Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Asociace čtyřramenného hvězdicového kopolymeru s poly(DL-laktid)-poly-oxyethylenovými rameny ve vodných roztocích

Filip Dvořák

Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracoval sám pod vedením školitele RNDr. Miroslava Štěpánka Ph. D. a že veškeré zdroje byly řádně a správně citovány.

……

podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, že mi umožnila u nich vypracovat svoji bakalářskou práci a zvláště pak RNDr. Miroslavu Štěpánkovi Ph. D., za jeho rady a pomoc a za jeho trpělivost se mnou.

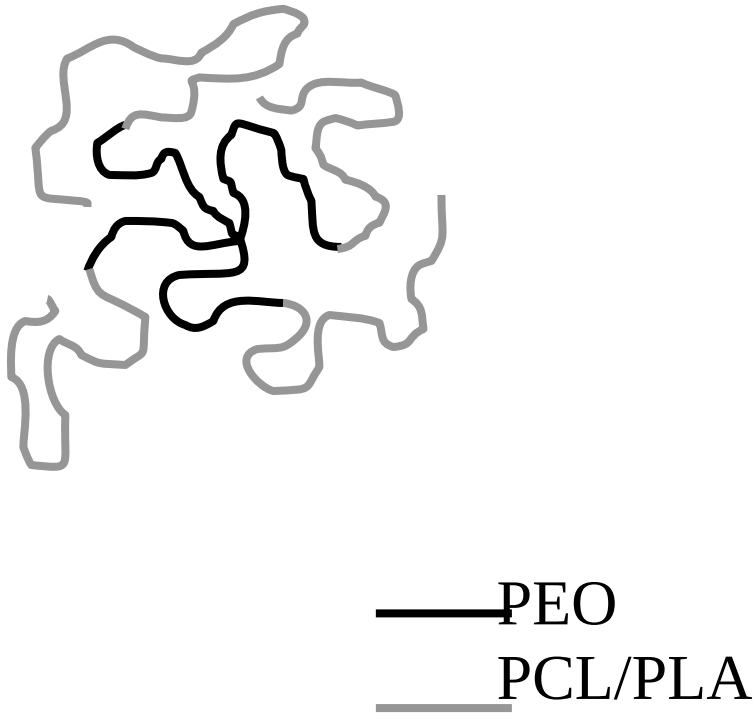
1. Obsah

1. Obsah 3
2. Úvod 4
3. Popis metod 5
3.1 rozptyl světla 5
3.2 Fluorescence 9
3.3 NMR spektroskopie 11
3.4 AFM 12
4. Vlastnosti látek 13
4.1 PLA 13
4.2 PEO 13
4.3 PCL-PEO 15
4.4 PLA-PEO 17
5. Experimentální část 21
5.1 Chemikálie 21
5.2 Přístrojové vybavení 23
6. Výsledky a diskuze 24
6.1 DLS a SLS 24
6.2 AFM 30
6.3 ^{1}H NMR spektroskopie 31
6.4 Fluorescence 32
7. Závěr 35
8.Citace 36

2. Úvod

V posledních letech jsou velmi studovanou oblastí chemie blokové kopolymery z důvodů jejich možného využití jako nosičů léčiv pro cílenou dopravu a uvolňování. Velmi často studovaným kopolymerem je poly(laktid)-b-poly(ethylenoxid), dále jen (PLA-PEO). Jeho výhodou je biokompatibilita s lidským organismem a jeho dobrá biodegradovatelnost. Nejčastějšími studovanými formami PLA-PEO jsou lineární dvojbloky a trojbloky ABA a BAB, kde A je blok PLA a B je blok PEO. V naší práci se však zaměříme hlavně na studium čtyřrammeného hvězdicového kopolymeru PLA-PEO a srovnání jeho vlastností s podobným kopolymerem poly(ε-kaprolakton)em-b-poly(ethylenoxid)em, dále jen (PCL-PEO), opět ve formě čtyřramenné hvězdice. Vnitřek hvězdice tvoří vždy bloky PEO a ramena hvězdice jsou buď PCL, nebo PLA, záleží o jaký polymer se jedná.(Obr. 1) Tato struktura polymeru není natolik prostudována jako právě lineární dvoj- a trojbloky.

Obr. 1.



Struktura polymeru $(PCL\text{-}PEO)_4$ nebo $(PLA\text{-}PEO)_4$

3. Popis metod

3.1 rozptyl světla

Rozptyl světla je metoda, která se používá pro studia struktury a dynamiky polymerních systémů.

Jestliže látkou prochází elektromagnetické záření (dále jen EMG), tak elektrické pole indukuje v molekulách látky oscilující dipólové momenty, které jsou zdrojem rozptýleného EMG záření.

Tento jev nelze pozorovat v uspořádané krystalové mřížce, kde záření zaniká negativní interferencí jednotlivých rozptylových center. Naopak v kapalinách (díky koncentračním, teplotním nebo hustotním fluktuacím) je rozptyl snadno měřitelný.

Velmi silně koncentrační fluktuace vykazují roztoky makromolekulárních látek, je-li jejich index lomu je jiný než rozpouštědla.

Při samotném měření sledujeme intenzitu rozptýleného záření (časově průměrovanou) v závislosti na úhlu, pod kterým měříme. Z této intenzity jsme pak schopni získat např. molární hmotnost a další veličiny.

Při vyhodnocování měření se používá veličina nazývaná velikost rozptylového vektoru označovaná q, která je definována vztahem:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \cdot \sin\frac{\vartheta}{2} \qquad (1.1)$$

kde n_0 je index lomu rozpouštědla, ϑ je tzv. rozptylový úhel, což je úhel mezi primárním paprskem a směrem pozorování a λ je vlnová délka rozptýleného záření.

Jestliže chceme charakterizovat rozptyl světla v závislosti na hmotnostní koncentraci c a na rozptylovém vektoru q, tak k tomu požijeme veličinu známou jako Rayleighův poměr $R(q,c)$, která je definována vztahem:

$$R(q,c) = \frac{I(q,c)r^2}{I_0}, \qquad (1.2)$$

kde I_0 je intenzita primárního paprsku a $I(q,c)$ je intenzita rozptýleného světla vztažená na jednotku objemu ve vzdálenosti r od zdroje rozptylu. Pokud chceme vyjádřit Rayleighův poměr v závislosti na c a q, tak k tomu lze použít Zimmovu rovnici:

$$\frac{Kc}{R(q,c)} = \frac{1}{M_w P(q)} + 2A_2 c + \ldots \quad , \tag{1.3}$$

kde A_2 je druhým virálním koeficientem, který popisuje interakci rozptylující látky a rozpouštědla, M_w je molekulová hmotnost rozpuštěné látky a K je konstanta definovaná vztahem:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda^4 N_A}, \tag{1.4}$$

kde N_A je Avogardova konstanta a dn/dc je inkrement indexu lomu (zvýšení indexu lomu o dn, pokud zvýšíme koncentraci rozpuštěné látky o dc.)

Nelze zanedbat interferenci mezi zářením z jednotlivých rozptylových center. Tuto interferenci lze vyjádřit funkcí $P(q)$, což je tzv. rozptylová funkce, která popisuje zeslabení záření v důsledku interference. Tato funkce je definována takto:

$$P(q) = \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} \frac{\sin(u_{ij} q)}{u_{ij} q}, \tag{1.5}$$

kde u_{ij} je vzdálenost mezi i-tým a j-tým segmentem rozptylující částice a n je počet segmentů

Abychom popsali závislost rozptylové funkce na tvaru a velikosti částic používáme tento vzorec:

$$P(q) = \frac{1}{1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2} \tag{1.6}$$

Tento vzorec je pouze přibližný a platí pouze pro částice menší než λ a malé úhly. R_g je gyrační poloměr definovaný vztahem:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} m_i r_i^2}{\sum_{i=1}^{n} m_i}}, \tag{1.7}$$

kde r_i je vzdálenost od těžiště a m_i hmotnost i-tého segmentu.

Při měření intenzity rozptýleného světla *I(t)* pozorujeme časové fluktuace. Tyto fluktuace jsou způsobeny neuspořádaným pohybem jednotlivých rozptylových center. Na registrování těchto odchylek se používá experimentální metoda DLS – dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering). Jako výstup je v této metodě je tzv. časová autokorelační funkce intenzity, která je definovaná vztahem:

$$g_{(2)}(t) = \frac{\langle I(0)I(t)\rangle}{\langle I(0)\rangle^2}, \tag{1.8}$$

lomené závorky v tomto vztahu naznačují integraci, tedy:

$$\langle I(0)I(t)\rangle = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{T}\int_0^T I(t')I(t+t')dt', \tag{1.9}$$

S časem se ztrácí korelace mezi hodnotami funkce *I(t)* a stejné funkce posunuté o t' tím rychleji čím klesá hodnota autokorelační funkce. V limitě pro $t'\to\infty$ hodnota $g_{(2)}(t)$ konverguje k jedničce, $g_{(1)}(t)$ k nule tedy:

$$g_{(1)}(t) = \int_0^\infty A(\tau)\exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)d\tau, \tag{1.10}$$

kde $A(\tau)$ je distribuční funkce tzv. relaxačních časů τ. Tyto časy charakterizují dynamiku daného systému. Nejjednodušší možný popis souboru, který je popsán jediným relaxační časem je úprava rovnice (1.10) do tvaru:

$$g_{(1)}(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)d\tau, \tag{1.11}$$

Ze závislosti relaxačních časů na rozptylovém úhlu lze rozhodnout jakému typu pohybu v rozptylujícím systému příslušný relaxační čas odpovídá.

Polydisperzní soubor částic lze popsat autokorelační funkcí 1.10 Kromě toho můžeme popsat tento soubor pomocí rozvoje do mocninné řady. Členy této řady se označují jako kumulanty:

$$\ln g_{(1)}(t) = -\Gamma t + \frac{\mu_2}{2} t^2 - \frac{\mu_3}{3} t^3 + \ldots + (-1)^n \frac{\mu_n}{n!} t^n + \ldots, \tag{1.12}$$

kde μ_2,..., $\mu_n$je druhý až n-tý kumulant a $\Gamma = \frac{1}{\tau}$ je převrácená hodnota středního relaxačního času.

Index polydisperzity souboru lze vyjádřit rovnicí:

$$I_{PD} = \frac{\mu_2}{\Gamma^2}, \tag{1.13}$$

Pro polydisperzní soubor částic dostaneme ze vztahu úhlově závislé hodnoty Γ a tím i difúzního koeficientu a to z toho důvodů, že částice různě velké mají i různé rozptylové funkce. Při extrapolaci na nulový úhel (za podmínky *P(0)=1*)můžeme získat vztah:

$$\frac{\Gamma(q,c)}{q^2} = D\left(1 + k_D c + CR_g^2 q^2 + \ldots\right), \tag{1.14}$$

kde *C* je strukturně závislý parametr, k_D je druhý virální koeficient a *D* je difúzní koeficient.

Pokud získáme difúzní koeficient, lze z něj vypočítat hydrodynamický poloměr R_H odpovídající kouli o daném difúzním koeficientu *D* pomocí Stokes-Einsteinova vztahu:

$$R_H = \frac{kT}{6D\pi\eta}, \tag{1.15}$$

kde *k* je Boltzmanova konstanta, *T* termodynamická teplota a η je viskozita.

3.2 Fluorescence

Fluorescence je jev, při kterém je nejprve absorbováno světlo a molekula zvýší svou energii do excitovaného stavu (prvního, v některých případech i do vyšších) a poté tuto energii buď vyzáří ve formě elektromagnetického záření S tímto přechodem do vyššího excitačního stavu souvisí i přechod do vyšších rotačních a vibračních stavů (energie přechodu rotačních a vibračních stavů je o několik řádů menší než energie potřebná na excitaci).

Molekula v excitovaném stavu začne při srážkách s okolními molekulami relaxovat a tím se dostává na nejnižší vibrační hladinu v rámci daného excitovaného stavu. Okolí molekuly už není s to přijmout energii na to, aby se molekula byla schopna vrátit do základního elektronového stavu, a tak může přečkat dostatečně dlouho na to, aby došlo ke spontánní emisi fotonu a tím ke snížení energie do základního elektronového stavu.

Jednou z výhodou fluorescenčních spekter je to, že tato spektra jsou ovlivněna chemickým okolím fluoreskující látky, a to proto, že fluoreskující látka zůstává ve svém excitovaném stavu poměrně dlouho a tak může dojít k intermolekulárním interakcím s bezprostředním okolím.

Jako značka se při měření fluorescence jsme používali DPH (1,6-difenyl 1,3,5-hexatrien). Vlnová délka excitace je 370 nm a vlnová délka emise je 427 nm. Tato značka nám dává informace o okolí sledované molekuly a to jak o polaritě, tak i o viskozitě. DPH má dva excitační pásy a to ze stavů $^1A_g^*$ a $^1B_g^*$. Základní stav je totálně symetrická hladina ^1A_g. Přechod $^1A_g^* \rightarrow {}^1A_g$ je symetricky zakázán, proto je ve spektru málo výrazný. Vnitřní konverze mezi $^1A_g^*$ a $^1B_g^*$ je silně ovlivněna rozpouštědlem a teplotou. Doba života DPH je citlivá na okolí. Dá se říci, že klesá s dielektrickou permitivitou rozpouštědla.

V některých rozpouštědlech je pozorováno dvouexponencionální vyhasínání.

Rozdíl mezi časem života emisních stavů lze vysvětlit časově nerozlišenou emisní anisotropii. Pro nejjednodušší případ, pro symetrický rotor, lze vyjádřit anisotropii r pomocí rovnice:

$$r = r_0\left(1+\frac{\tau_F}{\varphi}\right)^{-1}, \qquad (2.1)$$

kde φ je rotační korelační čas, r_0 je počáteční anisotropie a τ_F je doba života emise značky (v našem případě DPH). Pokud zjistíme dobu života emise značky, lze v daném prostředí lze již pak snadno dopočíst rotační korelační čas φ a z něj pak viskozitu:

$$\varphi = \frac{\eta V}{RT}, \tag{2.2}$$

kde η je viskozita, V je molární objem značky, R je plynová konstanta a T je termodynamická teplota.

3.3 NMR spektroskopie

Námi měřená ^{1}H NMR spektroskopie nebyla klasická, ale měřili jsme tzv. relaxaci. V tomto případě si pod pojmem relaxace můžeme představit měření, ke nejprve vyvedeme systém z rovnováhy a pak sledujeme jeho návrat zpět do rovnovážného stavu. Jinými slovy lze říci, že relaxace popisuje jak rychle spiny „zapomenou“ směr do kterého byly orientovány.

Za relaxaci nukleárního spinového magnetického vektoru M zpět do směru externího magnetického pole B_0 jsou zodpovědné dva procesy, označme si je T_1 a T_2.

Podélný relaxační čas T_1 je vyhasínací konstantou pro navrácení z-tové komponenty nukleární spinové magnetizace M_z do termicky rovnovážného stavu $M_{z,eq}$:

$$M_z(t) = M_{z,eq} - \left[M_{z,eq} - M_z(0)\right]e^{-t/T_1}, \qquad (3.1)$$

pokud je M_z orientováno do plochy xy pak lze psát:

$$M_z(t) = M_{z,eq}\left(1 - e^{-t/T_1}\right), \qquad (3.2)$$

Příčný relaxační čas T_2 je vyhasínací konstantou pro komponentu M kolmou na B_0.

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T_2}, \qquad (3.3)$$

3.4 AFM

AFM neboli mikroskopie atomárních sil je metoda, která se používá k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Metoda pracuje při velmi vysokém rozlišení je možné díky ní zobrazit i atomy. Existují dva možné režimy a to kontaktní a bezkontaktní. V našem případě jsme používali bezkontaktní režim. V tomto případě je velmi ostrý hrot upevněn na ohebném nosníku. Mezi zkoumaným vzorky a hrotem AFM není mechanický kontakt, ale působí na sebe především skrze van der Waalsovy síly. Nosník je v tomto režimu rozkmitán a je měřena jeho amplituda. Díky sledování změn amplitudy pak lze sestavit obraz povrchu vzorku.

Pro pohyb hrotu se používají piezoelektrické skenery, které umožňují realizovat pohyby menší než desetina nanometru. Ohyb nosníku měříme pomocí laseru a to tak, že na nosník necháme dopadat laserový paprsek, paprsek se od nosníku odráží a dopadá na fotodetektor. Pokud se změní ohyb nosníku, změní se i místo dopadu na fotodetektoru a tak je možné určit ohyb nosníku.

4. Vlastnosti látek

4.1 PLA

Polylaktid, nebo také polymléčná kyselina PLA je biodegradovatelný, alifatický, termoplast patřící do skupiny polyesterů. Vyrábí se z cukrové třtiny.

Nejprve se fermentací získá kyselina mléčná z třtinového cukru. Z kyseliny mléčné se nemůže přímo polymerizovat na PLA, z toho důvodu že v každé jednotlivé polymerizační reakci vzniká molekula vody a ta degraduje vznikající polymerní řetězec tak, že vznikají polymery pouze o malé molekulové hmotnosti. Místo toho se nejprve vzniklá kyselina mléčná oligomeruje a poté dimeruje a vzniká laktid

PLA o vysoké molekulové hmotnosti se připravuje z laktidu metodou ring-openening. Jako katalyzátor se používá organotin (což je katalyzátor založený na cínu s organickými zbytky). V laboratorním měřítku se používá jako katalyzátor $SiCl_3$.

4.2 PEO

Poly(ethylen oxid), PEO, také známý jako poly(ethylenglykol), PEG nebo poly(oxyetylen), POE je polymer připravovaný z etylenoxidu metodou otevírání kruhů. Tento polymer patří mezi nejdůležitější průmyslově vyráběné polyethery. Další ze skupiny polyetherů je například poly(propylenglykol).

Názvy PEO, PEG a POE jsou z chemického hlediska ekvivalentní. Historicky se však tyto názvy rozlišují a to podle molární hmotnosti daného polymeru.

Poly(etylenglykol) je oligomer nebo polymer s molekulovou hmotností do 20 000g/mol, poly(etylenoxid) je oligomer nebo polymer s molekulovou hmotností nad 20 000g/mol a jako poly(oxyetylen) je označován daný polymer o jakékoliv molární hmotnosti.

Poly(etylenoxid) je kapalina nebo nízkotající látka v závislosti na molekulové hmotnosti.

Poly(etylenglykol) se vyrábí interakcí etylenoxidu s vodou, etylenglykolem, nebo oligomery etylenglykolu. Při výrobě se preferuje výroba s etylenglykolem nebo z jeho oligomeru před výrobou s vodou, z toho důvodu, že při výrobě s vodou má výsledný poly(etylenglykol) vyšší polydisperzitu.

Tyto polymerizace je kysele nebo bazicky katalyzována. V závislosti na použité katalýze se jedná o buď kationtovou nebo aniontovou polymerizaci. Polymerace etylenoxidu patří mezi exotermické reakce. Přehřátí této reakce, nebo kontaminace katalyzátory, může vést

k neřízené polymeraci a dokonce i k výbuchu. Preferuje se aniontová opět z důvodů toho, že při aniontové polymerizaci vzniká polymer s nižší polydisperzitou.

Poly(etylenoxid) se vyrábí suspenzní polymerizací. Při této polymerizaci je monomer, či směs monomeru ve vodné fázi, kde jsou zároveň i malé kuličky (0,01 – 3 mm), které slouží jako iniciátory. Tato polymerizace je katalyzována organokovovými katalyzátory (hořečnatými, hlinitými a vápenatými). K tomu, abychom zabránili koagulaci vznikajícího polymeru se přidává chelatovací složka (dimethylglyoxim).

4.3 PCL-PEO

Nejčastějším způsobem přípravy vodného roztoku nanočástic PCL-PEO je rozpuštění kopolymeru ve směsi rozpouštědla vhodného pro hydrofóbní blok a vody, ve kterém se samovolně vytvoří micely. Zastoupení organické části směsi rozpouštědel se pak postupně snižuje a to přidáváním roztoku s nadbytkem vody, destilací nebo dialýzou proti vodě. S asociačním číslem vzniklých micel stoupá termodynamická kvalita rozpouštědla a klesá se zastoupením organické složky. Další snižování zastoupení rozpouštědla vhodného pro hydrofóbní blok vede k takzvanému kinetickému "zamrznutí". Za tímto bodem se již asociační číslo dále nemění. Asociační číslo ovšem závisí na koncentraci a složení, složení rozpouštědla, teplotě a dalších faktorech. Velmi slibné pro aplikaci PCL-PEO v lékařství je fakt, že asociační číslo a velikost vzniklé částice se dá měnit různými postupy přípravy. Umožňuje to vyladit vhodné vlastnosti a minimalizovat počet syntéz vzorků různé délky a chemického složení.

Další možnou přípravou je přímé rozpuštění ve vodě, které je ovšem velmi obtížné, skoro až nemožné. obecně se nedaří rozpustit přímo polymery s dlouhým hydrofóbním řetězcem ani jako 0,001 % (hm.). Vangyete a kolektiv[23] připravili nanočástice s relativně krátkým PCL řetězcem (M_n nepřesáhlo 3900g/mol) a to přímým rozpuštěním ve vodě o teplotě 80°C. Bohužel touto metodou se nepodařilo připravit polymery s vyšší molární hmotností hydrofóbního řetězce.

Metodami SANS a SAXS bylo zjištěno, že micely PCL-PEO připravené přímým rozpouštěním ve vodě za zvýšené teploty mají asi 20 nm v průměru,[23] zatímco micely připravené za pomocí organického rozpouštědla byly daleko větší. Dynamickým rozptylem světla byl u těchto micel naměřen hydrodynamický poloměr 50 nm.

Velmi často se jako organická složka rozpouštědla používá tetrahydrofuran (dále jen THF). Ve shodě s teoretickými předpoklady bylo zjištěno, že s rostoucí délkou nerozpustného bloku kopolymeru (v našem případě PCL) klesá rozpustnost ve směsi THF/voda.[24] Minimální zastoupení THF ve sledovaném rozpouštědle bylo 60% (bráno pro rozpuštění 5 mg kopolymeru v 1 ml rozpouštědla). Nástřik roztoku PCL/PEO ve směsi THF/voda do nadbytku vody vedlo ke stabilním mikročásticím, pouze v případě pokud zastoupení THF bylo 80 – 90%.

Zajímavým faktem bylo, že vzniklé nanočástice byly příliš velké a jejich agregační číslo bylo příliš velké pro klasickou micelární strukturu.

Byly již popsány konkrétní schopnosti kopolymeru PCL-PEO dopravovat látky na určitá místa v organismu.R.Savic[25] a kolektiv zkoumali dopravu barviva na bázi fluoresceinu. Barvivo bylo navázáno kovalentní vazbou na PCL blok kopolymeru PCL-PEO. Do té doby než byly micely rozbity barvivo nemělo žádnou signifikantní flurescenci. Micely byly stabilní jak v komplexech biologických medií, tak i přímo in vivo. (bezsrstá myš SKH-1).

P. Vangyete[23] a kolektiv připravili až 5 % (hm.) roztok přímým rozpouštěním ve vodě o teplotě 82 °C. Bylo zjištěno, že v tomto roztoku vedle sebe existují jak micely, tak volné unimery. Opět bylo potvrzeno, že micely připravené přímým rozpouštěním mají daleko menší poloměr než micely připravované rozpouštením v organických rozpouštědlech. Dále bylo v tomto článku publikováno, že agregační číslo micel se snižuje se snižující se délkou hydrofóbního bloku. Na velikost výsledných micel ovšem toto snižování agregačního čísla nemá vliv, protože se dá říci, že poloměr micely je skoro výhradně závislý na velikosti hydrofobního řetězce.

4.4 PLA-PEO

Námi studovaný kopolymer se již používá a má i nadálé velký potenciál jako látka pro cílenou dopravu a řízené uvolňování léčiv. Cílená doprava a řízené uvolňování léčiv se využívají z toho důvodu, aby se potlačily nežádoucí vlastnosti a léčivo bylo cíleně dopraveno do pouze určité části těla (například nádoru) a aby zde bylo cíleně uvolňováno.

Pokud vyvíjíme nové léčivo, velmi často vyvstává problém s tím, že velmi účinná léčiva mají velké nežádoucí účinky a naopak léčiva bez nežádoucích účinků (nebo pouze s malými) nejsou tak účinná. Jako další překážky při vývoji můžeme jmenovat špatnou distribuci do cílového orgánu, obtížnou rozpustnost a další.

V některých případech můžeme tento problém řešit právě již zmíněnou cílenou dopravou léčiv.

Pokud dopravíme léčivou látku právě a pouze do místa, kde je jí zapotřebí, zvýšíme tím její účinnost a potlačíme nežádoucí účinky.

Námi zkoumaný kopolymer se používá pro dopravu hormonů, protinádorových léčiv a antibiotik. Jeho účinnost se již prokázala v několika farmaceutických produktech, které se již dnes používají. Za všechny jmenujme například Nutropin Depot, vyráběný firmou Genetech, kde je dopravovanou látkou růstový hormon, a Decapeptyl, kde je účinnou látkou Triptorelin, která se používá pro léčbu rakoviny prostaty.

Vhodný systém pro dopravu léčiva jsou například námi zkoumané micely. Micela, nejčastěji ve vodném roztoku, je agregát s hydrofilní částí molekuly orientovanou do vodné fáze a hydrofóbní částí skrytou uvnitř micely. Micela je nejčastěji kulička, alé může být i válcového nebo elipsoidního tvaru. Tento tvar záleží jak na vlastnostech dané látky, která micely tvoří, tak i na vlastnostech roztoku jako například pH, teplota apod. Tyto micely mívají velikost v řádu desítek nanometrů.

Pro dopravu a uvolnění léčiva, které je uloženo v micele do nádoru, je využíváno toho, že micely mají vysokou relativní molekulovou hmotnost, a tak jsou přednostně ukládány do nádorů, jelikož cévy jsou v těchto nádorech daleko propustnější než v ostatní tkáni. Proto může těmito cévami vstoupit do nádoru částice až o velikosti 100 nm, což je při velikosti našeho kopolymeru 30 nm více než dostačující.[20] Další nedokonalostí nádoru je často naprosto neexistující odvod lymfy. Micely se tedy snadněji dostanou do nádorové tkáně a zde se hromadí. Koncentračně může být rozdíl až o řád oproti koncentraci v okolní tkáni. Spolu s micelami se v nádoru tedy hromadí i cytostatikum, zatímco ostatní micely se pohybují v krevním řečišti, odkud jsou po rozpadu na unimery odfiltrovány ledvinami.

V roztoku se ustanovuje dynamická rovnováha mezi molekulami unimeru a micelami. Proto může být polymerní nosič (přes svojí vysokou molekulovou hmotnost) vyloučen z organismu, poté, co dopraví léčivo na místo určení, a to ve formě unimeru. Tento mechanismus bude fungovat pouze za předpokladu, že unimer má molekulovou hmotnost pod renálním prahem. Jako nevýhodu této nestability lze poukázat na to, že díky tomuto vylučování se značně snižuje doba, po kterou látka cirkuluje v krevním řečišti, a tím se snižuje její účinost ukládání se v nádoru. Tato nevýhoda se potlačuje chemickým síťováním jádra pomocí tzv. biodegradovatelných vazeb.

Léčivo může být v micele navázáno dvěma způsoby, a to buď hydrofobní interakcí, tedy rozpuštěním v jádře molekuly, nebo kovalentní vazbou na polymerní nosič. Hydrofóbní vazání je co do principu značně jednodušší a univerzálnější, ale je daleko obtížnější řídit uvolňování přípravku z polymerní micely. Naopak při použití biodegradovatelné vazby můžeme snadno řídit rychlost uvolňování léčiva a toto uvolnění spustit až poté, co je micela i s léčivem umístěna v nádoru. Proto nedochází k uvolňování léčiva do krevního řečiště čímž se zvyšuje účinnost dopravy. Jako příklad můžeme ukázat mechanismus hydrazonové vazby. Stabilita této vazby se značně liší v závislosti na pH okolí. Proto tedy ve slabě kyselém prostředí nádoru (kyselost tohoto prostředí je způsobena hypoxií) je tato vazba labilnější než v neutrálním prostředí krevního řečiště.

Velmi často zkoumanou veličinou u těchto polymeru je stabilita a jejich biodegradovatelnost.[2]

Degradace našeho polymeru probíhá mechanismem náhodné hydrolýzy hlavního řetězce. Stupeň hydrolýzy je pak závislý na několika faktorech jako je složení polymeru a jeho molekulová hmotnost, jeho hydrofobicita a krystalinita. Pokud použijeme tento polymer pro cílenou dopravu léčiv musíme uvážit další faktory ovlivňující hydrolýzu, jako je struktura a morfologie jeho nanočástice.

V tomto případě byla studována a porovnávána biodegradovatelnost našeho kopolymeru tedy PLA-PEO, dále pak pouze PLA Tyto polymery byly studovány metodami NMR a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Dalšími metodami k měření byly test degradace „in vitro“ a pro stanovení molekulové hmotnosti polymeru pak také gelová permeační chromatografie. Mezi zajímavá zjištění získaná z těchto měření patří to, že teplota skelného přechodu T_g je pro PLA-PEO je nižší než pro homopolymer PLA. Jak je dobře známo, teplota skelného přechodu je závislá na molární hmotnosti, kterou má PLA-PEO větší než PLA, ale obsahuje bloky ethylenoxidu, které naopak tuto teplotu snižují. Teplota skelného přechodu pro polymer v mikročástici je vždy výrazně vyšší než pro polymer v makroskopickém vzorku.

Lze říci, že fyzikální struktura mikročástice ovlivňuje rychlost degradace polymeru, stejně jako průměrnou ztrátu molekulové hmotnosti a absorpci vody. A také bylo zjištěno, že čím více je polymer hydrofilní, tím je jeho biodegradace rychlejší. Tedy pokles molekulové hmotnosti je u PLA-PEO větší než u homopolymeru PLA a to jak ve větší částici tak i v mikročástici.

První popis přípravy ABA trojbloku, kde A je PLA a B je PEO byl publikován v roce 1987 S. Cohnem a jeho kolektivem[3]. Kopolymer byl připraven polykondenzací kyseliny mléčné v přítomnosti PEO v inertní atmosféře. Jako katalyzátor byl použit Sb_2O_3 a kyseliny fosforu. Výsledný polymer měl složení v rozmezí 20 - 80% molárních PLA s PEO řetězci o průměrné molekulové hmotnosti 600 až 6000. Značnou nevýhodou této přípravy byla poměrně dlouhá reakční doba (větší než 35 hodin) a značná teplota (kolem 200°C)

V roce 1990 se podařilo Dengovi a jeho kolektivu za použití chloridů cínu jako katalyzátorů také připravit ABA trojblok.[4] Polymer byl syntetizován v makroskopické částici při teplotách 170-200°C a vznikl polymer s pouze jedním píkem v gelové permeační chromatografii a s poměrně nízkou polydisperzitou $M_w/M_n = 1,39$. Účinnost polymerizace byla v tomto případě 84%.

Kolektivu kolem S. Amarpreeta se podařilo syntetizovat PLA-PEO, když jako katalyzátor použili 2-ethylhexanoát cínatý, který je daleko méně jedovatý než dříve používané katalyzátory. Polymerizace byla prováděna metodou tzv. otevírání kruhů.[5] Následně pak mikročástice vzniklého polymeru uvolňoval více než 2 měsíce molekuly lidského sérového albuminu, předtím do nich solubilizované.

Zhu a kolektivu se podařilo docílit účinnosti polymerizace až 96%, když opět použili acetáty cínu jako katalyzátor.[6] Teplota, při které polymerizace probíhala, byla v rozmezí 180-190°C a doba polymerizace byla 10 hodin. Vzniklý kopolymer měl ovšem poměrně malou molekulovou hmotnost (méně než 10000) a poměrně vysokou polydisperzitu $M_w/M_n = 2,0$-$3,0$.

Byly zkoušeny i další kovové oxidy jako katalyztory a GeO_2 a SnO_2, ovšem bez úspěchu. I při vysokých teplotách byla účinnost polymerizace nízká. Sb_2O_3 dokonce způsoboval částečně racemizaci L-laktidu. Pouze SnO se ukázal jako použitelný.[7] Ovšem při studiu vzniklého kopolymeru gelovou permační chromatografii se na chromatogramu objevily píky, které odpovídaly vzniklému homopolymeru PLA

Další, komu se povedlo kopolymer syntetizovat, byl Li a kolektiv, který jako katalyzátor použil zinek a CaH_2.[8] Zbytkové ionty zinku a vápníku nebyly ve vzniklém systému toxické a stopové množství těchto iontů se snadno odstranilo filtrací po proběhlé polymerizaci.

Nevýhodou této polymerizace byla její dlouhá doba, a to 4-7 dní. Další nevýhodou byla nízká molekulová hmotnost vzniklého polymeru.

Jako další možnost katalýzy lze použít triisopropooxid hlinitý pro kopolymerizaci L-laktidu s poly(ethylenoxidem)[9] Polymerizace probíhala při 150°C a opět v makroskopickém vzorku. Vzniklý kopolymer byl proměřen gelovou permeační chromatografií, která ukazovala úzkou a unimodální distribuci molekulové hmotnosti. Účinnost této polymerizace byla 90%.

Deng a kolektiv použili jako komplexní katalyzátor $Al(^{i}Bu)_3 – H_3PO_4 – H_2O$.[10] Teplota polymerizace byla 140-160°C a konverze byla více jak 90%. Zastoupení PEO a kvalitní katalyzátor měly výborný vliv na molární hmotnost vzniklého polymeru. Distribuce molekulové hmotnosti byla malá, $M_w/M_n = 1,29\text{-}1,83$.

Jako další katalyzátory pro syntézu v roztoku byly použity některé alkoxidy kovů vzácných zemin. Opět Deng a jeho kolektiv publikoval syntézu kopolymerů za použití acetátu lanthanu jako katalyzátoru .[11] Tento katalyzátor je stabilní a relativně snadný na připravu. Konverze ovšem v tomto případě byla nízká a to 60-87%. Struktura tribloku byla potvrzena pomocí ^{13}C - NMR a ^{1}H – NMR spektroskopie.

Další možností je použití aniontové polymerizace. Touto metodou se zabýval Jedlinshi a jeho kolektiv[12] a Kricheldorf se svým kolektivem[13]. V těchto přípravách bylo použito makroiniciátorů a to sodných a draselných solí PEO.

Zhu a jeho kolektiv připravili pomocí draselných solí trojblok kopolymeru ABA.[14] Aniontová polymerizace probíhá velmi rychle, a proto všechen laktid zreaguje asi během 5 minut. Reakce ovšem není tak selektivní, a proto má vzniklý kopolymer velkou polydisperzitu a to $M_w/M_n = 3,0\text{-}4,2$. I použití PEO je limitované.

V posledních letech se nízkomolekulární multiblokový PLA-PEO připravuje postupnou kondenzací PEO a PLA.[15] Vzniklý kopolymer má poměrně úzkou distribuci molární hmotnosti $M_w/M_n = 1,25\text{-}1,74$. Účinnost polymerace je 80-90%.

Pro zlepšení vlastností PLA-PEO lze postupovat tak, že mezi bloky řetězce PLA vložíme segmenty PEO. Deng a jeho kolektiv připravovali tyto kopolymery o různém složení PEO (0-50% PEO).[16] Podařilo se také připravit blokový kopolymer o stejném složení (10% PEO) a různé molární hmotnosti.

Li a kolektiv také dokázal, že vložení bloků PEO do PLA mohou snížit emulzifikaci při přípravě mikročástice.[17] Příčinou je pravděpodobně velký rozdíl mezi vysokou hydrofilicitou bloků PEO a hydrofobicitou PLA

Hydrofilní doména kopolymeru může sloužit jako stabilizátor proteinu, a tak zlepšit jeho stabilitu a zvýšit efektivitu při cílené dopravě léčiv. Bylo zjištěno, že mikrosčástice připravená

z PLA-PEO má vyšší nosnou kapacitu než homopolymer PLA. Degradaci kopolymeru je možné měnit složením kopolymeru. Molární hmotnost a hydrofobicitu lze upravovat vkládáním PEO a jeho umístněním v řetězci.[6]Jako další kladnou vlastnost lze vyzdvihnout dobrou biokompatibilitu našeho kopolymeru při pokusech in vivo.

Je zde několik důvodů proč použít právě PLA-PEO při cílené dopravě proteinů. jedním z důležitých důvodů je zvýšení stability proteinu při přepravě právě PLA-PEO. Jako další důvod můžeme jmenovat to, že mikročástice PLA-PEO se uvolňují průběžně a plynuleji než jsou-li uvolňování ze samotného PLA. Na závěr lze zmínit, že biodegradace PLA-PEO je velmi závislá na molární hmotnosti a proto může být velmi snadno laděna molární hmotností PEO a/nebo poměrem mezi molární hmotností PEO a PLA. Jako víceméně jen částečnou výhodu z hlediska chemie (spíše lze říci, že tato vlastnost je vhodná pro transport) je možno uvést, že mikročástice PLA-PEO lze lyofilizovat do pevné fáze, která je daleko více vhodná pro transport, chlazení a skladování než kapalná fáze.

Jak je již zřejmé je mnohem výhodnější použít PLA-PEO pro cílenou dopravu proteinů než samotný PEO nebo PLA

5. Experimentální část

5.1 Chemikálie

Námi používaný kopolymer PLA-PEO byl zakoupen od firmy Aldrich. jeho charakteristiku můžete vidět v tabulce 1.

Tabulka 1:

vzorek	M_w	M_w(PLA)	M_x(PEO)	M_w/M_n
PLA-PEO	24,8	3,7	2,5	1,20
PCL-PEO	20,8	2,7	2,5	1,19

molekulová váha je udávána v kg/mol.

DPH bylo nakoupeno od firmy Fluka, stejně jako aceton a tetrahydrofuran. Jako rozpouštědlo byla používána deinonizovaná voda. Pro NMR měření byly používány $CDCl_3$ a D_2O, (99,8% D) Chemotrade (Lipsko, SRN).

K přípravě vzorku PLA-PEO bylo použito následujícího postupu.10 mg vzorku jsem rozpustil ve směsi THF/voda (zastoupení THF 90%) a nechal na třepačce klepat do druhého dne. Tento roztok byl pak po kapkách přikapáván do 4 ml vody, za stálého míchání. Nakonec byl vzniklý roztok několikrát dialyzován proti vodě, aby se vyplavil všechen THF. Stejně bylo postupováno při přípravě vzorku pro NMR, pouze s tím rozdílem, že místo vody byla použita těžká voda.

Při značení vzorku pomocí DPH byl přidán 1 μl 5 mM roztoku DPH v acetonu do 2 ml vodného roztoku hvězdicového kopolymeru (c = 1,5mg/ml). Po přidání této značky se roztok nechal 24 hodin ustálit.

5.2 Přístrojové vybavení

Měření rozptylu světla bylo prováděno na fotometru ALV (Langen, Německo), skládajícího se z He-Ne laseru (λ = 633 nm), goniometru ALV CGS/8F, detektoru ALV high QE APD a korelátoru ALV 5000/EPP. Roztok byl před měřením přefiltrován na přes mikrofiltry Acrodisk (0,45 μm) a měření probíhalo při 20 °C.

AFM bylo měřeno na Digital Instrument NanoScope dimension 3, vybaveném křemíkovými hroty o tuhosti 40 N/m. Polymerní micely byly umístěny na čerstvých odlouplých plátkách slídy (teoretický vzorec $KMg_3AlSi_3O_{10}(OH)_2$). Po nanesení vzorku na slídovou destičku z něj byla odpařena voda a byl sušen cca 5 hodin ve vakuové pícce.

^1H NMR spektroskopie v $CDCl_3$ a D_2O byla měřena na spektrometru Varian 300 při 25 °C.

Jako referenční signály byly použity reziduální signály rozpouštědel (7,26 ppm pro chloroform a 4,80 ppm pro vodu)

Stacionární fluorescence a anisotropie byly měřeny v 1 cm čtvercové kyvetě na fluorometru SPEX Fluorolog 3 – 11. Časově rozlišená fluorescence byla měřena metodou časově korelovaného čítání fotonů na přístroji Edinburgh ED 299 T. Fluorometr byl vybaven zdrojem NanoLED (IBH, Glasgow, Velká Británie). Pulsní dioda emitovala světlo s vlnovou délkou λ = 370 nm, šířkou pulsu 1,5 ns a repetiční frekvencí 1 MHz.

6. Výsledky a diskuze

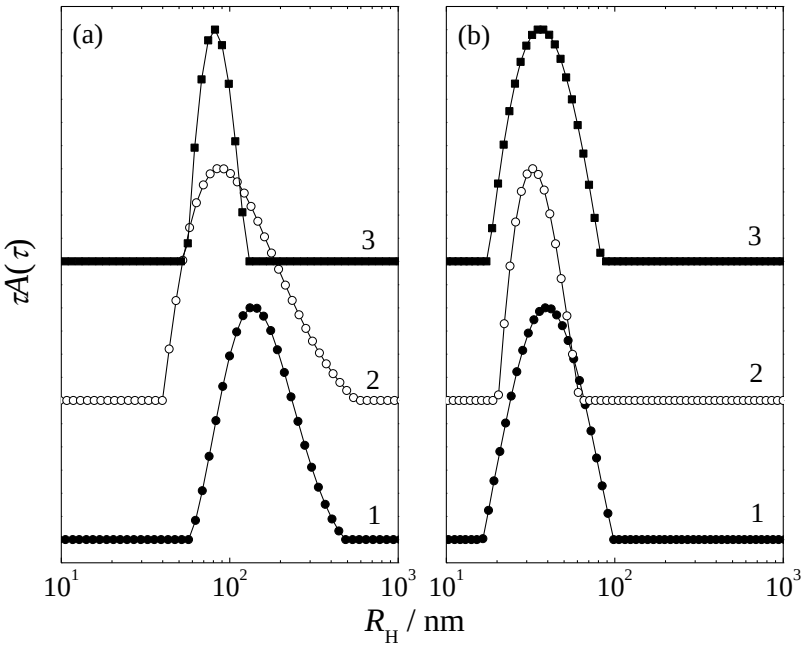
V mé práci jsem studoval kopolymer PLA-PEO metodami dynamického a statického rozptylu světla (DLS a SLS), ^{1}H NMR spektroskopii, mikroskopií atomárních sil (AFM) a fluorometrií. Získaná data pak byla porovnána s daty kopolymeru PCL-PEO.

Oba kopolymery měly stejnou strukturu, a to čtyřramenné hvězdice, kde ramena byla z hydrofilních bloků a uvnitř, v centru byly bloky PEO. Na základě toho, že PLA je méně hydrofobní než PCL bylo možné předpokládat, že asociační číslo bude nižší pro první zmíněný kopolymer. Ukázalo se, že tato představa pro popis nestačí.

6.1 DLS a SLS

Měření dynamického rozptylu (obr. 1) odhalilo, že oba polymery mají unimodální, ale ovšem poměrně širokou distribuci velikosti částic.

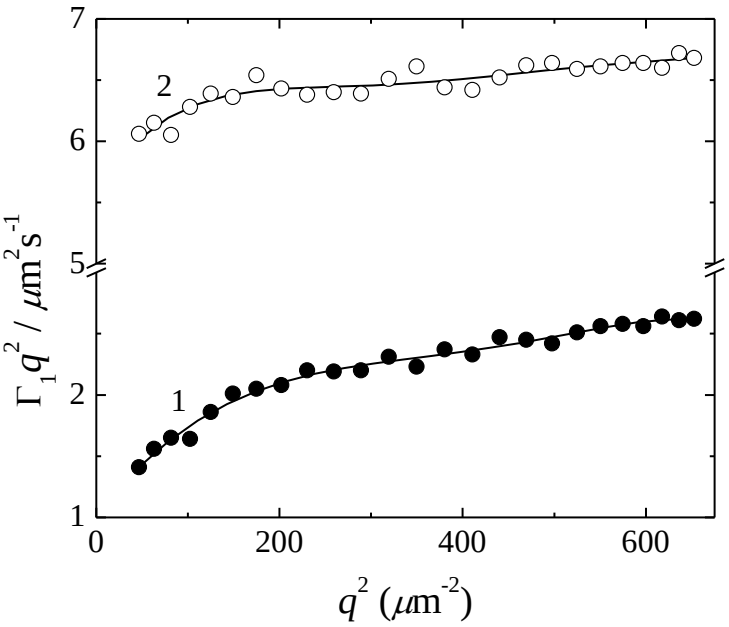
Obr 1.



Distribuční křivky hydrodynamických poloměrů získané měřením DLS pro kopolymer (a) $(PCL\text{-}PEO)_4$ a (b) $(PLA\text{-}PEO)_4$ o koncentraci c = 1,5 g/l. Měření bylo prováděno při úhlech θ = 45° (křivka 1), 90° (křivka 2) a 135° (křivka 3).

Velká polydisperzita částic obou kopolymerů (zvláště pak $(PCL\text{-}PEO)_4$) způsobuje značnou závislost hydrodynamického poloměru a difúzního koeficientu na úhlu měření. (obr. 2)

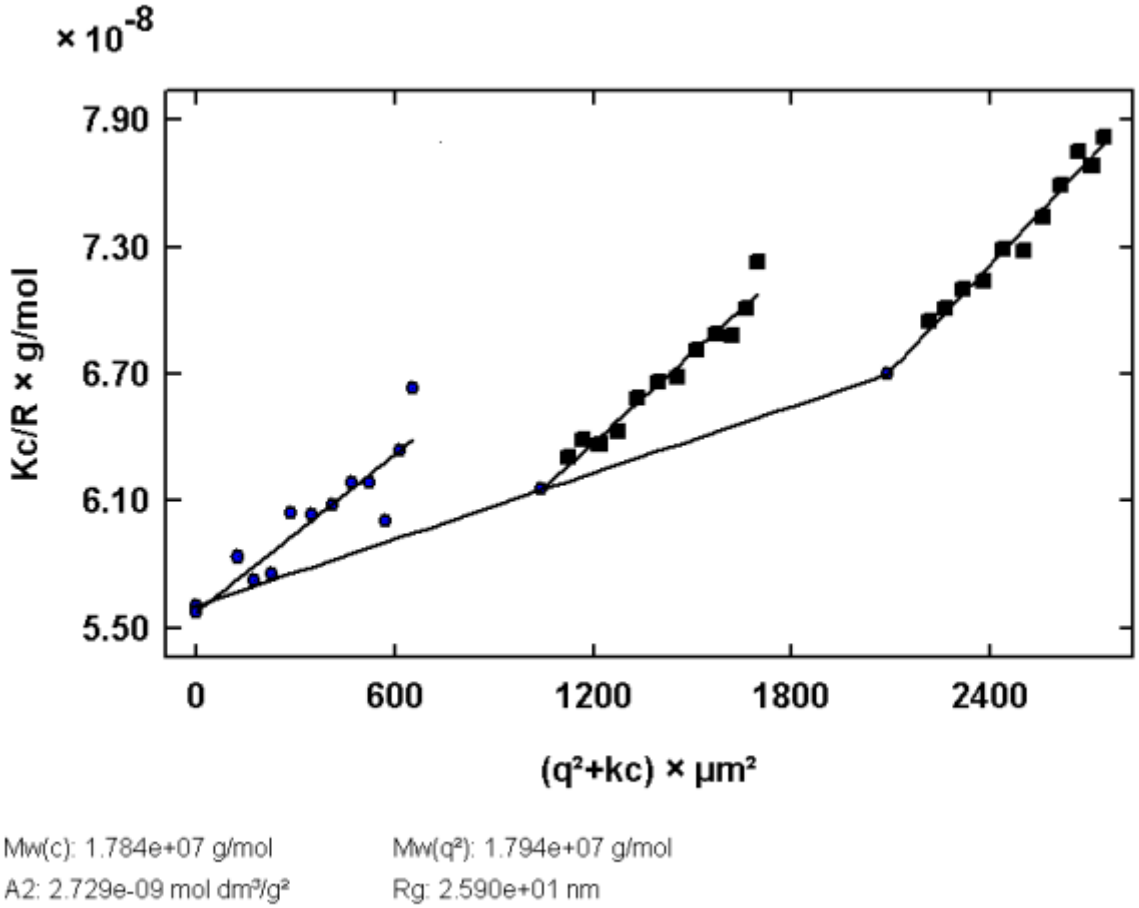
Obr. 2



Závislost difúzního koeficientu na čtverci rozptylového vektoru q^2. Koncentrace kopolymeru byla c = 1,5 g/l. Křivka 1 $(PCL\text{-}PEO)_4$, křivka 2 $(PLA\text{-}PEO)_4$.

Nejprve jsme změřili SLS pro $(PLA\text{-}PEO)_4$ ovšem získaná data se nedala zpracovat Zimmův diagramem. Proto byly zachovány pouze data pro rozptylové úhly od 60°-150°. Tato data již poskytovala rozumné výsledky viz obrázek 3.

obr 3.



Výsledky z SLS a DLS jsou ukázány v tabulce 2.

Tab 2.

kopolymer	$M_w^{agg}\times10^{-6}$(g/mol)	$\langle S^2\rangle_z^{1/2}$(nm)	$\langle R_H^{-1}\rangle_z^{-1}$(nm)	ρ^a	Z[b]	d_{eff}(g/cm^3)[c]
$(PCL\text{-}PEO)_4$	1318	235	201	1.17	63400	0.021
$(PLA\text{-}PEO)_4$	7.8	37	38	0.97	314	0.019

a – poměr hydrodynamického a gyračního poloměru $\rho = \langle S^2\rangle_z^{1/2}\langle R_H^{-1}\rangle_z$

b – asociační číslo

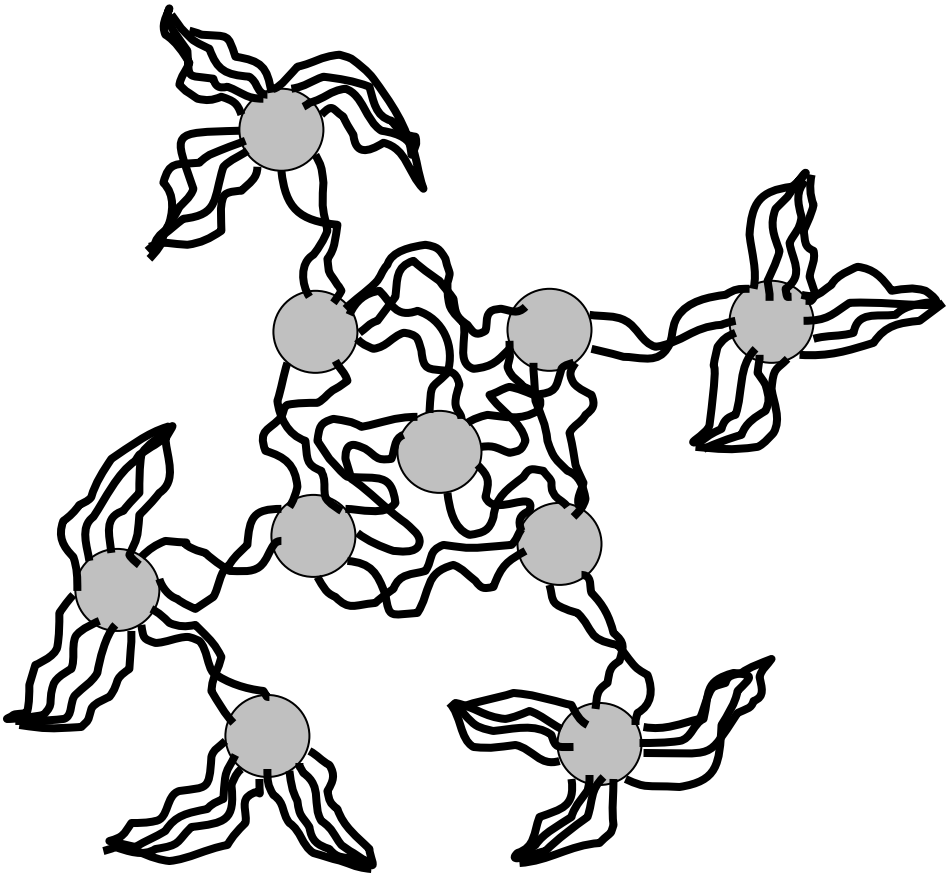
c – efektivní hustota $d_{eff} = 3M_w\langle R_H^{-1}\rangle_z^3/4\pi N_A$

Nanočástice $(PCL\text{-}PEO)_4$ jsou větší a mají vyšší molární hmotnost než nanočástice připravené z kopolymeru $(PLA\text{-}PEO)_4$. Hodnoty poměru gyračního a hydrodynamického poloměru ukazují, že nanočástice $(PLA\text{-}PEO)_4$ jsou kompaktnější než nanočástice $(PCL\text{-}PEO)_4$. Z důvodu vysoké polydisperzity je nutné se tímto zabývat hlouběji. Pro polydisperzní vzorky se pro porovnání jejich kompaktnosti používá efektivní hustota. Jak je vidět z tabulky 2, ta je srovnatelná pro oba kopolymery. Lze tedy říci, že oba kopolymery mají strukturu osmaocených agregátů obklopených vodou.

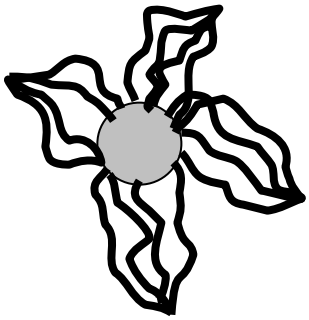
Struktura studovaných hvězdic se podobá několika trojblokům ABA (kde A a B jsou rozpustné a nerozpustné bloky), spojených v centru řetězce (obrázek 4a). Domívám se, že pokud má čtyřramenná hvězdice stejné asociační chování jako trojblok ABA, potom hvězdicový kopolymer může tvořit „květinové“ micely (z angl. flower micelles) (obrázek 4b) s jádrem z hydrofobního bloku a obalem z PEO bloků. Na rozdíl od $(PLA\text{-}PEO)_4$ nemůže mít $(PCL\text{-}PEO)_4$ klasickou micelární strukturu, protože jeho gyrační poloměr je více jak sedmkrát větší než rameno hvězdice a jeho asociační číslo je příliš velké. Může tedy mít buď strukturu vesikuly, nebo micelárních agregátů (shluku micel).

Obr 4.

A



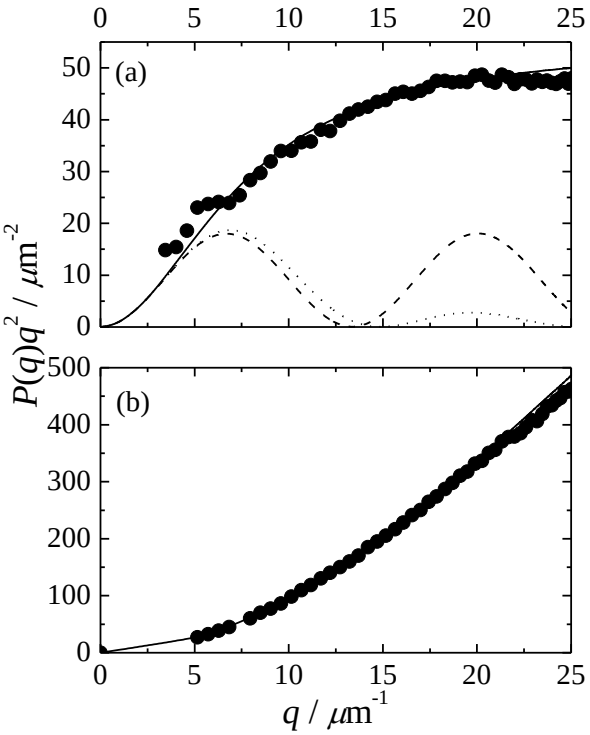
B



Pro zjištění přesné struktury bylo změřeno SLS v rozsahu 20° - 150° s krokem 2,5° pro velmi zředěný roztok $(PCL\text{-}PEO)_4$ (c = 15 mg/l). Získané body $P(q)$

($P(q)=R_\theta(q,c_0)/R_\theta(q\rightarrow 0,c_0)$ byly vyneseny do Kratkyho digramu ($P(q)q^2$ na q) (obrázek 5a) spolu s daty pro $(PLA\text{-}PEO)_4$ (c = 180mg/l) (obrázek 5b). Pro porovnání obsahoval obrázek 5 form faktory tuhých koulí (čárkovaná čára), sférické vrsty (tečkovaná čára) a polydisperzního klubka (plná čára) experimentálně získaných pro $(PCL\text{-}PEO)_4$ $\langle S^2\rangle_z^{1/2}$ = 235 nm a pro $(PLA\text{-}PEO)_4$ $\langle S^2\rangle_z^{1/2}$ = 37 nm.

Obr 5



Rozptyl světla pro $(PLA\text{-}PEO)_4$ může být popsán Guinierovou aproximací pro celý rozsah měřených úhlů a odchylka od form faktorů pro $\langle S^2\rangle_z^{1/2}$ = 37 nm je zanedbatelná. Na rozdíl od toho kopolymer $(PCL\text{-}PEO)_4$ poskytuje při vyšších hodnotách rozptylového úhlu q značnou odchylku od form faktoru tuhých koulí pro $\langle S^2\rangle_z^{1/2}$ = 235 nm a ukazuje se, že lépe se dá popsat pomocí form faktoru polydisperzních klubek s tím, že částice mají vyšší hustotu (jak jádra, tak propojujících PEO řetězců) v centru, než na okraji. Lze tedy říci, že koplymer $(PCL\text{-}PEO)_4$ má strukturu shluku micel.

Tento závěr je navíc podepřen faktem, že konformace na pbr. 4b je entropicky nevýhodná, což vede k systému shluku micel propojených sdílenými unimery.

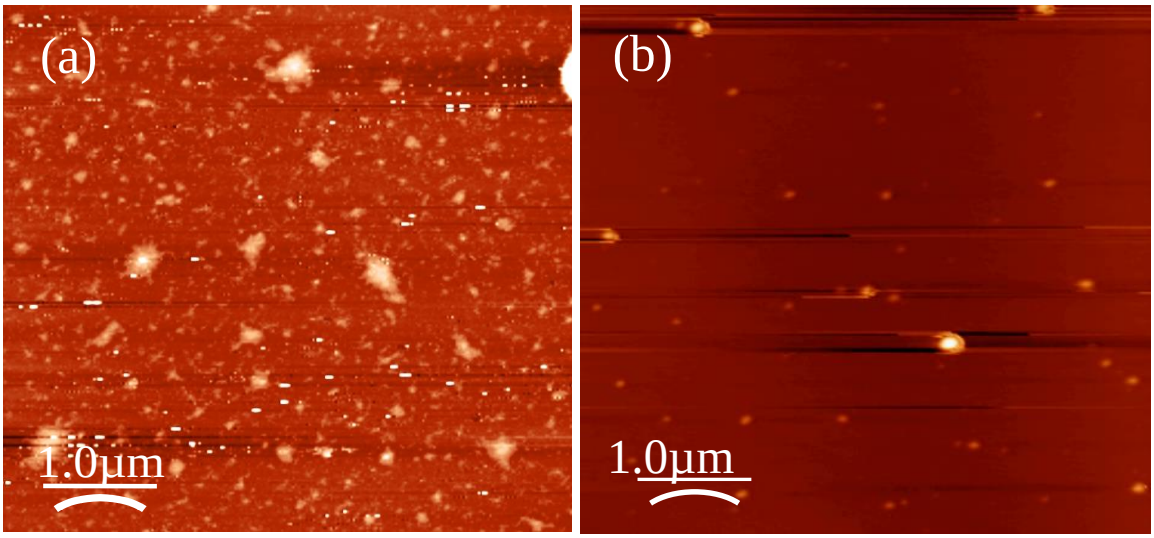
Není bez zajímavosti, že Lu a kolektiv[22] popsal čtyřramenný hvězdicovitý kopolymer $(PCL\text{-}PEO)_4$ s kratšími PCL bloky poskytující sol-gel přechod přesně při kritické koncentraci ve vodných roztocích. Je pravděpodobné, že tento kopolymer bude mít podobnou stavbu jako

mnou studovaný v zředěném roztoku. Z toho důvodu je pravděpodobné že shluky micel jsou složeny z relativně malých stavebních bloků, tedy z několika málo nerozpustných jader (kineticky zamrzlých) s relativně dlouhými a solvatovanými PEO bloky.

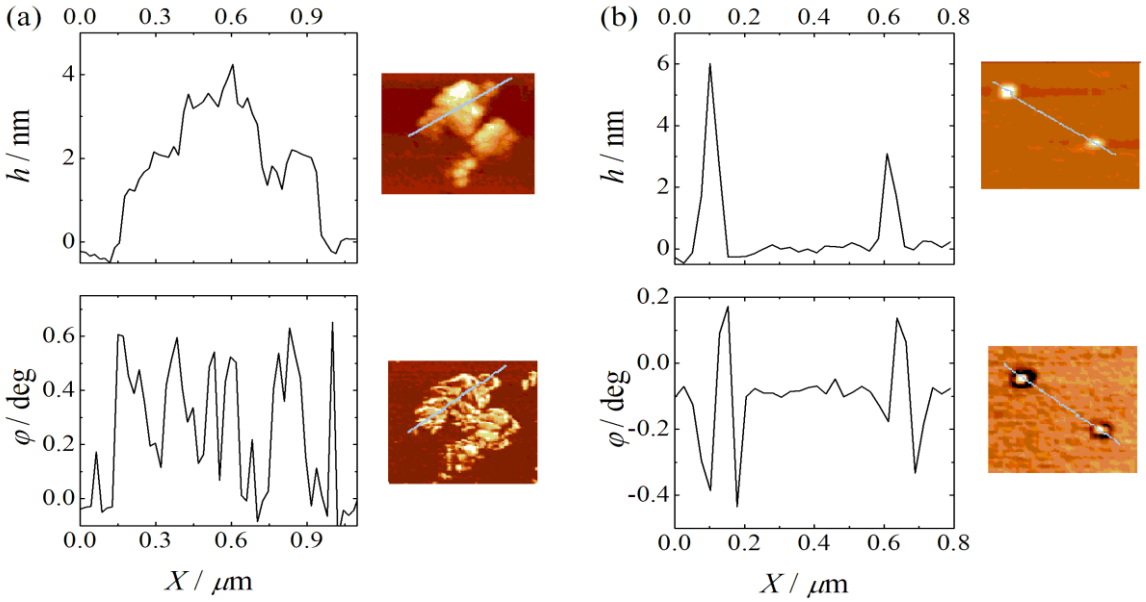
6.2 AFM

Obrázky z měření AFM jsou označeny 6a a 6b. Na těchto skenech je možné krásně vidět iregularitu a polydisperzitu částic Dalším výstupem z AFM jsou grafy a obrázky ukazující jednu částici shora (horní řada) a zespodu (spodní řada) (7a – PCL-PEO) (7b – PLA-PEO). Jak je vidět na obr. 7a kopolymer s PCL je značně deformován a to do tvaru „lívanců“, které měly horizontální velikost asi 1 μm a výšku asi 4 nm. Tato deformace byla patrná i u kopolymeru PLA-PEO, ale nebyla zdaleka tak velká, je vidět, že kopolymer má klasickou micelární strukturu(b). Struktura nanočástic, poté co jsou vysušeny před AFM, se drasticky mění.

Obrázek 6:



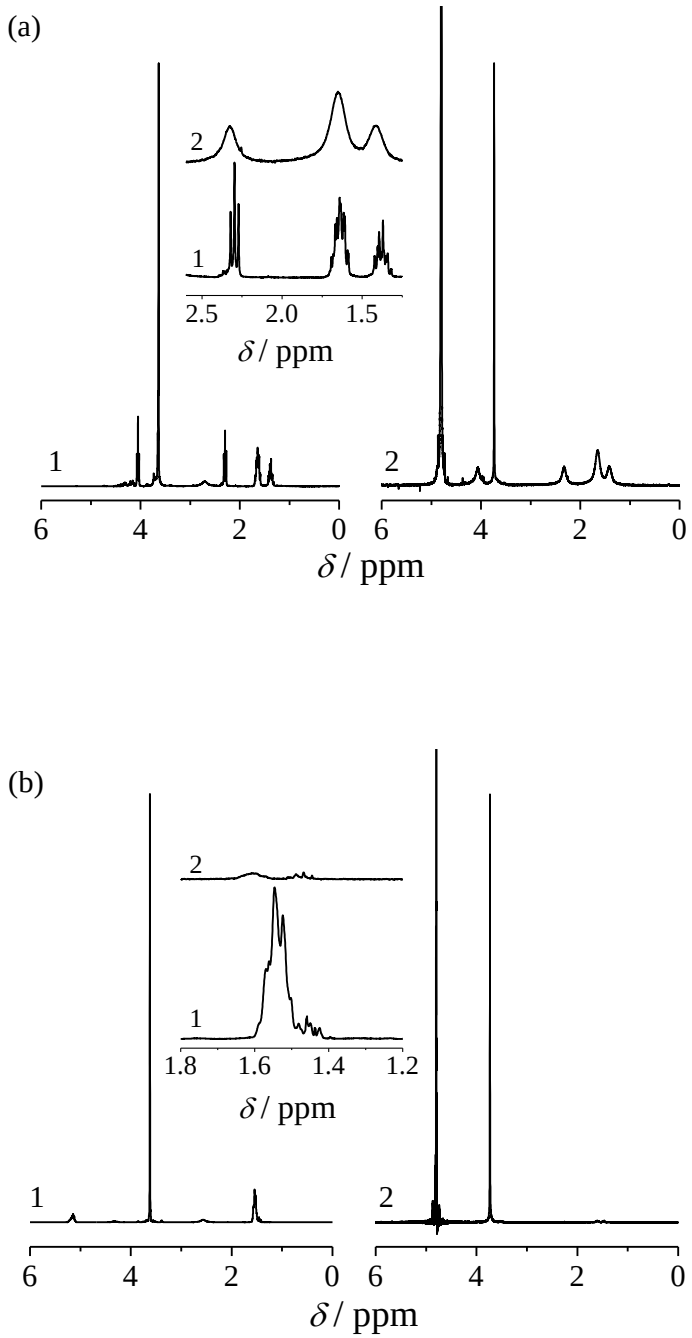
Obrázek 7:



6.3 ^{1}H NMR spektroskopie

Naměřená spektra PLA-PEO a PCL-PEO v D_2O jsou spolu se spektry v $CDCl_3$, což je dobré rozpouštědlo pro oba bloky, na obrázkách 8a a 8b. Menší obrázky vložené do spekter ukazují signály CH_3 protonů z PLA a CH_2 z PCL, normalizované na intenzitu signálu CH_2O v PEO. Srovnání spekter neukazuje pouze rozšíření signálů PLA a PCL protonů v nanočásticích v porovnání s unimery PLA-PEO a PCL-PEO v $CDCl_3$, ale i markantní rozdíl v intenzitách PLA a PCL protonových signálů vůči protonům v CH_2O v PEO na 3,7 ppm měřených v D_2O roztoku. Bylo zjištěno že při měření $(PCL\text{-}PEO)_4$ v D_2O je signál z hydrofóbních bloků silně potlačen, z toho je tedy jasné, že pohyblivost jádra z PCL je větší než v případě jádra PLA.

Obrázek 8:

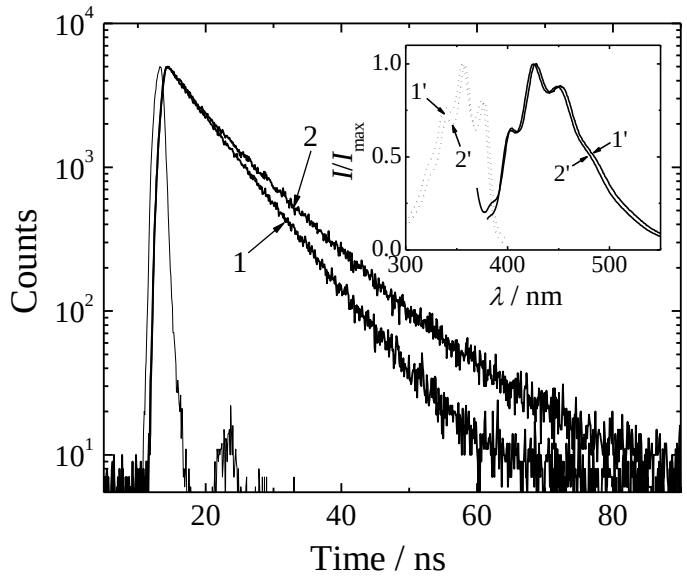


6.4 Fluorescence

Výsledky z měření časově rozlišené fluorescence jsou na obrázku 9 spolu se spektry ze stacionární fluorescence. Parametry dvojexponenciáloního prokladu vyhasínání , vypočtená doba života a stacionární anisotropie jsou v tabulce 2. Jak je vidět z této tabulky (konkrétně podle doby života), tak umístění značky v $(PLA\text{-}PEO)_4$ je více heterogenní a má

menší průměrnou mikropolaritu než v kopolymeru (PCL-PEO)$_4$. Tento výsledek je značně překvapivý, když si uvědomíme, že PLA je méně hydrofilní než PCL. Jedno z možných vysvětlení je to, že domény tvořené PCL jsou natolik malé, že nedokážou pojmout molekuly DPH, a tak jsou částečně obklopeny polárním mikrookolím mimo jádro.

obr 9.



Rotační korelační časy vypočtené podle rovnice 2.1 (počáteční hodnota anisotropie DPH $r_0 = 0{,}362$) měřené v glycerolu, pří teplotě -60 °C jsou také uvedeny v tabulce 3. Ve shodě s výsledky z NMR spektroskopie můžeme říct, že získané hodnoty φ ukazují, že rotační pohyb DPH v (PLA-PEO)$_4$ je významně omezený než v případě (PCL-PEO)$_4$.

Tabulka 3:

kopolymer	$\tau_{F,1}$[a] (ns)	F_1[a]	$\tau_{F,2}$[a] (ns)	τ_F[b] (ns)	r[c]	φ[d](ns)
PLA-PEO	7,1	0,97	0,5	6,89	0,119	3,4
PCL-PEO	11,8	0,67	6,2	9,96	0,295	43,8

a – parametry pro dvojexponenciální fit vyhasínání

$$I(t) \propto \left[F_1 / \tau_{F,1}\right]\exp\left(-t / \tau_{F,1}\right) + \left[\left(1-F_1\right) / \tau_{F,2}\right]\exp\left(-t / \tau_{F,2}\right)$$

b – doba života emise $t_F = F_1 t_{F,1} + \left(1-F_1\right)\tau_{F.2}$

c – stacionární anisotropie

d – korelační čas rotace. (viz rovnice 2.1)

7. Závěr

Z naměřených výsledků tedy vyplývalo, kopolymer $(PCL\text{-}PEO)_4$ nemůže mít na rozdíl od $(PLA\text{-}PEO)_4$ klasickou micelární strukturu, protože jeho agregační číslo je příliš velké a dále, že pokud jsou molekuly v kineticky zamrzlém nerovnovážném stavu, tak vyšší flexibilita PCL bloků oproti PLA (viz výše) v jádře může ovlivnit průběh asociace.

Z dat získaných metodou AFM tedy můžeme opět říci, že $(PLA\text{-}PEO)_4$ má klasickou micelární strukturu. Narozdíl od toho má kopolymer $(PCL\text{-}PEO)_4$ strukturu značně složitější, složenou z několika domén, které poskytují různou interakci s hrotem AFM.

8.Citace

1 . B. J. Tarasevich, A. Gutowska, X. S. Li, B.-M. Jeong Journal of biomedical materials research 2009, vol. 89, n°1, p. 248-254

2. Rossella Doratia, Ida Gentaa, Claudia Colonnaa, Tiziana Modenaa, Franca Pavanettoa, Paola Peruginia and Bice Conti Polymer Degradation and Stability Volume 92, Issue 9, September 2007,p. 1660-1668

3. H. Younes, D. Cohn J biomed. Maters. Res. 21 (1987) p. 1301-1316

4. X. M. Deng, C. D. Xiong, L. M. Cheng, R. P. Xu J. Poly. Sci. Polym. Lett. 28 (1990) p. 411 – 416

5. S. Amarpreet, P. Chandrashekhar, A.H. Jeffery, Macromolecules 26 (1993) p. 581-587

6. K. J. Zhu, X. Z. Lin, S. L. Yang, J. Apply. Polym. Science 39 (1990) p.1-9

7. X. Zhang, D. A. MacDonld, M. F. A. Goosen, K. B. McAuley J. Poly. Sci. Polym Chem. 32 (1994) p. 2965-2970

8. S. M. Li, I. Rashkov, J. L. Espartero, N. Manolova, M. Vert, Macromolecules 29 (1996) p. 57 – 62

9. T. Kissel, Y. X. Li, C. Volland, in: Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact.Mater, 1993, pp. 127–128

10. X. M. Deng, C. D. Xiong, L. M. Cheng, H. H. Huang, R. P. Xu, J. Appl. Poly. Scien. 55 (1995) p. 1193-1196

11. X. M. Deng, X. H. Li, M. L. Yuan, X. W. Li, C. D. Xiong, Z. T. Huang, W. X. Jia, Chin. J. Poly. Science 17 (1999) 265-270

12. Z. Jedlinski, P. Kurcok,W. Walach, H. Janeczek, I. Radecha, Makronol. Chem. 194 (1993) p. 1681 - 1689

13. H. R. Kricheldorf, C. Boettcher, Polylactones. makromol. Chem. macromol. Symp. 27 (1993) p. 47 – 63

14. Z. X. Zhu, C. D. Xiong, L. L. Zhang, M. L. Yuan, X. M. Deng, Eur. Polym. J. 35 (1999) p. 1821–1828.

15. K. M. Huh, Y. H. Bae, Polymer 40 (1999) 6147–6155.

16. X. M. Deng, X. H. Li, M. L. Yuan, C. D. Xiong, Z. T. Huang, W. X. Jia, Y. H. Zhang, J. Control. Release 58 (1999) p.123 – 131

17. X. H. Li, M. L. Yuan, C. D. Xiong, X. M. Deng, Acta Polym. Sinica 2 (1999) p. 156 – 161

18. Sang Yeob Park, Bo Ryeong Han, Kwang Myoung Na, Dong Keun Han, a Sung Chul Kim, Macromolecules 2003, 36, p. 4115-4124

19. Alexandridis, P.; Holzwarth, J. F.; Hatton, T. A. Macromolecules 1994, 27, p. 2414-2425
20. Kenji Yasugi, Yukio Nagasaki, Masao Kato, Kazunori Kataoka , Journal of Controlled Release 62 (1999) 89–100
21. T. Riley, C. R. Heald, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, and S. S. Davis Langmuir 2003, 19, p. 8428-8435
22. Lu CF, Liu L, Guo SR, Zhang YQ, Li ZH, Gu JR. Eur Polym J 2007 ; 43 p. 1857.
23. Vangeyte, P.; Leyh, B.; Heinich, M.; Grandjean, J.; Bourgaux, C.; Jérome, R. Langmuir 2004, 20, p. 8442.
24. Radek Šachl, Mariusz Uchman, Pavel Matějíček, Karel Procházka, Miroslav Stěpánek Langmuir 2007, 23, 3395-3400
25. Radoslav Savić, Tony Azzam, Adi Eisenberg, Dusica Maysinger Langmuir 2006, 22, p. 3570 - 3578