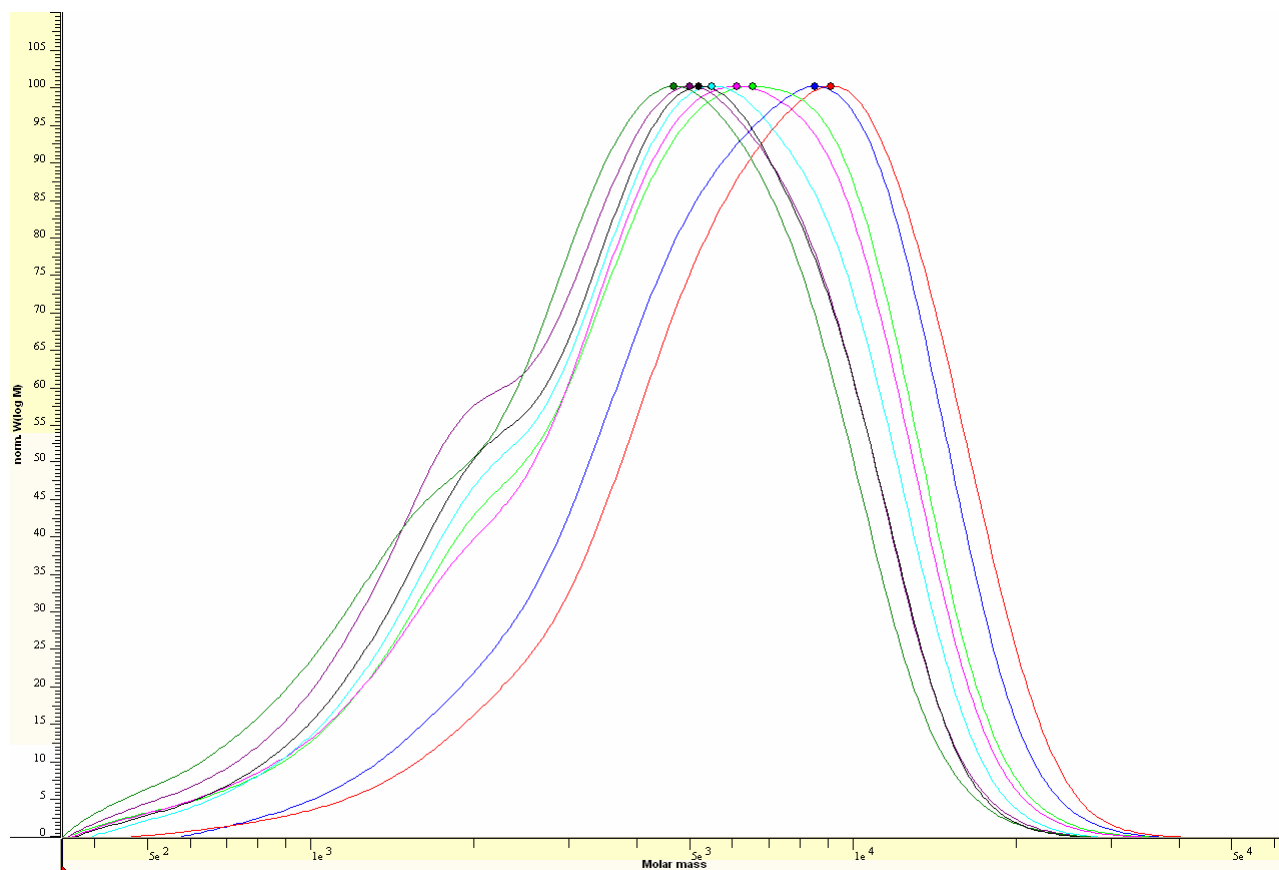


Obr. 33: 1. den degradace znázorňuje modrá křivka, 2. den – červená křivka, 3. den – zelená, 4. den – růžová, 7. den – světle modrá, 8. den – fialová, 9. den – tmavě zelená, 10. den – šedá

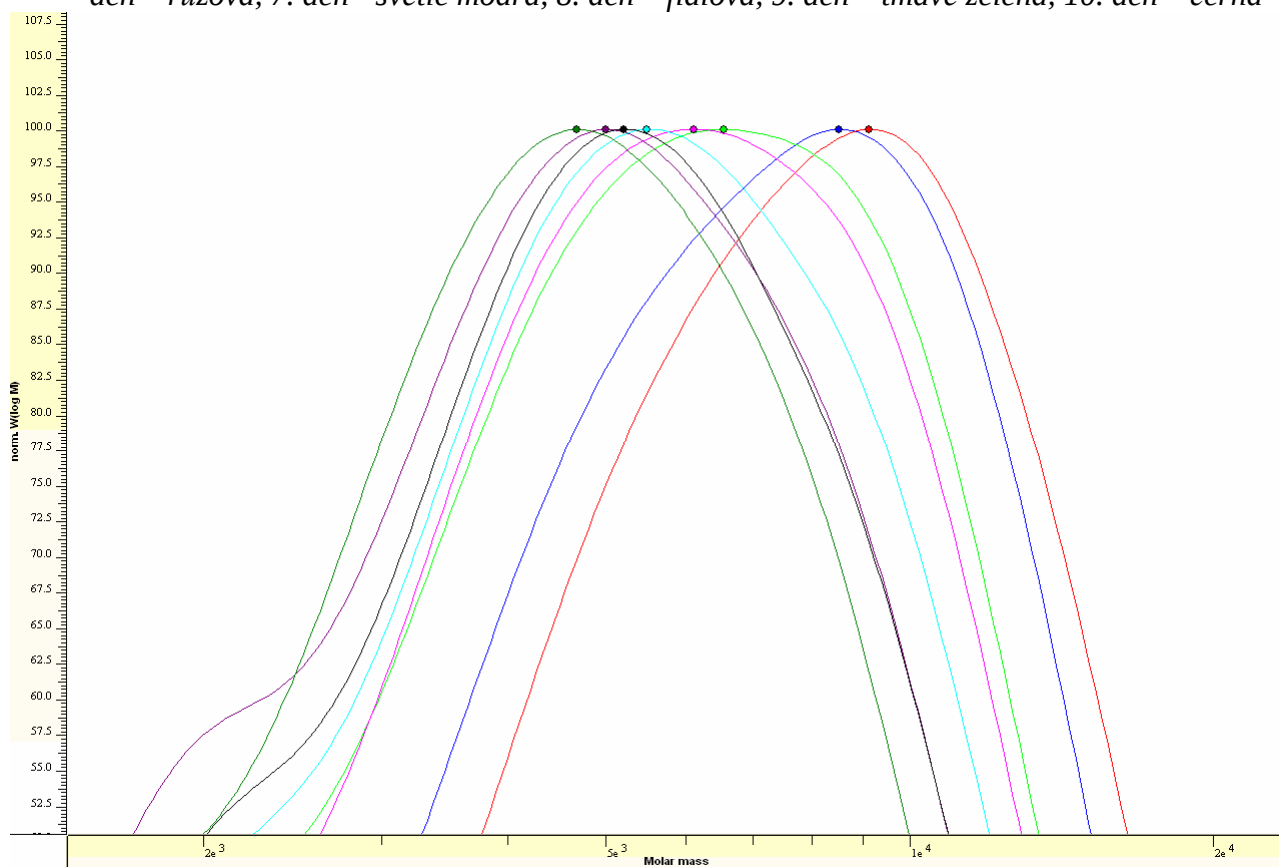


Obr. 34: detail chromatogramu pro 14% PLGA-PEG-PLGA

Příloha č. 2: Chromatogram z GPC analýzy pro 20% PLGA-PEG-ITA 180907

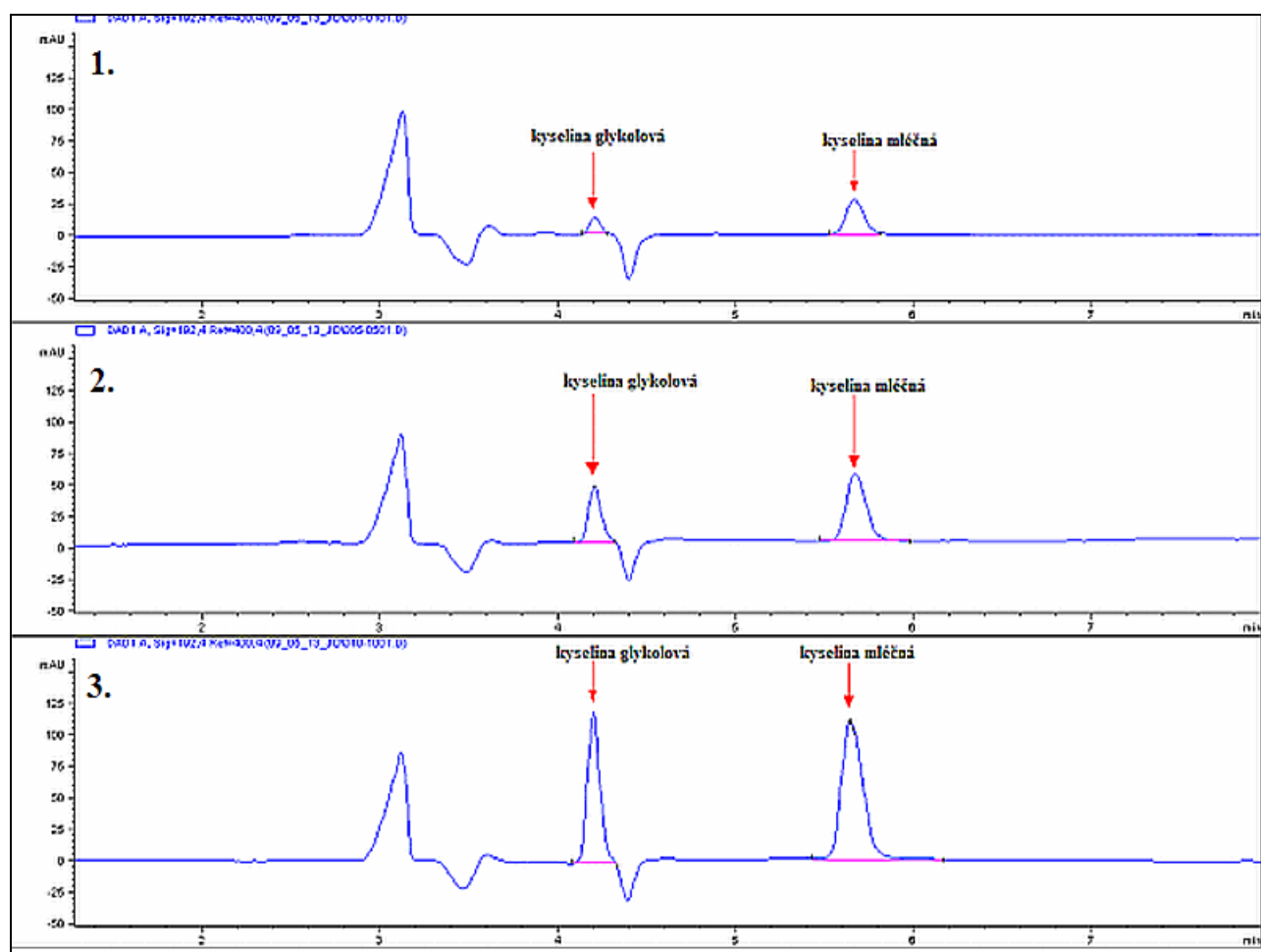


Obr. 35: 1. den degradace znázorňuje modrá křivka, 2. den – červená křivka, 3. den – zelená, 4. den – růžová, 7. den - světle modrá, 8. den – fialová, 9. den – tmavě zelená, 10. den – černá



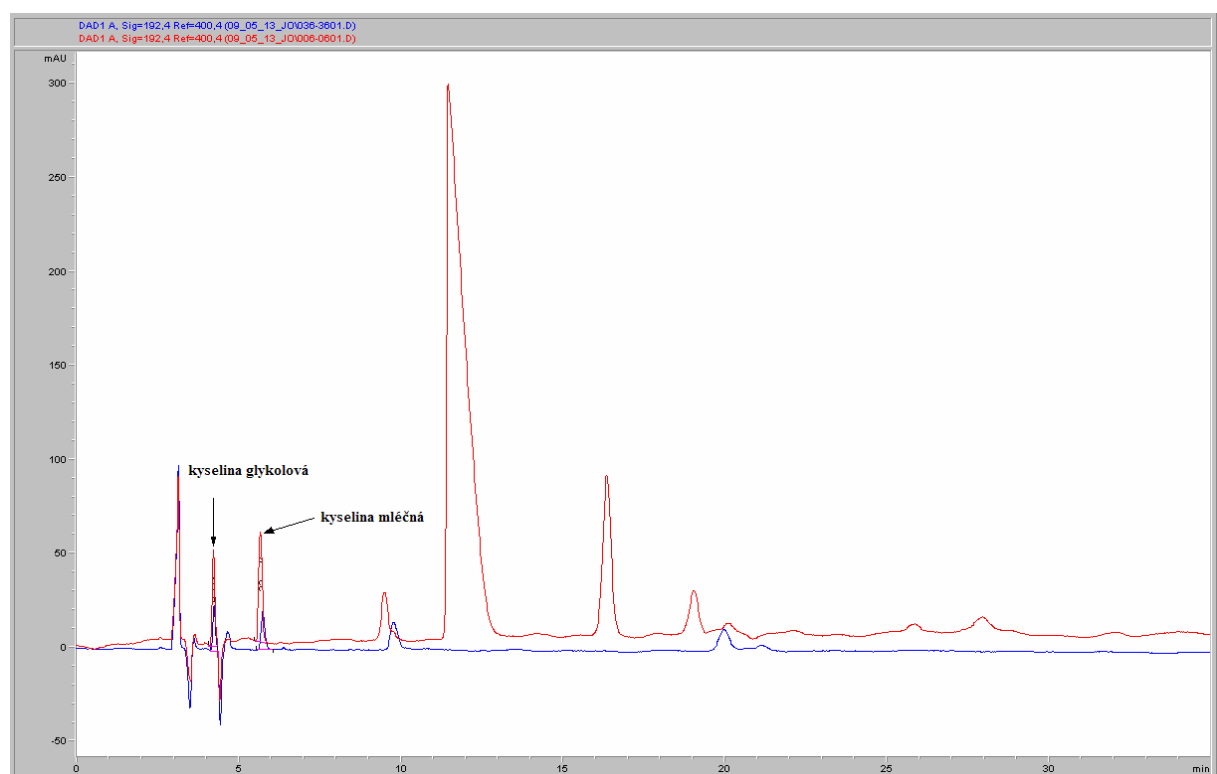
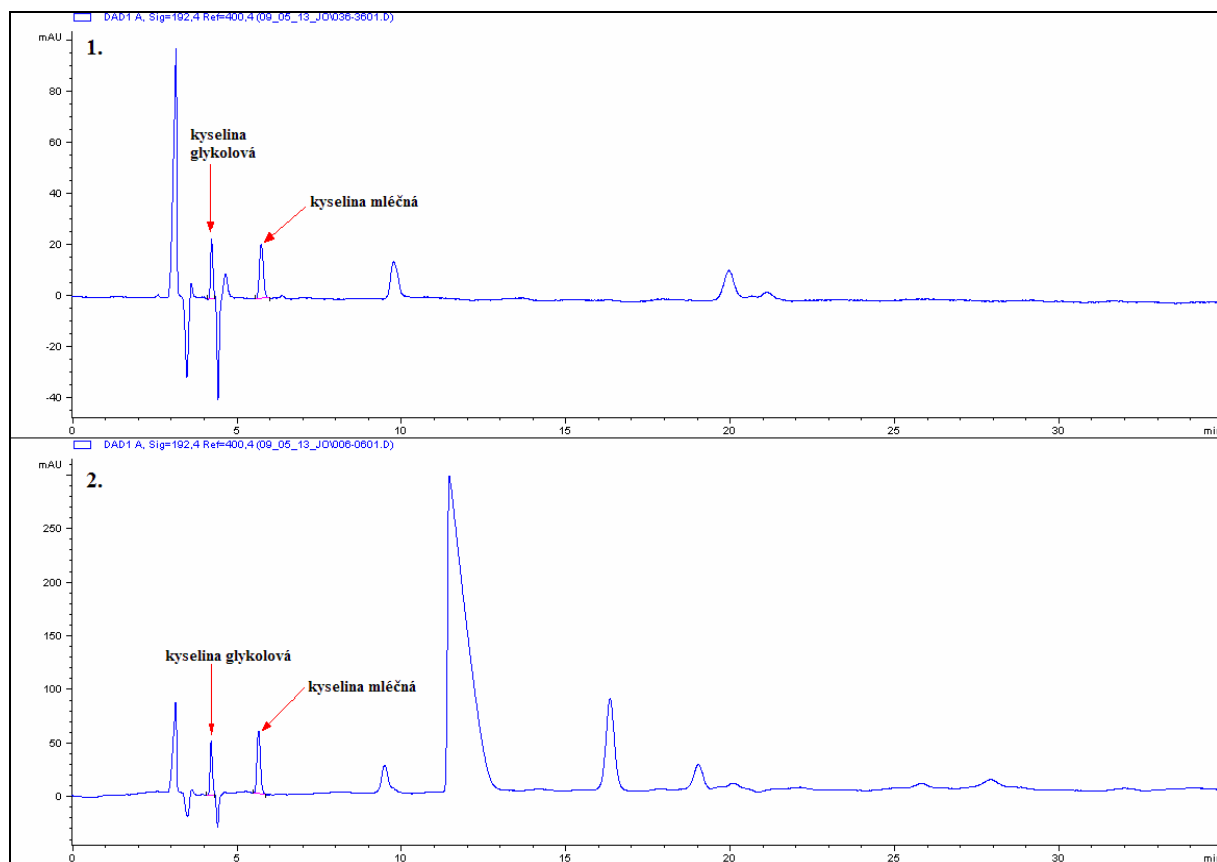
Obr. 36: detail chromatogramu 20% PLGA-PEG-ITA 180907

Příloha č. 3: Chromatogramy z HPLC analýzy 20% PLGA-PEG-PLGA 220107



Příloha č. 4: Porovnání chromatogramů z HPLC analýzy pro 8. den degradace

1. graf je 20% PLGA-PEG-PLGA 220107
2. graf je 20% PLGA-PEG-ITA 180907



Obr. 38: červená křivka znázorňuje ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA , modrá křivka znázorňuje PLGA-PEG-PLGA

Příloha č. 5: Ukázka vzorků



Příloha č. 6: Určování změny zabarvení při sestrojování sol-gel fázových diagramů



Příloha č. 7: Temperování vzorků ve vodní lázni



