

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

**DEGRADACE POLYESTEROVÝCH NOSIČŮ VE VODNÉM
PROSTŘEDÍ**

DEGRADATION OF POLYESTER CARRIERS IN AQUEOUS
MEDIUM

Rigorózní práce

2013

Vypracovala: Mgr. Veronika Hašková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Děkuji vedoucímu práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při zpracování rigorózní práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Kandidát **Mgr. Veronika Hašková**

Konzultant **Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.**

Název rigorózní práce **Degradace polyesterových nosičů ve vodném prostředí**

V teoretické části předložené práce je podán přehled o syntéze polyesterů alifatických hydroxykyselin, o jejich vlastnostech a degradaci. Připojeny jsou informace o novějších metodách a o možnostech přípravy mikročásticových systémů. Experiment je cílen směrem k získání nových poznatků o chování kopolymeru PLGA ve vodném prostředí při nízkých teplotách, při nichž nedochází k deformaci tvaru testovaných oligoesterových tělísek. Hodnocenými parametry jsou stupeň bobtnání, stupeň eroze a koncentrace karboxylových skupin. Byl vyzkoušen vliv různé velikosti tělísek a úpravy jejich povrchu po dobu 14 dní od začátku působení vodného média. Byl potvrzen pulzační průběh bobtnání a koncentrace karboxylů. Jejich porovnatelný profil v čase je podkladem k vysvětlení mechanismu sledovaných jevů na základě obstrukčního efektu nebo změn koncentračního gradientu rozpustné frakce molekul i funkčních skupin zakotvených v gelové struktuře.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical technology

Candidate **Mgr. Veronika Hašková**

Consultant **Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.**

Title of Thesis **Degradation of polyester carriers in aqueous medium**

In the theoretical part of this thesis there is presented an overview concerning synthesis of polyesters aliphatic hydroxy acids, their properties and degradation. Review about modern methods of microparticles preparation is included. The experimental part is targeted towards to the new information about behavior of the copolymer PLGA in aqueous medium of low temperature. At these temperatures the tested oligoester bodies are not deformed. Evaluated parameters are swelling degree, erosion degree and concentration of carboxyl groups. Various weights of tested bodies and modifications of their surfaces were tested during two weeks period of the aqueous medium. Pulsation process of the swelling degree and end-carboxyl groups concentration were proved. Their comparable time profile is basic argument for explanation of observed and described phenomenon based on obstruction effect or changing concentration gradient of soluble fraction of the molecule and also functional groups embedded in gel structure.

ZADÁNÍ RIGORÓZNÍ PRÁCE

Téma práce bylo vypracováno a zadáno v návaznosti na výsledky dosažené v rámci diplomové práce (15). Cílem bylo zhodnotit průběh eroze, bobtnání a hydrolýzy alifatického oligoesteru PLGA ve vodném prostředí při teplotě 7°C v časovém intervalu 14 dní od začátku degradačního působení hydrofilního kapalného média. Zájem byl posoudit variabilitu zjištěných hodnot při trojnásobném až čtyřnásobném opakování, otestovat vliv velikosti tělísek a vliv velikosti různého počátečního povrchu tělísek. Po vyhodnocení experimentu bylo úkolem snažit se najít a racionálně vysvětlit příčiny sledovaných jevů.

OBSAH

I. TEORETICKÁ ČÁST

Úvod (str. 10)

1. Syntéza PLA i jiných polyesterů (str. 11)

1.1 Polymerizace za otevření kruhu

1.2. Polykondenzace

1.3. Polykondenzace v tavenině

2. Vlastnosti PLA, PLGA a dalších polyesterů (str. 12)

3. Mechanismus degradace PLGA a jiných polyesterů (str. 12)

3.1. Termální degradace

3.2. Degradace radiací

3.4. Biodegradace

3.5. Enzymatická degradace

3.6. Neenzymatická degradace

4. Odhad degradačního chování PLGA polymerů (str. 15)

5. Degradační charakteristiky PLGA (str. 15)

5.1 Morfologie polymeru: a) Vliv počáteční krystalinity

*b) Krystalinita a vliv termálních změn, vliv
molekulové hmotnosti*

5.2. Kompozice (složení) polymeru

5.3. Pomocné a inkorporované látky

5.4. Jiné charakteristiky

6. Možnosti v přípravě mikrosfér (str. 22)

6.1. Příprava mikrosfér pomocí polymerizace monomerů

6.2. Mikrosféry připravované z lineárních polymerů

6.3. Příprava metodou odpaření rozpouštědla a jinými metodami

II. PRAKTICKÁ ČÁST

- 7. Příprava matric** (str. 24)
- 8. Testování matric** (str. 25)
- 9. Stanovení stupně bobtnání a eroze** (str. 25)
- 10. Stanovení čísla kyselosti** (str. 26)
- 11. Výsledky – tabulky a grafy** (str. 28)
- 12. Diskuze** (str. 50)
- 13. Závěry** (str. 53)
- 14. Použitá literatura** (str. 54)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PLGA- kyselina poly (mléčná-ko-glykolová)

LA- kyselina mléčná

GA- kyselina glykolová

SEC- velikostně vylučovací chromatografie

DSC- diferenciální skenovací kalorimetrie

PLA- kyselina polymléčná

PCL- polykapronlakton

PLA₅₀- kyselina polymléčná, poměr kys. D-mléčné ke kys. L-mléčné 50:50

PLA_{37,5}GA₂₅- kyselina polymléčná, poměr kys. mléčné ke kys. glykolové 37,5:25

T_g- teplota skelného přechodu

PDLLGA- poly(D,L-mléčná-ko-glykolová) kyselina

M_w- molekulová hmotnost (hmotnostně střední)

PLLGA- poly (L-mléčná-ko-glykolová) kyselina

G-G- vazba mezi kyselinou glykolovou a glykolovou

G-L- vazba mezi kyselinou glykolovou a mléčnou

PEG- polyethylenglykol

kGy- kiloGray- jednotka radiačního záření

M_n- číselně střední relativní molekulová hmotnost

Úvod

S přibývajícím věkem a zkušenostmi od doby objevu syntetických polymerů, rapidně stoupal zájem o jejich terapeutickou aplikaci. Velká část z těchto polymerů byla považována za potenciální biomateriály, především díky variabilitě v jejich složení, struktuře, vlastnostech a využití. Celá řada polymerů schopných degradace obsahovala a obsahuje ve své struktuře estery, anhydridy, karboxyly, amidy a jiné funkční skupiny. Jako velice slibné alifatické polyestery, především kvůli jejich biokompatibilitě a biodegradabilitě se jeví ty, jež obsahovaly ve své struktuře esterové vazby odvozené od kyseliny mléčné (LA) a kyseliny glykolové (GA) (1). Vysokomolekulární polymery kyseliny mléčné, či kyseliny glykolové nebo jejich kopolymery se dají syntetizovat např. pomocí polymerizace za otevření kruhu (2). Pomocí experimentů, týkajících se degradace PLGA polymerů prováděných *in vivo* a *in vitro*, byla objevena skutečnost, že degradace těchto polymerů je katalyzována prostřednictvím koncových karboxylových funkčních skupin štěpením řetězců prioritně v jejich amorfních oblastech (3). Vzorky v průběhu experimentů mohou být hodnoceny a monitorovány využitím celé řady různých technologií: vážením (pro zjištění příjmu média do vzorku, či ztráty hmotnosti), SEC (změny molekulové hmotnosti), DSC (vliv termálních změn na stav vzorku), difrakce X-záření (změny v krystalinitě).....(4). Pro poznání degradačního mechanismu, vlastností a chování matric PLGA nebo jiných syntetických polymerů a kopolymerů, se jako médium, ve velké části experimentů, nejčastěji využívá voda (teplota 37°C, bez míchání). Tyto parametry se nastavují za účelem co možná nejpřesnější simulace stavu a povahy tělesných tekutin. Využití fosfátových pufrů, vytvářejících isoosmotické prostředí, ve srovnání s prostředím slaným umožňuje zanedbání efektu iontové síly vedoucí k absorpci vody a uvolnění rozpustných degradačních produktů. Slané prostředí bývá nastavováno pro zjištění vlivu původního pH a změny v hodnotě pH.

Polymerní biomateriály (biopolymery) mohou sloužit jako tzv. trvalé pomůcky (např. protézy, katétry, oční čočky), na straně druhé je však lze využít i jako dočasné řešení pro aplikaci v rámci regenerace a obnovy tkání, uzavírání ran, kardiovaskulárních, ortopedických implantátů či ke kontrolovanému uvolňování léčiva v průběhu jeho působení. Tato realizace je možná pomocí membrán

kontrolujících množství uvolněného léčiva nebo prostřednictvím implantovaných biodegradabilních polymerních tělísek s dispergovaným léčivem.

1. SYNTÉZA PLA I JINÝCH POLYESTERŮ

Existují dva možné postupy syntézy k získání poly(mléčné) kyseliny a to polymerizace za otevření kruhu a polykondenzace. Kyselina mléčná, je nejprve čištěna, dochází k odstraňování nečistot, dehydrataci a poté k polymerizaci. Přítomnost chirálního centra nahrává tvorbě celé řady enantiomerů jako např. PLLA, PDLA nebo PDLLA.

1.1 POLYMERIZACE ZA OTEVŘENÍ KRUHU

Využitím tohoto typu syntézy je možné velice dobře kontrolovat chemismus probíhající polymerizace, což napomáhá syntéze výsledných polymerů s požadovanými vlastnostmi. Polymerizace za otevření kruhu může být prováděna v roztoku, v tavenině a suspenzní polymerizací (5). V závislosti na využitém katalyzátoru může reakce běžet iontovým, koordinačním či radikálovým mechanismem (6). Jako katalyzátory se dají využít přechodné i nepřechodné kovy např. cín, zinek, bismut, železo, hliník, hořčík atd.

1.2. POLYKONDENZACE

Polykondenzace PLA probíhá nejčastěji za přítomnosti katalyzátorů a vody jako vedlejšího produktu. Bylo pozorováno, že katalyzátory obsahující sloučeniny dvojmocných kovů, které jsou aktivovány protony kyselin, jsou více efektivní než ty obsahující jednomocné kovy (7). Jednou z možných nevýhod využití přímé polykondenzace jsou ukazující se nestandardní mechanické vlastnosti u polymerů s nízkou molární hmotností, které jsou doprovázené zvýšením viskozity taveniny a vyšší operační teplotou. K překonání těchto těžkostí a k získání produktů s vysokou molární hmotností bylo zapotřebí udržení správné rovnováhy mezi LA a H₂O a PLA např. pomocí organických rozpouštědel nebo větvičích činitelů

(dipentaerythritol, apod.) (8). Při využití těchto metod vyvstal na povrch další problém s odstraňováním zbytků organických rozpouštědel z konečných produktů, proto byl objeven nový proces tzv. polykondenzace v tavenině vedoucí jednak k zisku vysoko molekulárních produktů i ke snížení nákladů na jejich získávání (9).

1.3. POLYKONDENZACE V TAVENINĚ

Polykondenzace v tavenině LA závisí na dvou termodynamických rovnováhách a to rovnováhou mezi hydratací/dehydratací pro tvorbu esterů a rovnováhou mezi kruhem/řetězem pro depolarizaci a tvorbu laktidů (10).

PLA s nízkou molekulární hmotností získané polykondenzací nebo polymerizací za otevření kruhu pak podléhají dalším úpravám: modifikace tání, radiací (zvýšení zesíťování) atd. vedoucích k zisku vysoce molekulárních PLA.

2. VLASTNOSTI PLA, PLGA A DALŠÍCH POLYESTERŮ

Termální, fyzikální a biodegradační vlastnosti výše zmíněných polyesterů jsou v závislosti na distribuci a poměru mezi jednotlivými stereoisomery kyseliny mléčné. Polymery s vysokým podílem L -isomerů vedou ke krystalickým produktům, zatímco vysoký podíl D -isomerů vede k amorfním produktům. Fyzikální vlastnosti vyplývají z molekulárního uspořádání polymerních materiálů a závisí i na rozměru krystalů, krystalinitě, morfologii, velikosti a stupni řetězové orientace. Fyzikální vlastnosti ovlivňují mechanické vlastnosti polymerů i jejich změnu nastávající v průběhu hydrolýzy. Termo-fyzikální vlastnosti pak mohou být sledovány např. použitím DSC atd.

3. DEGRADAČNÍ MECHANISMUS PLGA A JINÝCH POLYESTERŮ

Degradace je označována jako hydrolytický proces, který je zdrojem dramatických morfologických změn příslušných matric polymerů.

Objemová degradace byla z počátku popisována jako reakce, při níž docházelo k homogennímu štěpení řetězců napříč maticí, a byla zodpovědná za degradaci celé škály polymerů např.: PLGA, PLA, či PDLA ... Jedny z prvních informací o průběhu mechanismu objemové degradace byly získány pomocí pozorování *in vitro*. Vyplývalo z nich, že ačkoliv se molekulární hmotnost vzorku snižuje bezprostředně po kontaktu s vodou, ztráta hmotnosti není zahájena dříve, než je dosaženo kritické molekulové hmotnosti matrice (11). S přibývajícím poznatkem a množstvím studií prováděných s různými vzorky (PLA₅₀, PLGA) vzešla na povrch heterogenní povaha degradačního mechanismu, která je spojována s rychlejší degradací uvnitř matic oproti jejich povrchu (12). Mimo jiného k potvrzení této povahy degradace přispělo i využití poznatků o rozpustných oligomerních sloučeninách zabudovaných do matic vzorků ve vodném prostředí. Oligomery, které se nacházely na povrchu matic, mohly být z tohoto místa uvolněny ještě před celkovou degradací, zatímco oligomery lokalizované v jádru jen obtížně difundovaly směrem ven z této matrice. Rozdíl vyplýval z vyšší kyselosti uvnitř vzorku než na jeho povrchu. Pokud došlo k využití fosfátového pufru a tím nastavení pH média na konstantní hodnotu 7,4, neutralizace karboxylových skupin prezentovaných na povrchu matrice zajistila snížení povrchové kyselosti (13). Stejně vlastnosti byly pozorovány i u jiných typů amorfních polymerů, dokonce rychlejší degradace jádra matrice byla popsána i u krystalizujících polyesterů (s vyšším zastoupením kyseliny mléčné ke kyselině glykolové ve složení matic) (4,14).

V průběhu heterogenní degradace ve vodném médiu totiž nejprve dochází k penetraci vody do příslušného vzorku, která je pak následována hydrolytickým rozštěpením esterových vazeb poutajících koncové karboxylové či hydroxylové skupiny. Degradační produkty vznikající uvnitř matrice během tohoto štěpení jsou schopny katalyzovat hydrolýzu dalších esterových vazeb, a proto bývá tato skutečnost označována jako tzv. autokatalytický fenomén. Je realizován přítomností zvýšeného množství kyselých karboxylových koncových skupin, které jsou zodpovědné za rychlejší degradaci v centru matrice než na jejím povrchu (15). Z mnoha prováděných studií rovněž vyplývá, že se stoupající teplotou média stoupá i rychlost degradace.

3.1. TERMÁLNÍ DEGRADACE

Je definována jako počet štěpení řetězců probíhající za určitou časovou periodu (16). Velká část degradačních reakcí PLA, ve kterých byla vysoká koncentrace esterových vazeb v hlavním řetězci, probíhala za přítomnosti termohydrolyzy, depolymerizace, cyklické oligomerizace, intra- a intermolekulární transesterifikace. Nízkomolekulární sloučeniny spojované s polymerem a přítomnost hydroxylových koncových skupin v hlavním řetězci pak hrály důležitou roli ve snižování molekulové hmotnosti při vyšší teplotě (16).

3.2. DEGRADACE RADIACÍ

Radiací indukované reakce se velice často objevují především v amorfních oblastech polymerů a stupeň krystalinity je pak důležitým parametrem rozsahu amorfních oblastí PLLA. Molekulová hmotnost rapidně klesá se zvyšující se radiační dávkou, přičemž se molekulová hmotnost ozářených kopolymerů signifikantně nemění do dávky nad 250 kGy. Za příčinu je považováno náhodné rozložení monomerních jednotek v kopolymeru (17). Při nižších radiačních dávkách dochází k náhodnému štěpení řetězců především v amorfních oblastech a postupně se přesouvá za vyšších dávek radiace na krystalické oblasti.

3.3. BIODEGRADACE

Biodegradace je ovlivňována celou řadou faktorů: stupněm krystalinity, primárním chemickým složením, přítomnými funkčními skupinami, podílem hydrofilních a hydrofobních částí řetězce atd. Za normálních okolností probíhá degradace ve třech krocích. Nejprve dochází k depolymerizaci doprovázené uvolněním kyseliny mléčné, která ve třetím kroku vstupuje do citrátového cyklu, na jehož konci vzniká H_2O a CO_2 . Základním mechanismem degradace homopolymerů a kopolymerů kyseliny mléčné s kyselinou glykolovou jsou tři kroky. V první fázi dochází ke snížení molekulové hmotnosti pouze s malou ztrátou váhy v kontrastu s druhou fází, kde se zpomaluje snižování molekulové hmotnosti, zvyšuje se úbytek váhy a dochází až k tvorbě monomerů. Ve třetí fázi pak dochází k hydrolyze rozpustných

oligomerů až na kyselinu mléčnou vstupující do citrátového cyklu. Hydrolyza je závislá na velikosti, hydrofilitě polymeru, krystalinitě a podmínkách prostředí jako je teplota, pH (18). Kratší degradační čas je obvykle uváděn u nízkomolekulárních, hydrofilních a amorfních polymerů. PLLA podléhá v přítomnosti vodného prostředí enzymatické i neenzymatické hydrolyze vyúsťující ve ztrátu hmoty prostřednictvím vnitřní degradace bez produkce škodlivých vedlejších produktů. U výsledných částic dochází ke snížení molekulové hmotnosti a zvýšení krystalinity.

3.4. ENZYMATICKÁ DEGRADACE

Degradace prostřednictvím enzymů se nejčastěji odehrává na povrchu pevných substrátů pomocí povrchové eroze a úbytku váhy. Enzymy nejsou schopny průniku pevným polymerním substrátem. Přednostně dochází k degradaci amorfních a méně uspořádaných oblastí polymerů. Během enzymatické degradace dochází k degradaci polymerů nacházejících se na povrchu substrátu a vznikající nízkomolekulární produkty jsou pak rozpouštěny v okolním vodném médiu (16).

3.5. NEENZYMATICKÁ DEGRADACE

Jedním z typů neenzymatické degradace je např. degradace pomocí změny pH média. Dochází při ní k difúzi malého množství neenzymatických katalyzátorů do polymerních systémů. Krystalinita, zesíťování a další morfologické vlastnosti systémů ovlivňují difúzi katalyzátorů (19).

4. ODHAD DEGRADAČNÍHO CHOVÁNÍ PLGA POLYMERŮ

Pokud jsou semikrystalické polymery připravovány v amorfním stavu pomocí rychlého chlazení, je jejich degradace doprovázena krystalizací degradačních produktů. V případě, že jsou připravovány v semikrystalickém stavu prostřednictvím popouštění dochází preferenčně k degradaci jejich amorfních oblastí. Amorfní polymery mohou být dále rozčleněny do třech podtříd:

1. = Polymery, u nichž degradace vede k dutým strukturám setrvávajícím v amorfním stavu díky vysoké nepravidelnosti ve struktuře jejich řetězců (PLA_{37,5}GA₂₅).

2. = Polymery, u kterých degradace vede k částečné krystalizaci jejich duté struktury v závislosti na jejím původním složení (PLA₅₀).

3. = Polymery, u nichž degradací nevznikají žádné duté struktury, ale jádro i povrch krystalizují (PLA₈₅GA₂₅, PLA₇₅GA₂₅) (13,20).

5. DEGRADAČNÍ CHARAKTERISTIKY

Výsledek probíhající degradace je v závislosti na celé řadě faktorů, v rámci matrice se jedná např.: o morfologii polymeru, orientaci, konfiguraci, chemické složení jeho řetězců, distribuci chemicky aktivních molekul, krystalinitu (1). Dále může být průběh degradace ovlivněn molekulovou hmotností polymeru, velikostí, či tvarem matric. Toto vše se podílí na kontrole přístupu vody k esterovým vazbám.

Tab. 1: Charakteristiky degradace biodegradabilních polyesterů (21)

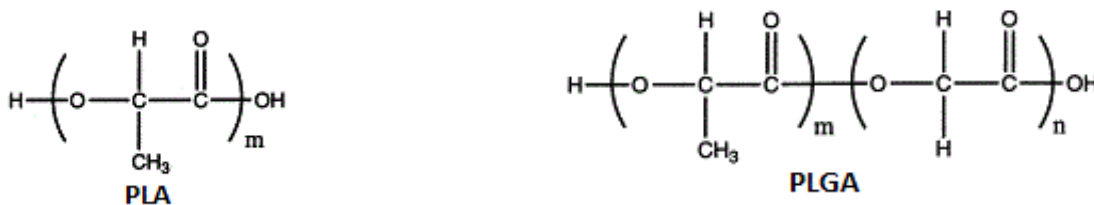
Polymers	Degradation rate constant / hr ⁻¹	Critical Mw to be eliminated /kDa	Initial Mw wt /kDa	Maximum useful lifetime (years)
PCL	9.65×10^{-5}	5	61.8	3
PLGA	1.9×10^{-3}	1.2	24.6	66 days
PLA	7.4×10^{-5}	5	10.8	3.2
PEG	6×10^{-4}	4	10	63 days

5.1. MORFOLOGIE POLYMERU

Morfologie polymerních materiálů zejména co se týče jejich amorfní nebo semikrystalické povahy hraje významnou roli v degradačním procesu. Je známo,

že u semikrystalických polyesterů ve vodném prostředí dochází k degradaci ve dvou fázích. Během první fáze nastává difúze vody do amorfních oblastí následována náhodným štěpením esterových vazeb. Druhá fáze se projevuje až po degradaci většiny amorfních oblastí polymeru, kdy hydrolytický efekt pak postupuje směrem od okraje do středu krystalických oblastí. Později byla celou řadou autorů přijímána teorie o přednostnější degradaci amorfních oblastí u semikrystalických matic (13). Další významnou úlohu v procesu degradace hraje i samotná orientace řetězců v krystalických a amorfních oblastech.

Obr. 1: Chemické vzorce kyseliny poly(mléčné) a poly(mléčné-ko-glykolové) (22)



Semikrystalický

Amorfní

5.2. VLIV POČÁTEČNÍ KRYSTALINITY

Pro možnost vyzkoušení vlivu počáteční krystalinity na degradační rychlost polymeru byl využit např.: PLA₁₀₀ čistě semikrystalický polymer, kde docházelo k porovnávání úbytku hmoty ve smyslu snížení hmotnosti v čase mezi amorfni matricí získanou rychlým chlazením a semikrystalickou matricí zhotovenou pomocí pomalého chlazení (23). Výsledky pozorování přinesly poznatek, že krystalinita snižuje celkové degradační množství PLA₁₀₀.

5.3. KRYSTALINITA A VLIV TERMÁLNÍCH ZMĚN, VLIV MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI

Jako příklad byl využit výše zmíněný amorfni vzorek PLA₁₀₀ získaný rychlým chlazením u kterého se prokazoval vliv počáteční krystalinity. Tato matrice

překvapivě ve frakci nízkomolekulárních vzorků přešla po určité době do mírně krystalického stavu, ačkoliv běžně nekrytalizuje při 37°C, neboť je tato teplota poměrně hluboko pod její teplotou skelného přechodu ($T_g=56^\circ\text{C}$) (23). Park v roce 1994 přišel s důkazem naznačujícím, že různorodost v degradačních profilech polymerů o odlišné molekulové hmotnosti, je spojena s rozdíly v teplotách skelného přechodu a krystalinitě (24). Vyplývá to z jeho experimentu, při kterém prokázal, že matrice tvořené PDLA vykazují odlišné degradační chování. PDLA je kopolymer dvou stereoisomerů D- a L- mléčné kyseliny a díky své amorfní povaze degraduje rychleji než její homopolymery, které mají krystalickou strukturu. Vysvětlení našel ve změně morfologie polymeru v hydratovaném stavu. Za normálních podmínek snížení molekulové hmotnosti polymeru vede ke snížení teploty skelného přechodu. Ta je důležitá pro povahu polymeru, tedy jestli zůstane ve skelném nebo plastickém stavu. T_g je spíše kinetickou charakteristikou související s viskoelasticitou polymerů. Je do značné míry ovlivňována především podmínkami prováděných experimentů, jako jsou např.: rychlost ohřevu, či předchozí termální historie vzorků. Umístěním suchých matric, majících teplotu skelného přechodu nad inkubační teplotou, ve skelném stavu do vodného média, dojde vlivem hydratace ke změně T_g směrem k nižší teplotě. Tento jev je zapříčiněn působením vody jako plastifikátoru (25). V experimentu se nízkomolekulární vzorky, tedy vlivem změny původní hodnoty jejich T_g , dostaly do plastického stavu při inkubační teplotě 37°C a daleko rychleji degradovaly než vysokomolekulární vzorky, které při stejné inkubační teplotě zůstaly ve skelném stavu. Důvodem rychlejší degradace je zvýšení pohyblivosti řetězců polymeru v plastickém stavu. Během experimentu byly zaznamenány dvě různé teploty skelného přechodu, což souvisí s přítomností dvou odlišně degradiujících polymerů a podpořily se tak domněnky a heterogenním průběhu degradace (24).

Celá řada variant PLGA polymerů patří mezi amorfní. Rozsah absorpce vody následovaný hydrolýzou esterových vazeb, je proto u těchto polymerů ve větším rozsahu než u semikrystalických polymerů PLA.

Výše uvedené poznatky jsou velice důležité charakteristiky i pro využití polymerů v terapeutické praxi např.: jejich aplikace v oblasti kontrolovaného uvolňování léčiv z polymerních matric. V několika studiích byl popsán, či zmíněn pulzní charakter uvolňování léčiv z vysokomolekulárních matric PLGA (24, 26). Zmíněn byl i fakt,

že vysokomolekulární polymery vykazují zpočátku pomalé uvolňování léčiva prostřednictvím difúze, následované uvolněním podstatného množství léčiva díky degradaci (27).

5.4. KOMPOZICE (SLOŽENÍ) POLYMERŮ

Jako velice zajímavé a přínosné se jeví pozorování heterogenní degradace probíhající u systémů označovaných za mikrosféry, které mohly být využívány pro injekčně podávané systémy léčiv. Pomocí těchto experimentů bylo zjištěno, že amorfní PDLLGA mikrosféry, mající odlišnou kompozici kopolymerů, degradovaly za průběhu velice komplikovaných morfologických změn (28). Vliv kompozice polymerů byl prezentován i v celé další řadě experimentů a s nimi souvisejících článcích. Byly publikovány i výsledky, které např. srovnávají ztrátu hmoty u matric PLA₁₀₀, PLA₉₆, PLA₅₀. Z výsledků vyplývá a opět byl i potvrzen charakter výrazně rychlejšího degradačního stupně kopolymerů kyseliny mléčné s kyselinou glykolovou oproti jejím homopolymerům (13, 29). Svůj význam na průběh degradace matric uplatňují i různé chemické kompozice jednotek tvořících daný kopolymer. Jako příklad je možné uvést zvyšující se obsah LA během degradace PLA₇₅GA₂₅ a PLA₈₅GA₁₅. U PLA₇₅GA₂₅ byl zaznamenán rychlejší nárůst LA. Rychlejší degradace jednotek tvořených kyselinou glykolovou v porovnání s jednotkami tvořenými kyselinou mléčnou, je připisována větší hydrofilitě této kyseliny (29). Na rozdíl od původně amorfního polymeru PLA₁₀₀, kdy segmenty obsahující molekuly kyseliny mléčné, jak bylo pozorováno, krystalizují *in vitro* pod stanovenými podmínkami degradace. Dochází poté k tvorbě krystalických oblastí s relativně nízkou M_w (30). Krystalizace také omezuje návrat k původní preferenční degradaci jednotek GA, neboť část z nich byla zahrnuta do těchto krystalických oblastí. Vysvětlován je tak mírný rozdíl v krystalické struktuře reziduí kopolymerů (30). V jiné práci byly například připraveny mikrosféry PLLGA 50:50 za účelem demonstrace výrazného krystalizačního efektu oligomeru. Očekáváno bylo, díky absenci molekul _D-mléčné kyseliny, zvýšení krystalizace schopných produktů tvořených především segmenty _L-mléčné kyseliny. Jev je vysvětlován preferenční hydrolýzou esterových vazeb mezi jednotkami kyseliny G-G a G-L (28). Bylo také pozorováno, že u vzorků PLLGA 50:50 s relativně nízkou molekulovou hmotností

nebyly zaznamenány významné píky tání a detekovatelné skelné přechody ve srovnání se vzorky PDLLGA 50:50 o vyšší molekulové hmotnosti. Tyto výsledky odhalily, že krystalické oligomerní struktury degradují na základě uvolnění ve vodě rozpustných krystalických segmentů do vodného média (28).

Závěry o heterogenním degradačním procesu vzorků PDLA a PDLLGA z výše zmiňovaných prací (12, 30) se opírají o akumulaci degradačních produktů majících koncové skupiny tvořené karboxyly, snižující hodnotu pH v tělese. Dochází tak k rychlejší degradaci centrálních částí matrice oproti jejímu povrchu. Povrchová vrstva působí jako semipermeabilní difúzní bariéra pro zachycení krystalických oligomerů a povoluje transport nízkomolekulárních molekul jako je voda. Pomalu degradující povrchová vrstva je tvořena zapletenými řetězci polymerů, které se roztrhávají stále se zvyšujícím vnitřním osmotickým tlakem. Je patrné, že hodnota vnitřního osmotického tlaku má vliv i na desintegraci krystalických oligomerů vyskytujících se ve středu matrice, které poté mohou difundovat do okolí (28).

5.5. VLIV VELIKOSTI POLYMERNÍCH ČÁSTIC

Ve studii M. Dunne a kolektivu (31), během které byly připraveny mikro- a nanočástice PLGA 50:50, byly publikovány následující výsledky. Mikročástice využitě ke studiu degradace byly produkovány ve třech velikostních řadách a byly testovány při 37°C a pH 7,4. Z publikovaných závěrů vyplývá rychlejší degradace mikrosfér oproti nanočásticím. Byly detekovány dvě degradační fáze. Během první z nich nebyl pozorován žádný úbytek hmoty a byla potvrzena závislost na velikosti částic. Ve druhé fázi docházelo ke ztrátě hmoty a byla vyhodnocena jako fáze, která není ovlivněna velikostí použitých částic. Během experimentu byl potvrzen i vzrůstající stupeň degradace s rostoucí inkubační teplotou (31).

5.6. POMOCNÉ A INKORPOROVANÉ LÁTKY

Dalším významným faktorem ovlivňujícím degradační charakteristiky PLGA polymerů je povaha molekul inkorporovaných látek do polymerní matrice. Do průběhu degradace mohou zasahovat jevy jako např. bazická katalýza,

neutralizace koncových karboxylových funkčních skupin atd. Porozumění a respektování jejich vlivu je důležité i pro využití matric v rámci transportních systémů léčiv.

Pokud dojde k začlenění molekul kyselého charakteru, může tento fakt vést k akceleraci degradačního mechanismu. V případě látek bazické povahy může docházet ke dvěma efektům působícím synergicky a to k bazické hydrolýze a neutralizaci koncových karboxylových skupin molekul polymeru vedoucích poté ke snížení vlivu těchto koncových skupin polymeru na autokatalýzu, tím k nižší hydrataci matrice a k poklesu množství difundovaného léčiva (20, 32).

Pro uplatnění PLGA polymerů v rámci regenerace kostních tkání se také mimo jiné zkoušela i inkorporace ve vodě těžce rozpustné anorganické molekuly uhličitanu vápenatého (33). Tento fakt vedl ke zpomalení stupně degradace matrice. Přítomnost velkého množství sloučeniny vytvářela prostředí usnadňující výměny iontů mezi vnějším médiem a vnitřním prostředím směsi vzorků. Docházelo k neutralizaci koncových karboxylových skupin, tím byla potlačována autokatalýza matrice a docházelo k homogenní degradaci směsi.

Vliv na morfologii, stabilitu a kinetiku bobtnání vykazují i polyoly odvozené od rostlinných olejů. Inkorporací polyolů dochází k indukci hydrofobní sítě do matrice (34). Se zvyšujícím se obsahem polyolů dochází k nárůstu viskozity vyúsťující ve vysoce zesíťovaný gel.

Přítomnost plastifikátorů jako např. PEG zvyšuje mobilitu koncových skupin v amorfních oblastech polymerních systémů. Při výběru plastifikátorů jsou požadovány následující vlastnosti: mísitelnost s PLA, netěkavost a malá schopnost migrace, aby nedošlo ke kontaminaci materiálů přicházející do kontaktu s plastifikovanou PLA (28).

5.7. JINÉ CHARAKTERISTIKY

Vliv na množství uvolněného léčiva, společně s ostatními faktory, má podle práce prezentované Lin a kolektivem (35) i teplota, za které probíhá polymerizace. Docházelo totiž k úpravě stavu produkovaných polymerů ve vodném médiu.

Injekčního podání schopné a *in situ* utvářené hydrogely se těší velkému zájmu zejména díky jejich vlastnostem a potenciálnímu využití v biomedicíně. Jejich velkou výhodou je minimálně invazivní způsob podání, nedochází k používání organických rozpouštědel při formulaci gelu a vhodné jsou i pro enkapsulaci léčiv (35). Ve výše zmíněné práci syntetizovali termosenzitivní triblokové kopolymery PLGA-PEG-PLGA využitím hydrofilních PEG polyesterů a hydrofobních PLGA pomocí polymerizace za otevření kruhu při dvou různých teplotách 130°C (neprůhledný gel) a 160°C (transparentní gel). Cílem bylo potvrdit, či vyvrátit možný vliv transparentního a neprůhledného stavu gelu na *in vitro* probíhající degradaci kopolymeru a uvolnění proteinu. Kopolymery měly stejnou molekulovou hmotnost, délku bloků i poměr kyseliny mléčné ke kyselině glykolové. Bylo srovnáváno degradační chování ve smyslu změny molekulové hmotnosti, pH média, viskoelastických vlastností atd. Nic přesvědčivě neukazovalo na to, že by nebyla degradace ovládána spíše chemickou kompozicí než stavem gelu (35). Přesto, díky rozdílné pevnosti gelů a změnám souvisejícím s degradačním časem, byla nalezena odlišnost v kinetice uvolnění proteinu během pozdní fáze. Patrně vlivem odlišného optického stavu docházelo zejména při mírném zvýšení teploty nad 37°C k ovlivnění reologických vlastností využitých vzorků (35).

6. MOŽNOSTI V PŘÍPRAVĚ MIKROSFÉR

6.1. PŘÍPRAVA MIKROSFÉR POMOCÍ POLYMERIZACE MONOMERŮ

Nejvíce mikrosfér sloužících k transportu léčiv se připravuje z lineárních polymerů, příprava z monomerů je dosud relevantní. Polymerizace monomerů je možná pomocí několika metod zahrnujících emulze, suspenze a disperzní techniky (27).

Emulze jsou hojně využívány k tvorbě částic o velikosti v řádech nanometrů. Disperzní techniky pro utváření částic v řádech mikrometrů (0,5-10). Každý z reagentů obsahuje monomer, iniciátor a stabilizátor (nejčastěji organický polymer složený jak z hydrofobních, tak hydrofilních částí). Polymerizace využitím suspenze pro částice o velikosti 50-500 mikrometrů, kde se velice často využívá rozptýlení monomeru ve vodné fázi se stabilizátorem a iniciátor je rozpustný ve fázi monomeru, v níž dochází k polymerizaci (27).

6.2. MIKROSFÉRY PŘIPRAVOVANÉ Z LINEÁRNÍCH POLYMERŮ

Metod pro přípravu mikrosfér z lineárních polymerů existuje celá řada díky široké nabídce polymerů, které jsou dostupné komerčně. Byly prozkoumány syntézy, vlastnosti a degradační mechanismy mnoha těchto polymerů (36). Tento způsob přípravy je zejména využíván u polymerů, které nemohou být vytvořeny pomocí emulzních procesů (např. biokompatibilní PLA a PGA). U nich se hojně využívá aniontová polymerizace. Uplatnění tato metoda nachází i u přírodních polymerů jako je chitin, chitosan a celulóza.

6.3. PŘÍPRAVA METODOU ODPAŘENÍ ROZPUŠTĚDLA A JINÝMI METODAMI

Mezi další možnosti přípravy mikrosfér patří např. metoda odpaření rozpouštědla, či sprejového sušení (37). Při metodě odpaření rozpouštědla se velmi často používá organických rozpouštědel z rozptýlených olejových kapek obsahujících jak polymer, tak léčivo (38). Využívá se často tzv. dvojité emulze, při které je léčivo nejprve rozpuštěno ve vodě, tato vodná fáze je pak rozptýlena v organickém rozpouštědle obsahující degradabilní polymer. Vzniká emulze v/o. Disperzí této první emulze ve stabilizovaném vodném médiu vzniká výsledná emulze o/v, mikrosféry vzniknou, jakmile dojde k odpaření rozpouštědla a polymer poutající enkapsulované léčivo ztvrdne (27).

II. Praktická část (15)

7. PŘÍPRAVA MATRIC

Pomůcky: silikonové hadičky o vnitřním průměru 4 mm a vnějším průměru 6 mm a hadičky o vnitřním průměru 5 mm a vnějším průměru 8 mm, svorky, nůž, silikonová lázeň, nůžky, gumové rukavice, kádinky různých velikostí, injekční stříkačka, skalpel, žiletky, brusný papír, vysoušeč vlasů, pilník.

Přístroje: Analytické digitální váhy, KERN ABS (max. 220 g, d = 0,1 mg)

Digitální váhy, KERN 440 – 53 (max. 6000 g, d = 1 g)

Horkovzdušná sušárna, HSPT.200, Memmert

Vakuová sušárna, Binder

Magnetická míchačka, Ika RT 5

Chemikálie: oligoestery PLGA 50:50 syntetizované na katedře farmaceutické technologie farmaceutické fakulty v Hradci Králové, aceton, methanol, KOH, fenolftalein, silikonový olej, ethanol.

Pro účel rigorózní práce, tedy k záznamu a poznání průběhu bobtnání a eroze PLGA bylo zapotřebí připravit matrice o čtyřech různých hmotnostech 50, 100, 150 a 250 mg. Pro přípravu matric o hmotnostech 50 a 100 mg byly použity silikonové hadičky s nižším průměrem, zatímco pro přípravu tělísek o hmotnosti 150 a 250mg byly využity hadičky o průměru 5x8 mm. Nejdříve jsem vybrané silikonové hadičky propláchla vodou s detergentem a pak destilovanou vodou. Nastříhala jsem je asi na 20 cm dlouhé části a vložila do sušárny při 105°C pro vysušení stopového množství vody z povrchu hadiček. Z polymeru jsem si navážila potřebné množství k přípravě matric navýšené asi o 20 % požadované hmotnosti eliminující ztrátu materiálu během zpracování matric. Na magnetické míchačce se silikonovou lázní jsem pak navážený polymer v kádince zahříváním

převiedla ze sklovitého stavu do stavu plastického. Jakmile polymer začal být tekutý, natahovala jsem ho pomocí injekční stříkačky do silikonové hadičky do doby, než v ní začal tuhnut a další množství už nebylo možné natáhnout. Poté jsem hadičku s polymerem na obou stranách uzavřela svorkami a v rovnovážné poloze jsem jej nechala tuhnut. Po dostatečném ztvrdnutí polymeru jsem pomocí ostrého nože rozřízla silikonovou hadičku a polymer z ní vyndala. Z takto připraveného materiálu jsem pak pomocí žiletky a skalpelu řezala malá tělíška, která jsem na požadovanou hmotnost upravovala pomocí brusného papíru. U části 150 mg tělíšek docházelo k vytváření tělíšek, jak s hladkým, tak zdrsňným povrchem. Zdrsňní povrchu bylo docíleno pomocí vrypů prováděných pilníkem. Práci jsem realizovala v gumových rukavicích pro zamezení kontaktu polymeru s vlhkostí. Tělíška o správné hmotnosti jsem před jejich použitím pro testování uchovávala v scintilačních lahvičkách označených hmotností tělíšek v lednici při 7°C.

Charakteristika testované PLGA:

$M_n = 4600$, $M_w = 7100$, $T_g = 17^\circ\text{C}$

8. TESTOVÁNÍ MATRIC

Tělíška požadované hmotnosti jsem vkládala do prázdných scintilačních lahviček. Každá lahvička pak byla označena hmotností tělíška a počtem dnů, po které bylo ponořeno v médiu. Do tabulky jsem zaznamenávala hmotnost prázdné scintilační lahvičky označenou jako m_x a hmotnost lahvičky s přidaným tělíškem označenou jako $m_x + m_0$. Každá matrice byla poté ve scintilační lahvičce ponořena do 15 ml vody. Takto připravené vzorky jsem pak uchovávala po požadovanou dobu 1 až 14 dní v lednici. K výměně média docházelo každý den. Pro každý den a každou hmotnost tělíška jsem připravila tři až čtyři paralelní vzorky.

9. STANOVENÍ STUPNĚ BOBTNÁNÍ A EROZE

Ve stanovený den jsem vyndala z lednice příslušné vzorky a opatrně z lahvíček vylila dané médium, zbytek jsem pak odsála pomocí kapátka. Kapky vody ulpívající na stěnách scintilační lahvičky jsem vysoušela pomocí vatové tyčinky a krátce pomocí vysoušeče vlasů, tak aby nedošlo k odstranění vody ze zbobtnalé matrice. Takto vysušenou lahvičku jsem na analytických vahách zvažila a hodnotu do tabulky zapsala jako $m_x + m_b$. Poté jsem vzorky vložila do vakuové sušárny, kde docházelo po dobu 7 dní k vysoušení zbytků vody i ze zbobtnalé matrice. Po vysoušení vody jsem scintilační lahvičky s matricemi zvažila a hodnotu zaznamenala jako $m_x + m_s$.

Ze získaných hodnot jsem pak, na základě příslušných vzorců, vypočítala stupeň bobtnání a stupeň eroze.

STUPEŇ BOBTNÁNÍ:

$$B = (m_b - m_s) / m_s * 100$$

B = stupeň bobtnání [%]

m_b = hmotnost zbobtnalé matrice [g]

m_s = hmotnost matrice po vysušení [g]

STUPEŇ EROZE:

$$E = [1 - (m_0 - m_s) / m_0] * 100$$

E = stupeň eroze [%]

m₀ = počáteční hmotnost matrice [g]

m_s = hmotnost matrice po vysušení [g]

10. STANOVENÍ ČÍSLA KYSELOSTI

Příprava odměrného roztoku: Navážila jsem si 5,6 g KOH a rozpustila jej v odměrné baňce na 2000 ml v methanolu. Koncentrace odměrného roztoku odpovídala hodnotě 0,05 mol/l.

Příprava indikátoru: Jako indikátor detekující změnu zabarvení roztoku v průběhu titrace jsem použila fenolftalein. Rozpustila jsem 1,0 g fenolftaleinu v 80 ml 96% ethanolu v odměrné baňce na 100 ml a doplnila destilovanou vodou po značku.

Vysušený vzorek jsem v kádince zalila 5,0 ml acetonu, vložila míchadlo a na magnetické míchačce nechala matrici rozpustit. Po rozpuštění jsem do roztoku přikápla fenolftalein. Poté jsem titrovala odměrným roztokem KOH až do prvního růžového zabarvení roztoku, jehož intenzita byla patrná nejméně po dobu 5 s. Spotřebu odměrného roztoku jsem pak zaznamenala do tabulky jako V_{KOH} .

ČÍSLO KYSELOSTI:

$$X = 1000 / m_s * c * V_{\text{KOH}}$$

X = číslo kyselosti

m_s = hmotnost matrice po vysušení [g]

c = množství KOH v mg na 1 ml odměrného roztoku 2,8

V_{KOH} = spotřeba odměrného roztoku KOH [ml]

Číslo kyselosti charakterizuje množství KOH v mg, které je zapotřebí k neutralizaci 1g vysušeného polyesteru.

11. VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY

1) Chování PLGA matric o hmotnosti 50, 100, 150, 250 mg v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne – tabulky.

Tab. 2: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnostech 50, 100, 150, 250 mg vzorků A, B, C, D v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne. (obr. 2)

Průměr	1	2	3	4	5	6	7
E [%] 50 mg	105,60	104,15	97,30	104,20	107,05	103,55	105,25
E [%] 100 mg	105,08	100,30	97,35	102,05	102,58	101,33	102,33
E [%] 150 mg	102,77	99,99	97,66	100,33	101,54	100,86	101,58
E [%] 250 mg	101,09	100,60	100,09	99,91	100,80	100,26	100,06

Tab. 3: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnostech 50, 100, 150, 250 mg vzorků A, B, C, D v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne. (obr. 3)

Průměr	1	2	3	4	5	6	7
B [%] 50 mg	0,67	4,25	6,66	7,58	8,53	7,04	8,81
B [%] 100 mg	0,00	1,93	4,68	5,38	4,42	5,80	6,06
B [%] 150 mg	0,21	1,94	3,83	4,08	4,35	3,68	4,97
B [%] 250 mg	0,22	1,87	2,76	3,02	3,17	3,84	4,98

Tab. 4: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnostech 50, 100, 150, 250 mg vzorků A, B, C, D v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne. (obr. 4)

Průměr	1	2	3	4	5	6	7
Č. kys. 50mg	53,85	56,47	57,85	54,27	55,19	55,42	53,20
Č. kys. 100 mg	51,45	53,48	54,84	52,96	53,86	52,70	53,22
Č. kys. 150 mg	51,56	52,26	54,09	51,51	53,05	50,92	50,88
Č. kys. 250 mg	49,47	52,88	52,76	53,37	52,17	51,72	52,00

2) Chování PLGA matric o hmotnosti 50 a 150 mg v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne – tabulky.

Tab. 5: Stupeň bobtnání a stupeň eroze PLGA matric o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 8. až 14. dne.

50 mg	50-A-8	50-A-9	50-A-10	50-A-11	50-A-12	50-A-13	50-A-14
m_x	15,5334	15,4437	15,2884	15,5011	15,2935	15,3448	15,3048
m_x+m_0	15,5834	15,4937	15,3384	15,5511	15,3435	15,3948	15,3548
m_x+m_b	15,5891	15,4996	15,3392	15,559	15,3496	15,3985	15,3638
m_x+m_s	15,5865	15,4969	15,3367	15,5541	15,346	15,3941	15,3591
m_0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
m_b	0,0557	0,0559	0,0508	0,0579	0,0561	0,0537	0,059
m_s	0,0531	0,0532	0,0483	0,0530	0,0525	0,0493	0,0543
B[%]	4,90	5,08	5,18	9,25	6,86	8,92	8,66
E[%]	106,20	106,40	96,60	106,00	105,00	98,60	108,60
50 mg	50-B-8	50-B-9	50-B-10	50-B-11	50-B-12	50-B-13	50-B-14
m_x	15,4796	15,4914	15,5599	15,4778	15,4975	15,0084	15,4473
m_x+m_0	15,5296	15,5414	15,6099	15,5278	15,5475	15,0584	15,4973
m_x+m_b	15,5348	15,5458	15,6156	15,5345	15,5541	15,0656	15,5041
m_x+m_s	15,5325	15,5431	15,6129	15,5305	15,5506	15,0617	15,4988
m_0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
m_b	0,0552	0,0544	0,0557	0,0567	0,0566	0,0572	0,0568
m_s	0,0529	0,0517	0,0530	0,0527	0,0531	0,0533	0,0515
B[%]	4,35	5,22	5,09	7,59	6,59	7,32	10,29
E[%]	105,80	103,40	106,00	105,40	106,20	106,60	103,00
50 mg	50-C-8	50-C-9	50-C-10	50-C-11	50-C-12	50-C-13	50-C-14
m_x	15,3922	14,1900	15,3193	15,3772	15,466	15,3161	15,3492
m_x+m_0	15,4422	14,2400	15,3693	15,4272	15,516	15,3661	15,3992
m_x+m_b	15,4471	14,2474	15,3727	15,4368	15,5185	15,3732	15,4055
m_x+m_s	15,4453	14,2438	15,3695	15,4299	15,5152	15,3691	15,4013
m_0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
m_b	0,0549	0,0574	0,0534	0,0596	0,0525	0,0571	0,0563
m_s	0,0531	0,0538	0,0502	0,0527	0,0492	0,0530	0,0521
B[%]	3,39	6,69	6,37	13,09	6,71	7,74	8,06
E[%]	106,20	107,60	100,40	105,40	98,40	106,00	104,20

Tab. 6: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 5)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
50 A	103,80	101,00	102,40	106,60	107,20	105,00	106,80
50 B	103,40	105,60	94,20	101,80	105,80	102,80	104,60
50 C	108,00	105,40	90,80	101,40	107,60	103,40	105,00
Průměr	105,07	104,00	95,80	103,27	106,87	103,73	105,47
Dny	8	9	10	11	12	13	14
50 A	106,20	106,40	96,60	106,00	105,00	98,60	108,60
50 B	105,80	103,40	106,00	105,40	106,20	106,60	103,00
50 C	106,20	107,60	100,40	105,40	98,40	106,00	104,20
Průměr	106,07	105,80	101,00	105,60	103,20	103,73	105,27

Tab. 7: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 6)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
50 A	4,62	1,58	1,76	4,13	3,92	8,19	4,49
50 B	2,51	4,17	1,27	5,50	5,48	6,61	4,21
50 C	-1,30	5,88	11,23	9,47	12,08	7,54	12,19
Průměr	1,95	3,88	4,76	6,37	7,16	7,45	6,96
Dny	8	9	10	11	12	13	14
50 A	4,90	5,08	5,18	9,25	6,86	8,92	8,66
50 B	4,35	5,22	5,09	7,59	6,59	7,32	10,29
50 C	3,39	6,69	6,37	13,09	6,71	7,74	8,06
Průměr	4,21	5,66	5,55	9,98	6,72	7,99	9,00

Tab. 8: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 7)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
A	55,03	57,66	56,88	55,68	50,15	52,17	54,53
B	55,24	57,27	54,69	48,41	56,11	57,74	52,47
C	51,85	54,19	60,44	58,54	57,25	55,24	52,27
Průměr	54,04	56,38	57,34	54,21	54,50	55,05	53,09
Dny	8	9	10	11	12	13	14
A	53,79	62,11	63,77	54,94	42,67	52,25	55,69
B	61,40	63,91	59,17	58,44	52,73	57,79	54,37
C	56,95	52,04	61,35	63,76	64,88	60,23	64,49
Průměr	57,38	59,35	61,43	59,05	53,43	56,75	58,18

Tab. 9: Průměr hodnot čísla kyselosti a výsledků bobtnání PLGA matric o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 8)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
Č. kys.	52,55	52,27	54,25	50,85	53,00	50,99	50,93
B [%]	0,54	2,16	3,78	4,11	4,21	3,68	4,27
Dny	8	9	10	11	12	13	14
Č. kys.	54,19	53,25	57,11	56,27	53,25	56,63	57,48
B [%]	2,93	4,60	5,25	7,87	5,11	6,24	7,74

Tab. 10: Stupeň bobtnání a stupeň eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 8. až 14. dne.

150 mg	150-A-8	150-A-9	150-A-10	150-A-11	150-A-12	150-A-13	150-A-14
m_x	13,6663	13,7747	13,8717	13,4883	14,0602	15,2826	15,5175
m_x+m_0	13,8163	13,9247	14,0217	13,6383	14,2102	15,4326	15,6675
m_x+m_b	13,8163	13,9302	14,0284	13,6521	14,2231	15,4432	15,6841
m_x+m_s	13,8144	13,9229	14,0204	13,64	14,215	15,435	15,6714
m_0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
m_b	0,1500	0,1555	0,1567	0,1638	0,1629	0,1606	0,1666
m_s	0,1481	0,1482	0,1487	0,1517	0,1548	0,1524	0,1539
B[%]	1,28	4,93	5,38	7,98	5,23	5,38	8,25
E[%]	98,73	98,8	99,13	101,13	103,2	101,6	102,6

150 mg	150-B-8	150-B-9	150-B-10	150-B-11	150-B-12	150-B-13	150-B-14
m_x	14,6667	14,415	15,4601	13,3798	15,3915	15,4896	15,3375
m_x+m_0	14,8167	14,565	15,6101	13,5298	15,5415	15,6396	15,4875
m_x+m_b	14,8216	14,577	15,6236	13,548	15,554	15,6516	15,5051
m_x+m_s	14,8185	14,5682	15,6137	13,5325	15,5459	15,6415	15,4921
m_0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
m_b	0,1549	0,1620	0,1635	0,1682	0,1625	0,1620	0,1676
m_s	0,1518	0,1532	0,1536	0,1527	0,1544	0,1519	0,1546
B[%]	2,04	5,74	6,45	10,15	5,25	6,65	8,41
E[%]	101,20	102,13	102,40	101,80	102,93	101,26	103,06
150 mg	150-C-8	150-C-9	150-C-10	150-C-11	150-C-12	150-C-13	150-C-14
m_x	14,9197	13,4454	13,5996	13,6967	14,6495	15,4007	15,2847
m_x+m_0	15,0697	13,5954	13,7496	13,8467	14,7995	15,5507	15,4347
m_x+m_b	15,0777	13,603	13,759	13,8586	14,8094	15,5635	15,4501
m_x+m_s	15,0695	13,5982	13,753	13,8502	14,802	15,5533	15,4399
m_0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
m_b	0,1580	0,1576	0,1594	0,1619	0,1599	0,1628	0,1654
m_s	0,1498	0,1528	0,1534	0,1535	0,1525	0,1526	0,1552
B[%]	5,47	3,14	3,91	5,47	4,85	6,68	6,57
E[%]	99,86	101,86	102,26	102,33	101,66	101,73	103,46

Tab. 11: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 9)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
150 A	102,10	106,33	102,67	103,33	101,93	102,67	102,87
150 B	101,73	103,67	103,13	102,73	103,13	96,27	97,67
150 C	99,53	99,27	97,73	98,80	100,67	99,93	100,80
Průměr	101,12	103,09	101,18	101,62	101,91	99,62	100,45
Dny	8	9	10	11	12	13	14
150 A	98,73	98,80	99,13	101,13	103,20	101,60	102,60
150 B	101,20	102,13	102,40	101,80	102,93	101,26	103,06
150 C	99,86	101,86	102,26	102,33	101,66	101,73	103,46
Průměr	99,93	100,93	101,26	101,75	102,60	101,53	103,04

Tab. 12: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 10)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
150 A	1,24	2,26	1,69	5,48	3,92	4,48	4,08
150 B	1,44	2,89	4,20	2,66	4,33	4,09	3,75
150 C	-1,07	1,34	5,46	4,18	4,37	2,47	4,96
Průměr	0,54	2,16	3,78	4,11	4,21	3,68	4,27
Dny	8	9	10	11	12	13	14
150 A	1,28	4,93	5,38	7,98	5,23	5,38	8,25
150 B	2,04	5,74	6,45	10,15	5,25	6,65	8,41
150 C	5,47	3,14	3,91	5,47	4,85	6,68	6,57
Průměr	2,93	4,60	5,25	7,87	5,11	6,24	7,74

Tab. 13: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 11)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
A	52,67	52,66	54,18	49,14	54,94	50,18	50,08
B	53,21	51,50	53,94	50,51	52,13	51,97	51,60
C	51,76	52,65	54,62	52,90	51,92	50,81	51,11
Průměr	52,55	52,27	54,25	50,85	53,00	50,99	50,93
Dny	8	9	10	11	12	13	14
A	55,21	52,15	54,23	59,06	52,45	56,22	57,13
B	50,54	54,46	58,70	55,01	52,95	57,14	57,59
C	56,82	53,14	58,41	54,72	54,35	56,51	57,73
Průměr	54,19	53,25	57,11	56,27	53,25	56,63	57,48

Tab. 14: Průměr hodnot čísla kyselosti a výsledků bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 12)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
Č. kys.	52,55	52,27	54,25	50,85	53,00	50,99	50,93
B [%]	0,54	2,16	3,78	4,11	4,21	3,68	4,27
Dny	8	9	10	11	12	13	14
Č. kys.	54,19	53,25	57,11	56,27	53,25	56,63	57,48
B [%]	2,93	4,60	5,25	7,87	5,11	6,24	7,74

Tab. 15: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnostech 50 a 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 13)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
E [%] 50 mg	105,07	104,00	95,80	103,27	106,87	103,73	105,47
E [%] 150 mg	101,12	103,09	101,18	101,62	101,91	99,62	100,45
Dny	8	9	10	11	12	13	14
E [%] 50 mg	106,07	105,80	101,00	105,60	103,20	103,73	105,27
E [%] 150 mg	99,93	100,93	101,26	101,75	102,60	101,53	103,04

Tab. 16: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnostech 50 a 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 14)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
B [%] 50 mg	1,95	3,88	4,76	6,37	7,16	7,45	6,96
B [%] 150 mg	0,54	2,16	3,78	4,11	4,21	3,68	4,27
Dny	8	9	10	11	12	13	14
B [%] 50 mg	4,21	5,66	5,55	9,98	6,72	7,99	9,00
B [%] 150 mg	2,93	4,60	5,25	7,87	5,11	6,24	7,74

Tab. 17: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 50 a 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 15)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
Č. kys. 50 mg	54,04	56,38	57,34	54,21	54,50	55,05	53,09
Č. kys. 150 mg	52,55	52,27	54,25	50,85	53,00	50,99	50,93
Dny	8	9	10	11	12	13	14
Č. kys. 50 mg	57,38	59,35	61,43	59,05	53,43	56,75	58,18
Č. kys. 150 mg	54,19	53,25	57,11	56,27	53,25	56,63	57,48

3) Chování PLGA matric o hmotnosti 150 mg s hladkým a zdrsňným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne – tabulky.

Tab. 18: Stupeň bobtnání a stupeň eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne.

150 mg	150-A-1	150-A-3	150-A-5	150-A-7	150-A-9	150-A-11	150-A-13
m_x	13,5866	13,7872	15,4235	13,7043	13,5401	13,6189	13,3151
m_x+m_0	13,7366	13,9372	15,5735	13,8543	13,6901	13,7689	13,4651
m_x+m_b	13,7405	13,9453	15,5853	13,8671	13,6995	13,7830	13,4871
m_x+m_s	13,7387	13,9396	15,5773	13,8586	13,6881	13,7674	13,4686
m_0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
m_b	0,1539	0,1581	0,1618	0,1628	0,1594	0,1641	0,1720
m_s	0,1521	0,1524	0,1538	0,1543	0,1480	0,1485	0,1535
B[%]	1,18	3,74	5,20	5,51	7,70	10,51	12,05
E[%]	101,40	101,60	102,53	102,87	98,66	99,00	102,33
150 mg	150-B-1	150-B-3	150-B-5	150-B-7	150-B-9	150-B-11	150-B-13
m_x	15,3574	13,5823	15,5413	13,9046	14,2694	13,6030	15,4000
m_x+m_0	15,5074	13,7323	15,6913	14,0546	14,4194	13,7530	15,5500
m_x+m_b	15,5124	13,7388	15,6986	14,0680	14,4273	13,7675	15,5691
m_x+m_s	15,5095	13,7343	15,6900	14,0574	14,4182	13,7533	15,5518
m_0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
m_b	0,1550	0,1565	0,1573	0,1634	0,1579	0,1645	0,1691
m_s	0,1521	0,1520	0,1487	0,1528	0,1488	0,1503	0,1518
B[%]	1,91	2,96	5,78	6,94	6,12	9,45	11,40
E[%]	101,40	101,33	99,13	101,86	99,20	100,20	101,20
150 mg	150-C-1	150-C-3	150-C-5	150-C-7	150-C-9	150-C-11	150-C-13
m_x	14,7327	13,7200	13,6950	13,5163	13,7573	13,5780	13,7559
m_x+m_0	14,8827	13,8700	13,8450	13,6663	13,9073	13,7280	13,9059
m_x+m_b	14,8838	13,8798	13,8537	13,6793	13,9235	13,7498	13,9276
m_x+m_s	14,8807	13,8726	13,8461	13,6643	13,9081	13,7308	13,9067
m_0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
m_b	0,1511	0,1598	0,1587	0,1630	0,1662	0,1718	0,1717
m_s	0,1480	0,1526	0,1511	0,1480	0,1508	0,1528	0,1508
B[%]	2,09	4,72	5,03	10,14	10,21	12,43	13,86
E[%]	98,66	101,73	100,73	98,66	100,53	101,86	100,53

150 mg	150-D-1	150-D-3	150-D-5	150-D-7	150-D-9	150-D-11	150-D-13
m_x	13,4831	13,7033	13,7811	15,3148	13,8248	13,5925	13,7047
m_x+m_0	13,6331	13,8533	13,9311	15,4648	13,9748	13,7425	13,8547
m_x+m_b	13,6355	13,8622	13,9441	15,4843	13,9958	13,7544	13,8779
m_x+m_s	13,6327	13,8557	13,9360	15,4690	13,9790	13,7374	13,8592
m_0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
m_b	0,1524	0,1589	0,1630	0,1695	0,1710	0,1619	0,1732
m_s	0,1496	0,1524	0,1549	0,1542	0,1542	0,1449	0,1545
B[%]	1,87	4,27	5,23	9,92	10,89	11,73	12,10
E[%]	99,73	101,60	103,26	102,80	102,80	96,60	103,00

Tab. 19: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. (obr. 16)

Dny	1	3	5	7	9	11	13
150 A	101,40	101,60	102,53	102,87	98,66	99,00	102,33
150 B	101,40	101,33	99,13	101,86	99,20	100,20	101,20
150 C	98,66	101,73	100,73	98,66	100,53	101,86	100,53
150 D	99,73	101,60	103,26	102,80	102,80	96,60	103,00
Průměr	100,30	101,57	101,41	101,55	100,30	99,42	101,77

Tab. 20: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. (obr. 17)

Dny	1	3	5	7	9	11	13
150 A	1,18	3,74	5,20	5,51	7,70	10,51	12,05
150 B	1,91	2,96	5,78	6,94	6,12	9,45	11,40
150 C	2,09	4,72	5,03	10,14	10,21	12,43	13,86
150 D	1,87	4,27	5,23	9,92	10,89	11,73	12,10
Průměr	1,76	3,92	5,31	8,13	8,73	11,03	12,35

Tab. 21: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. (obr. 18)

150 mg		Dny						
Veličina	Vzorek	1	3	5	7	9	11	13
ms [mg]	A	152,10	152,40	153,80	154,30	148,00	148,50	153,50
ms [mg]	B	152,10	152,00	148,70	152,80	148,80	150,30	151,80
ms [mg]	C	148,00	152,60	151,10	148,00	150,80	152,80	150,80
ms [mg]	D	149,60	152,40	154,90	154,20	154,20	144,90	154,50
V KOH [ml]	A	3,10	3,04	3,00	3,12	3,02	3,16	3,62
V KOH [ml]	B	3,22	3,10	3,12	3,04	3,00	3,18	3,44
V KOH [ml]	C	3,06	3,00	3,04	3,06	3,20	3,20	3,48
V KOH [ml]	D	3,00	3,00	3,10	3,10	3,16	3,00	3,38
č. kys.	A	57,07	55,85	54,62	56,62	57,14	59,58	66,03
č. kys.	B	59,28	57,11	58,75	55,71	56,45	59,24	63,45
č. kys.	C	57,89	55,05	56,33	57,89	59,42	58,64	64,62
č. kys.	D	56,15	55,12	56,04	56,29	57,38	57,97	61,26
KOH[mg/ml]		2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
Průměr A, B		58,17	56,48	56,68	56,16	56,79	59,41	64,74
Průměr C, D		57,02	55,08	56,18	57,09	58,40	58,30	62,94

Tab. 22: Průměr hodnot čísla kyselosti a výsledků bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. (obr. 19)

Dny	1	3	5	7	9	11	13
Č. kyselosti	57,60	55,78	56,43	56,63	57,60	58,86	63,84
B [%]	1,76	3,92	5,31	8,13	8,73	11,03	12,35

Tab. 23: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C s hladkým povrchem a vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 20)

Dny	1	2	3	4	5	6	7
E [%] 150 mg A, B, C	101,12	103,09	101,18	101,62	101,91	99,62	100,45
Dny	8	9	10	11	12	13	14
E [%] 150 mg A, B, C	99,93	100,93	101,26	101,75	102,60	101,53	103,04
Dny	1	3	5	7	9	11	13
E [%] 150 mg A, B, C, D	100,30	101,57	101,41	101,55	100,30	99,42	101,77

Tab. 24: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C s hladkým povrchem a vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 21)

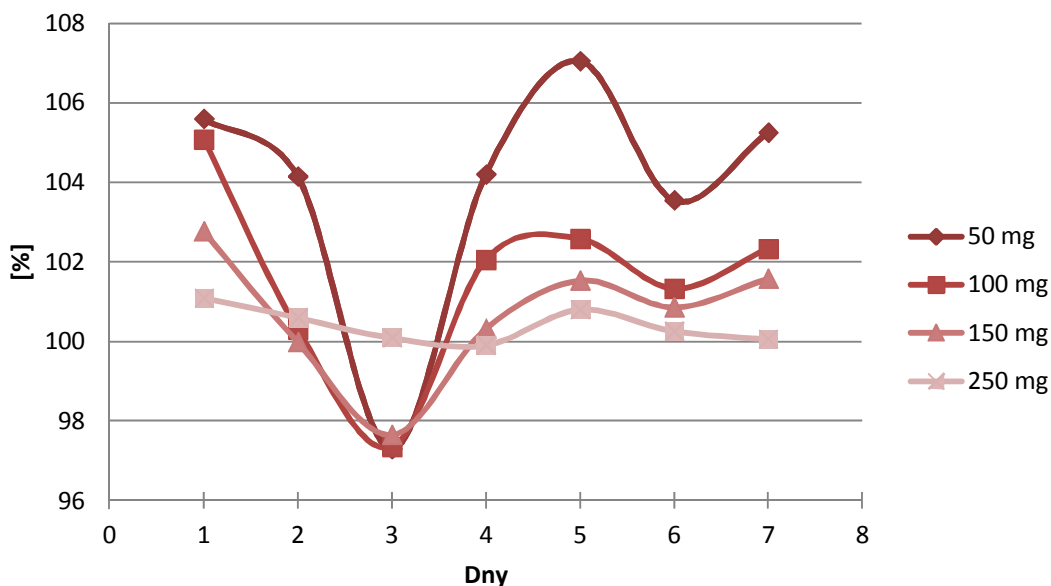
Dny	1	2	3	4	5	6	7
B [%] 150 mg A, B, C	0,54	2,16	3,78	4,11	4,21	3,68	4,27
Dny	8	9	10	11	12	13	14
B [%] 150 mg A, B, C	2,93	4,60	5,25	7,87	5,11	6,24	7,74
Dny	1	3	5	7	9	11	13
B [%] 150 mg A, B, C, D	1,76	3,92	5,31	8,13	8,73	11,03	12,35

Tab. 25: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C s hladkým povrchem a vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (obr. 22)

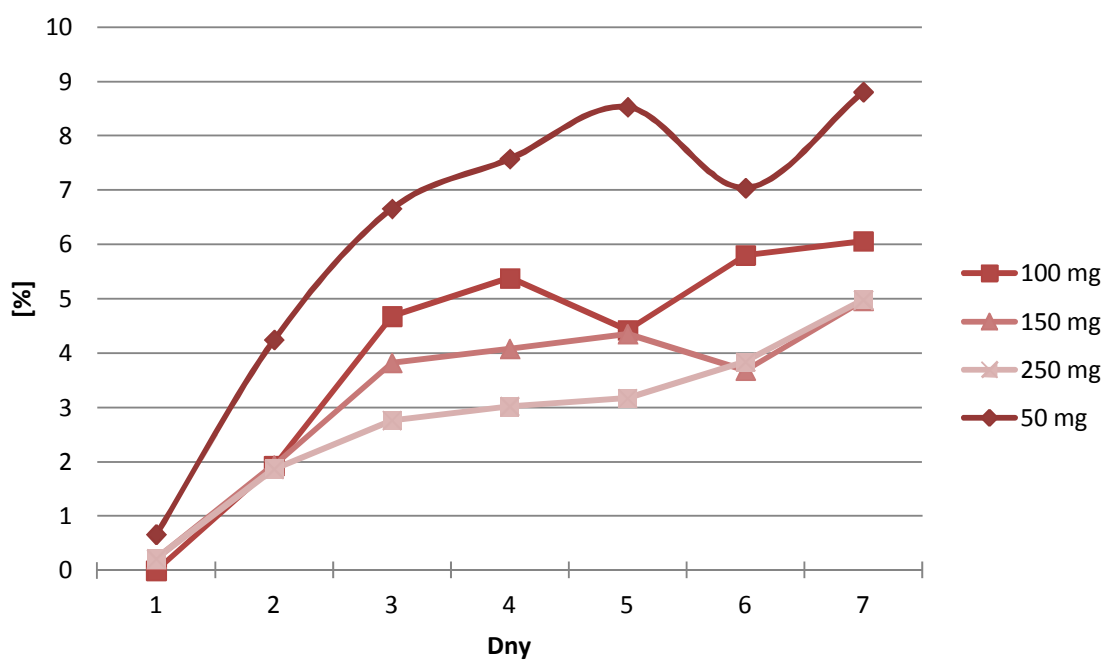
Dny	1	2	3	4	5	6	7
Č. kys. 150 mg A, B, C	52,55	52,27	54,25	50,85	53,00	50,99	50,93
Dny	8	9	10	11	12	13	14
Č. kys. 150 mg A, B, C	54,19	53,25	57,11	56,27	53,25	56,63	57,48
Dny	1	3	5	7	9	11	13
Č. kys. 150 mg A, B, C, D	57,60	55,78	56,43	56,63	57,60	58,86	63,84

1) Chování PLGA matric o hmotnosti 50, 100, 150, 250 mg v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne – obrázky.

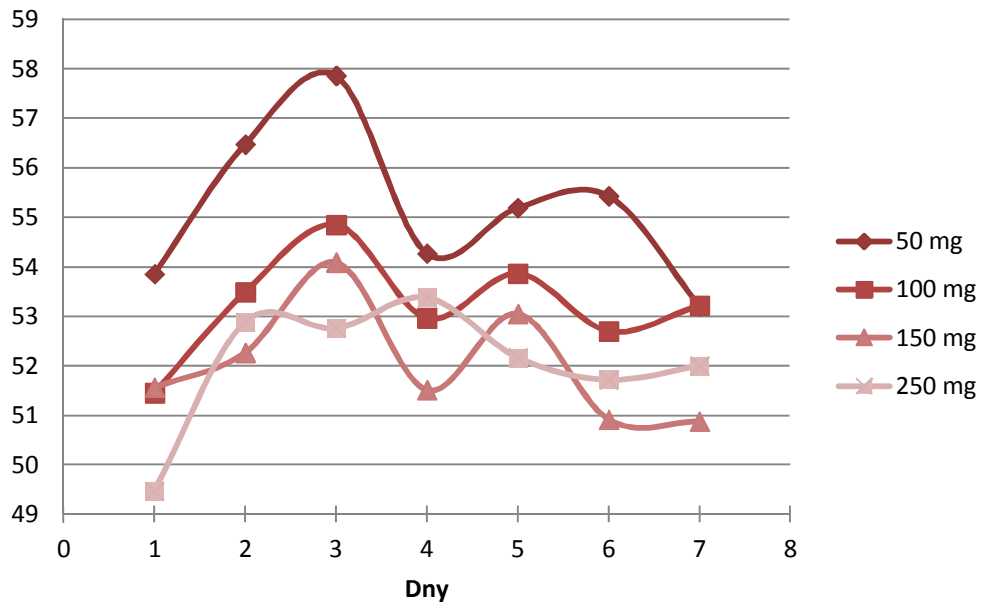
Obr. 2: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnostech 50, 100, 150, 250 mg vzorků A, B, C, D v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne. (tab. 2)



Obr. 3: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnostech 50, 100, 150, 250 mg vzorků A, B, C, D v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne. (tab. 3)

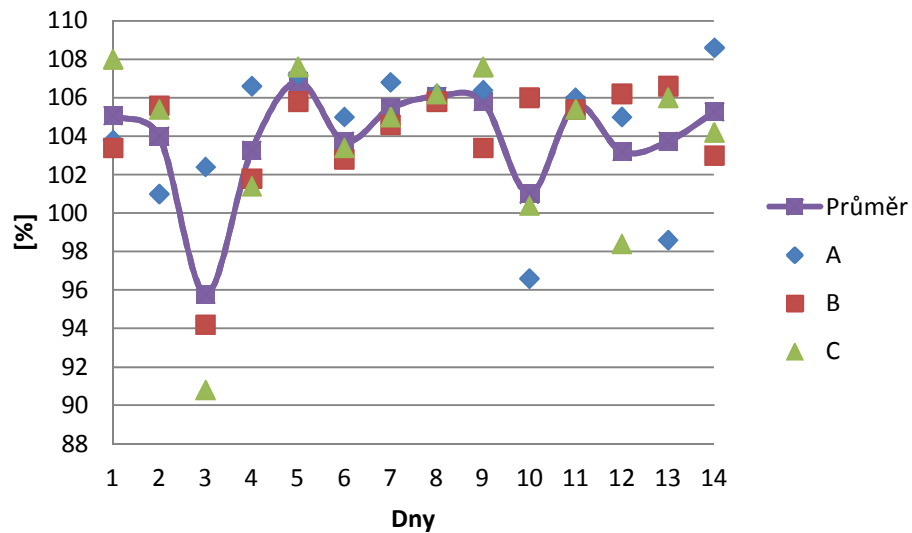


Obr. 4: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matic o hmotnostech 50, 100, 150, 250 mg vzorků A, B, C, D v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 7. dne. (tab. 4)

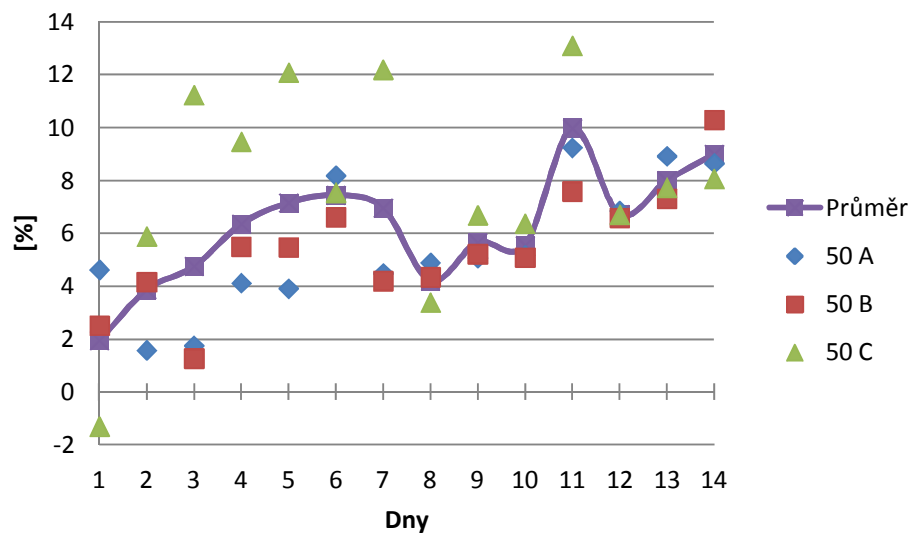


2) Chování PLGA matric o hmotnosti 50 a150 mg v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne – obrázky.

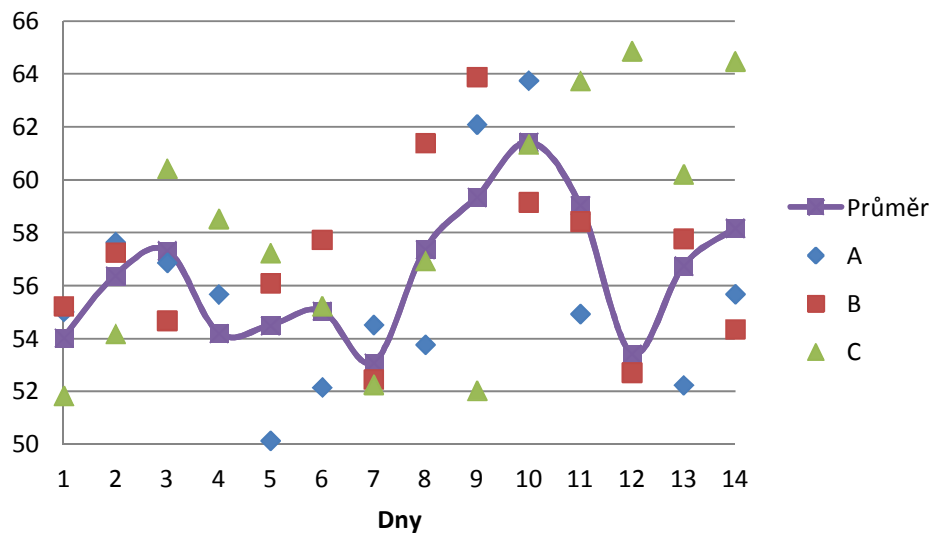
Obr. 5: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 6)



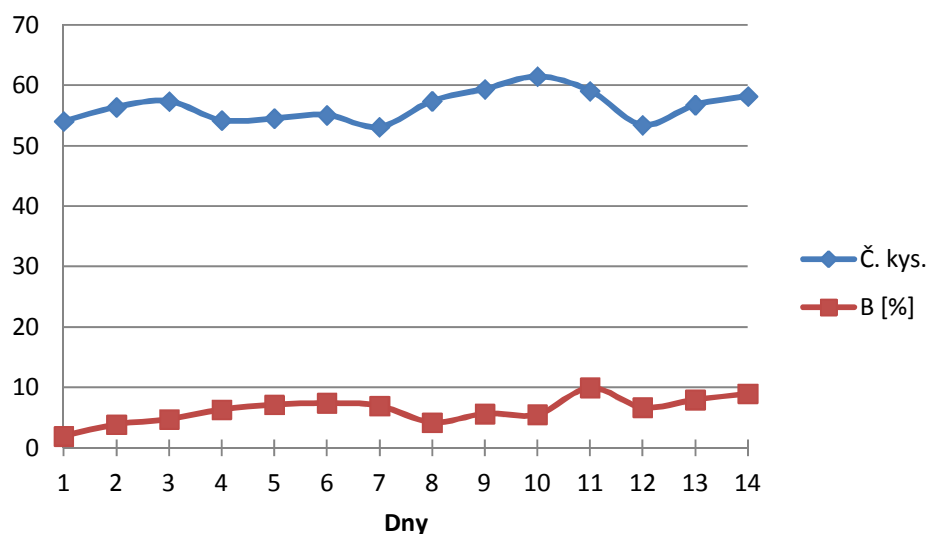
Obr. 6: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 7)



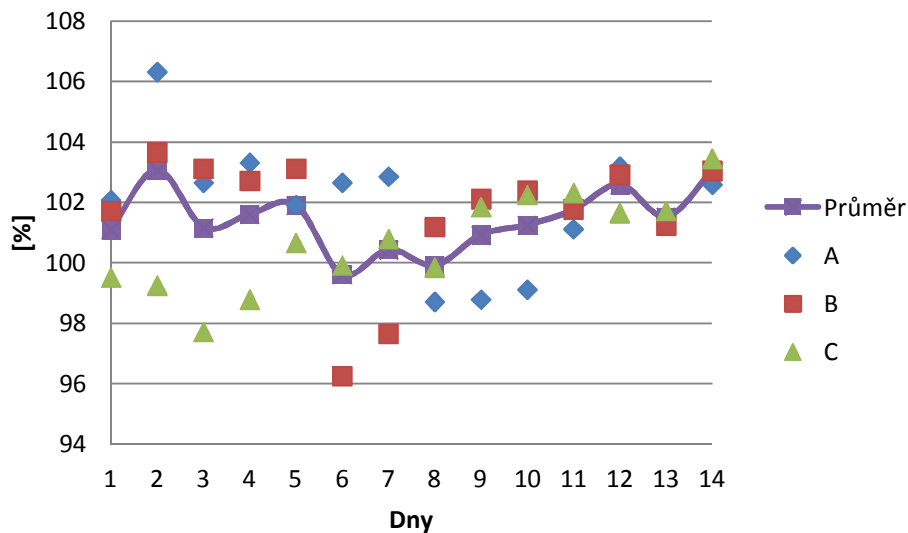
Obr. 7: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matic o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 8)



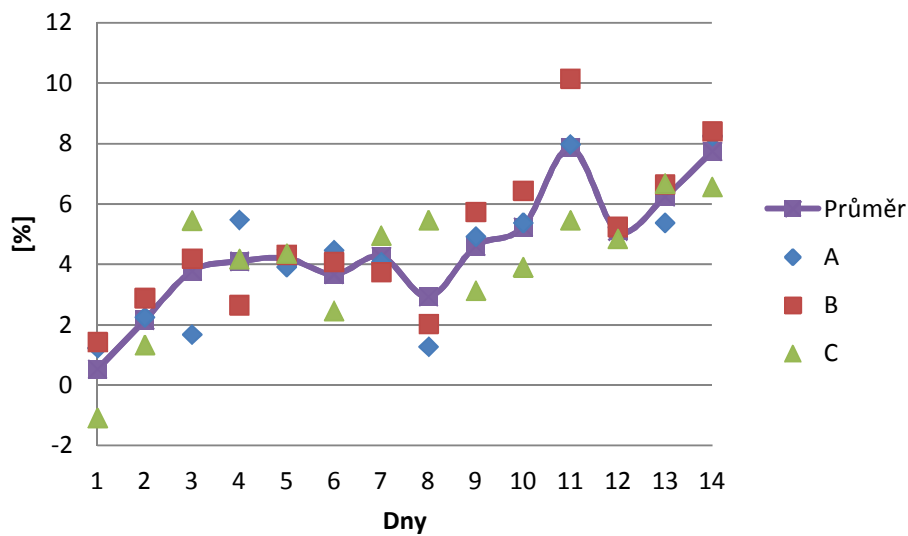
Obr. 8: Průměr hodnot čísla kyselosti a výsledků bobtnání PLGA matic o hmotnosti 50 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. Relativní hodnoty jsou porovnány s důrazem na časový průběh. (tab. 9)



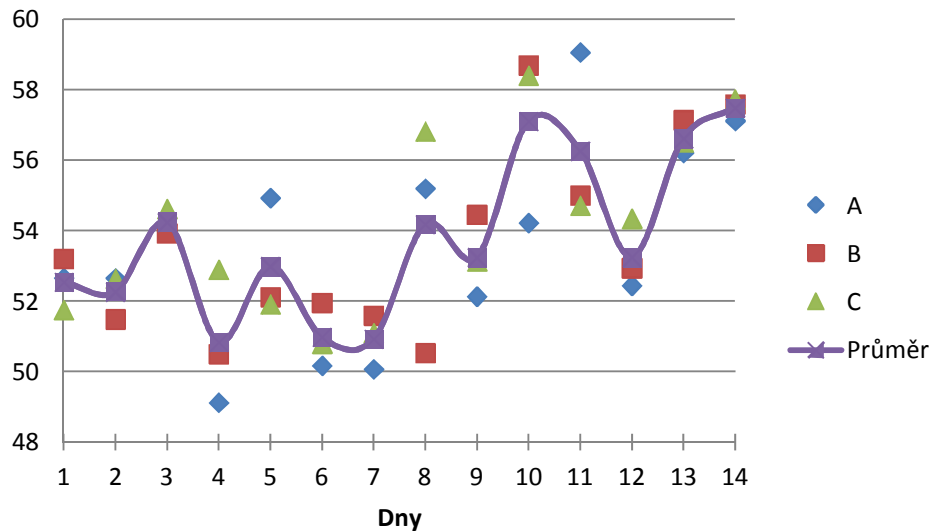
Obr. 9: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 11)



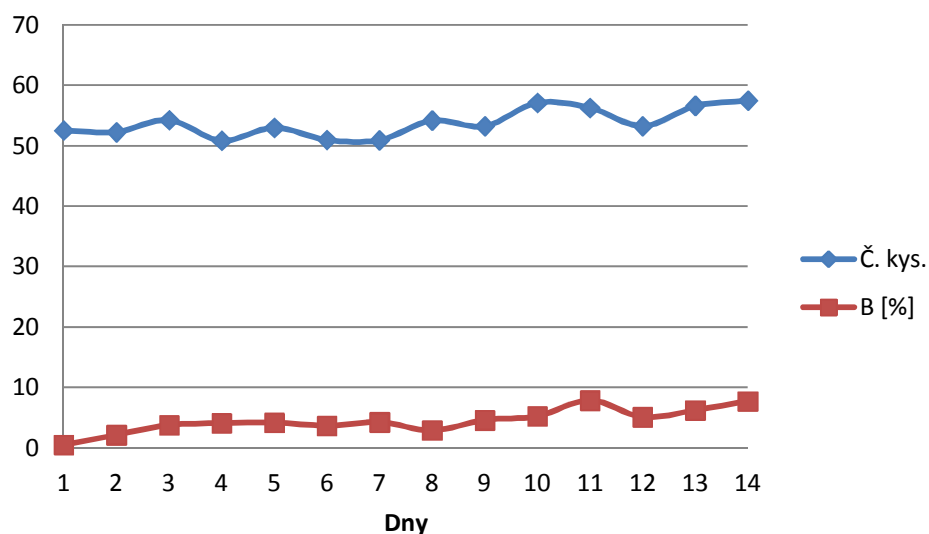
Obr. 10: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 12)



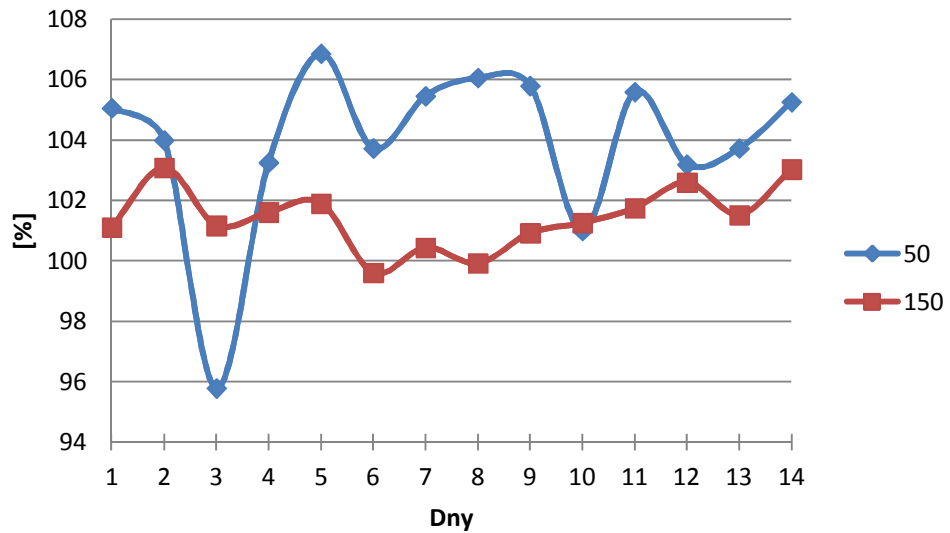
Obr. 11: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matic o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 13)



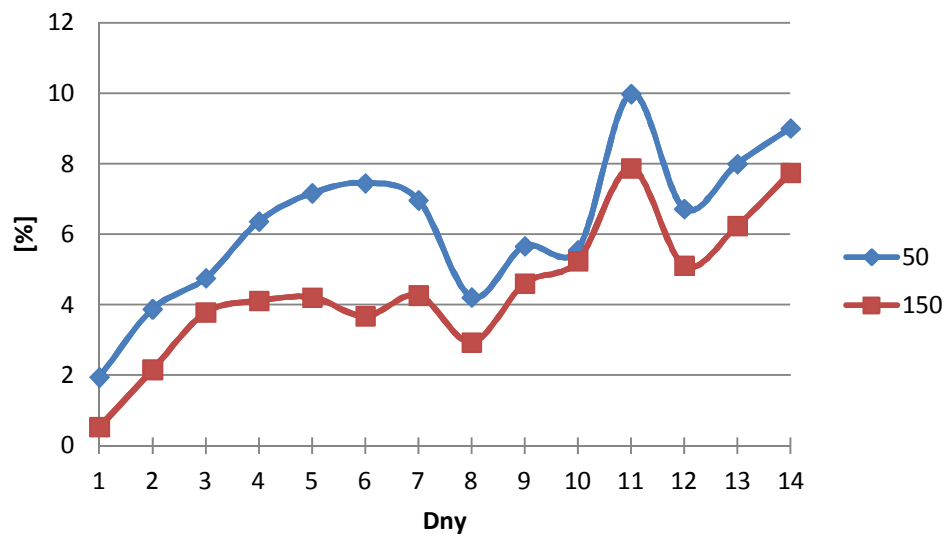
Obr. 12: Průměr hodnot čísla kyselosti a výsledků bobtnání PLGA matic o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. Relativní hodnoty jsou porovnány s důrazem na časový průběh. (tab. 14)



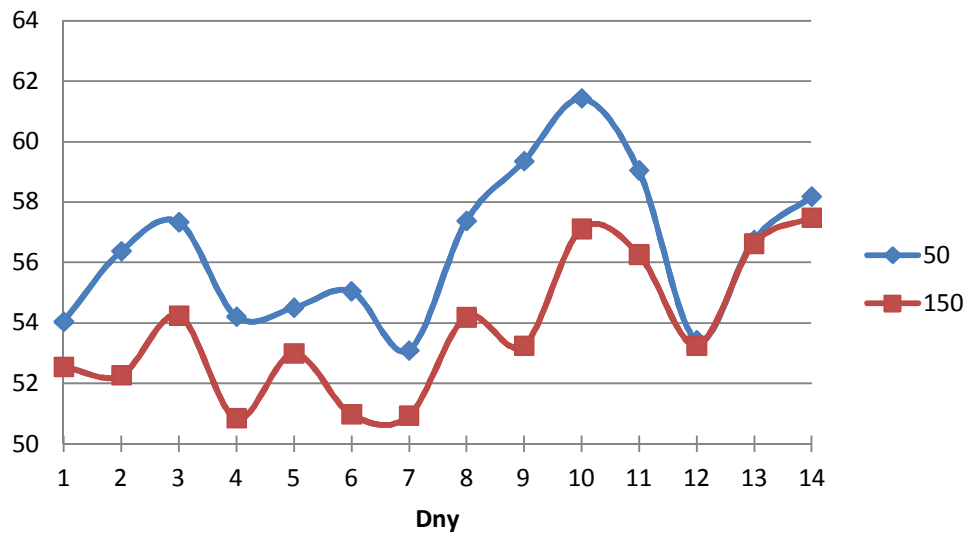
Obr. 13: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnostech 50 a 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 15)



Obr. 14: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnostech 50 a 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 16)

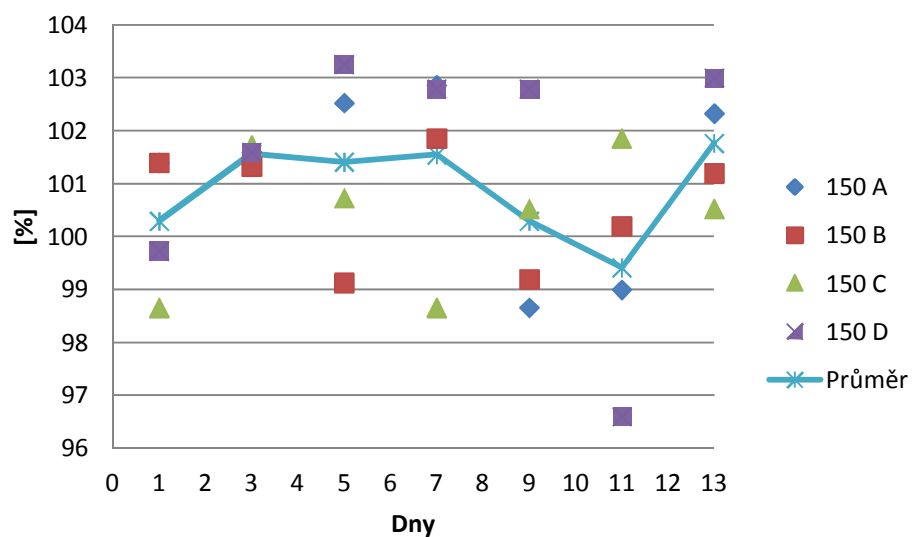


Obr. 15: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 50 a 150 mg vzorků A, B, C v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 17)

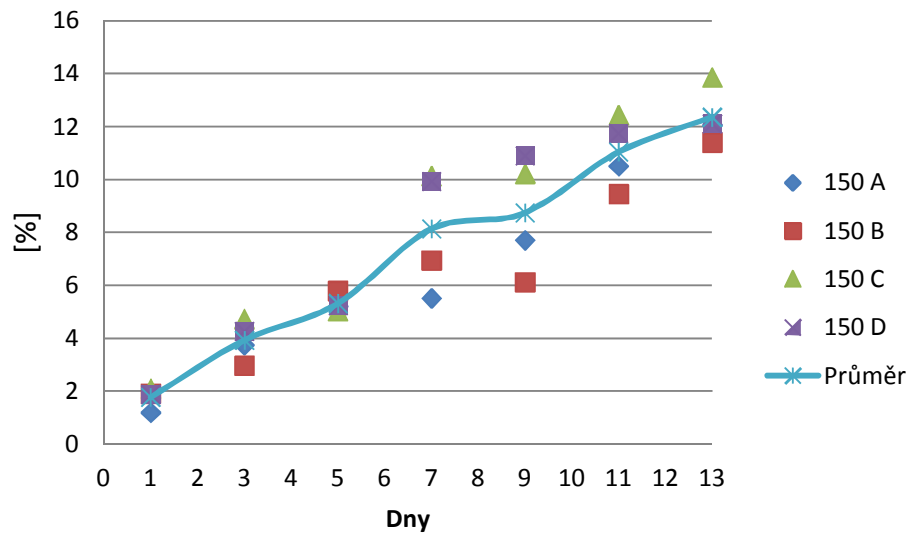


3) Chování PLGA matric o hmotnosti 150 mg s hladkým a zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne – obrázky.

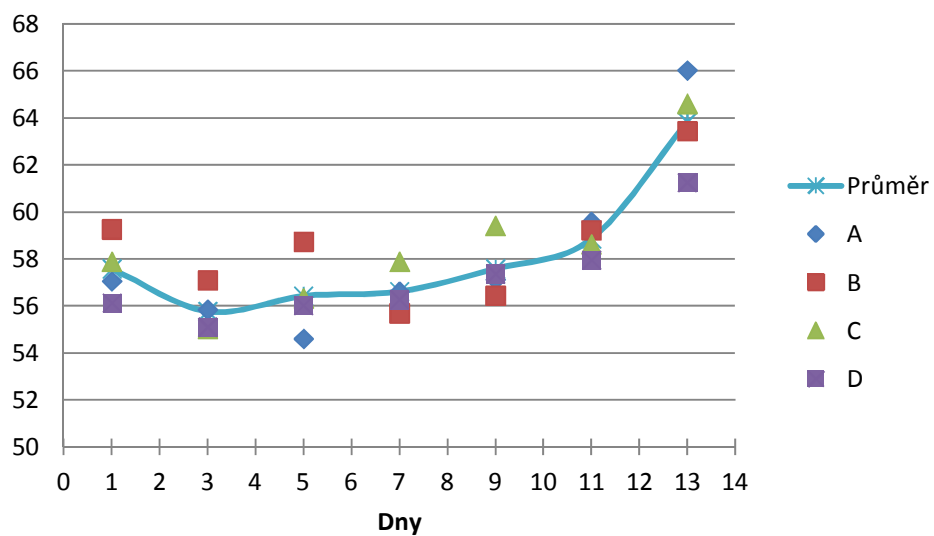
Obr. 16: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. (tab. 19)



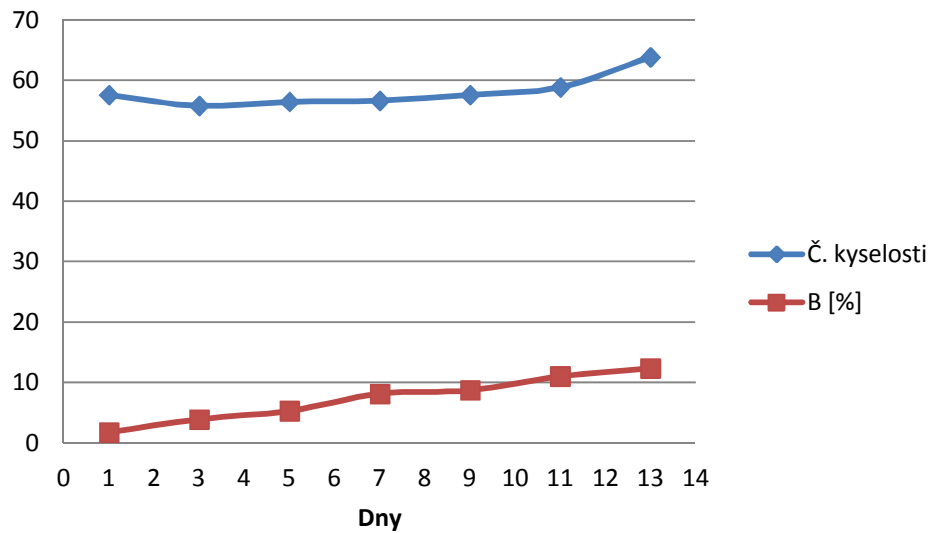
Obr. 17: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. (tab. 20)



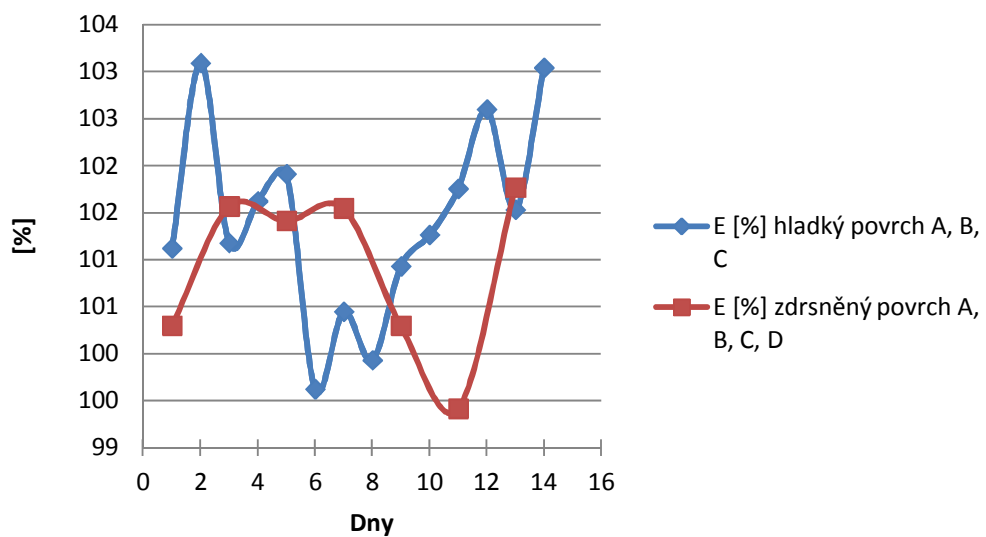
Obr. 18: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. (tab. 21)



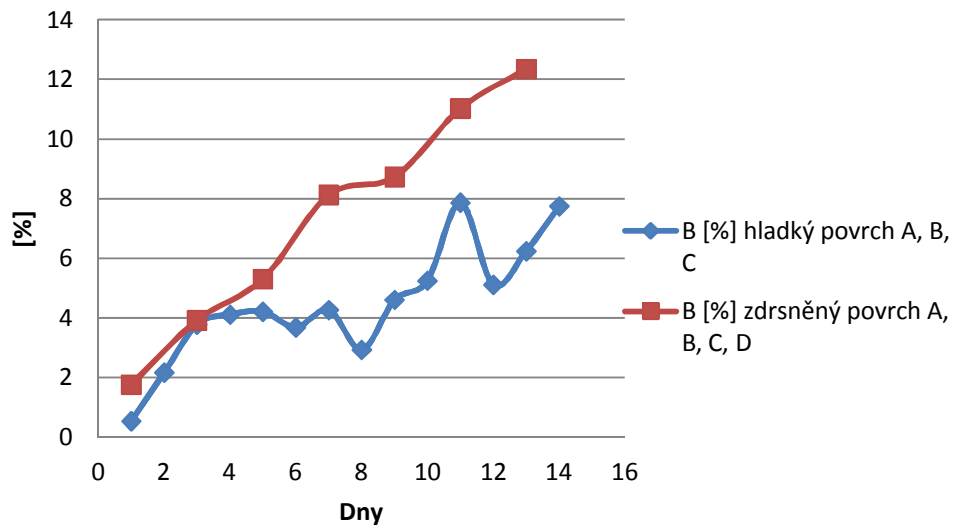
Obr. 19: Průměr hodnot čísla kyselosti a výsledků bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C, D zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 13. dne. Relativní hodnoty jsou porovnány s důrazem na časový průběh. (tab. 22)



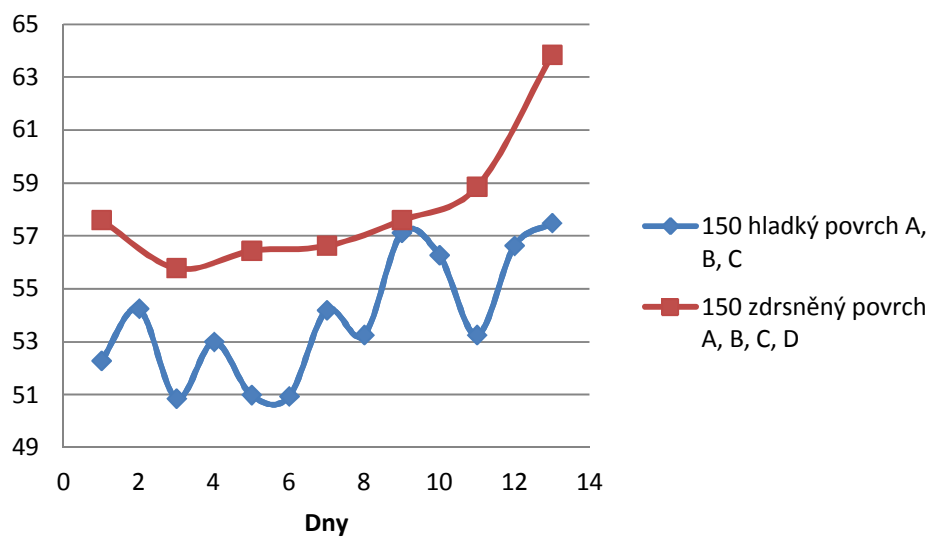
Obr. 20: Průměrné hodnoty stupně eroze PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C s hladkým povrchem a vzorků A, B, C, D se zdrsňeným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 23)



Obr. 21: Průměrné hodnoty stupně bobtnání PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C s hladkým povrchem a vzorků A, B, C, D se zdrsňným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 24)



Obr. 22: Průměrné hodnoty čísla kyselosti PLGA matric o hmotnosti 150 mg vzorků A, B, C s hladkým povrchem a vzorků A, B, C, D se zdrsňným povrchem v prostředí vody při 7°C v průběhu 1. až 14. dne. (tab. 25)



12. DISKUZE

12.1. K zaměření práce

Bobtnání je proces, který úzce souvisí s uvolňováním léčivých látek. V případě biodegradabilních polyesterů alifatických hydroxykyselin, jako je např. kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA), nesouvisí kinetika uvolňování pouze s difúzí léčivé látky, je v souvislosti také s erozí materiálu a s aktuální aciditou v něm.

Při teplotách v rozmezí od 22°C do 42°C bylo u některých polymerů a oligomerů typu PLGA a jeho větvených analogů pozorováno ve vodném prostředí pulzní chování. Při těchto teplotách dochází u nízkomolekulárních sloučenin k deformaci tělísek. Při snížené viskozitě na ně působí jednak gravitace, jednak povrchová energie. Proto bylo snahou vyzkoušet, jak se projevuje kopolymer PLGA při teplotě kolem 7°C, při které nedochází k markantním změnám tvaru testovaných tělísek. Případné změny v chování byly sledovány po dobu 14 dní u tělísek ve dvou velikostech, hmotnostně 50 mg a 150 mg. V periodě prvních 7 dní byla sledována také tělíška, která měla hmotnost 100 mg a 250 mg. Byl sledován také faktor velikosti povrchu tak, že tělíška byla zbroušena hrubým smirkovým papírem a pomocí pilníku vytvořenými vrypy.

Současně s bobtnáním byla hodnocena eroze materiálu a číslo kyselosti jako parametry, které mohou souviset s průběhem bobtnání polyesterů. Pokusy byly realizovány ve třech nebo ve čtyřech opakováních.

12.2. K vlivu hmotnosti tělísek na sledované parametry

Byla testována tělíška z PLGA ve čtyřech různých hmotnostech ve čtyřech opakováních. Na obr. 2 jsou naměřené stupně eroze. Hodnoty značně kolísají, jsou v průměru vyšší než 100 %. Relativní chyba je zákonitě nejvyšší u nejmenších tělísek, dosahuje až 7 %. U pětinasobných tělísek je chyba menší než 1%, což je možno pokládat za mimořádnou přesnost experimentální práce. Celkově je možno dojít k závěru, že v období prvních 8 dní nedochází k erozi, zkouška má význam v poskytnutí informace o věrohodnosti získaných dat.

Na obr. 3 je jednoznačně progresivní průběh bobtnání tělísek. Rychlost děje stoupá s jejich klesající velikostí. Nedostatečně průkazné je maximum hodnot charakteristiky mezi 4. a 5. dnem u nejmenších tělísek. V případě hodnot čísla kyselosti je možno s nezanedbatelnou pravděpodobností předpokládat možnost dvou maxim koncentrace koncových karboxylových skupin. Vše nasvědčuje tomu, že v matrici vznikají nízkomolekulární degradační produkty, které jsou pulzně vypuzovány do okolí. Zajímavé je, že maximum koncentrace karboxylů předbíhá náznak maxima bobtnání. Při progresivním stoupaní hodnot stupně bobtnání se nemusí jednat o obstrukční efekt zotnalého gelu, ale o pulzní změny koncentračního gradientu na průběh uvolňování degradačních produktů z tělísek. Útlumový vliv stoupající velikosti tělísek na pulzaci je zřejmý.

Stejné experimentální schéma pro třikrát opakovaný pokus je na obr. 5 až obr. 7. Rozdíl je v uvedení všech dat a v prodloužení doby pozorování na dvojnásobek, tedy na 14 dní. Hodnoty stupně eroze jsou nadhodnocené. Příčinou je nedostatečné vysušení tělísek. Při hmotnosti 50 mg je chyba přijatelná. Variabilita stupně bobtnání se v období 2. týdne snížila (obr. 6). Domněnka o pulzním charakteru bobtnání má v tomto období podporu v pravděpodobném maximu v intervalu 11. den. Totéž platí o věrohodnosti maxima čísla kyselosti v intervalu 11. den (obr. 7). Také v tomto případě byl zaznamenán jednodenní předstih maxima hodnot čísla kyselosti před maximem stupně bobtnání (obr. 8).

Také v případě 150 mg tělísek došlo ve druhé polovině sledovaného časového intervalu k výraznému snížení variability zjištěných hodnot stupně bobtnání. Chyba měření je zpravidla menší než 2 % (obr. 9). Průběh hodnot charakteristik bobtnání a koncentrace karboxylů je pozoruhodně podobný (obr. 10 až 12). Týká se to maxima a minima stupně bobtnání v intervalu 11. a 12. den a stejných extrém v případě koncových karboxylů v intervalu 10. a 12. den. Na základě výše uvedeného je možno tvrdit, že při teplotě 7°C probíhají pulzy bobtnání, které mají souvislost s pulzními změnami koncentrace koncových skupin.

Srovnáním průměrových hodnot časového průběhu obou jevů je možno opakovat, že u menších tělísek je větší chyba měření stupně eroze (obr. 13). Také bobtnání a koncentrace karboxylů má absolutně vyšší hodnoty u menších tělísek. Z toho je

možno učinit závěr, že mezi bobtnáním a koncentrací karboxylů je souvislost z hlediska vlivu velikosti tělísek v rozmezí od 50 mg do 150 mg.

12.3. K vlivu povrchu tělísek na sledované parametry

Difúze je důležitým jevem při bobtnání, její rychlost může být hlavním faktorem ovlivňujícím kinetiku procesu v případě velmi nízkých rychlostí bobtnání. Jak je možno posoudit z výše uvedených dat, rychlost bobtnání nepřevýšila 2 % přírůstek hmotnosti za jeden den, většinou byla podstatně nižší. Proto byl vyzkoušen faktor změny velikosti povrchu polyesterových tělísek jejich zdrsněním při zachování stejné hmotnosti, jakou měla tělíška s hladkým povrchem, tedy 150 mg.

Na obr. 16 jsou hodnoty stupně eroze. Patrný je jejich rozptyl, který nepřesahoval v rámci čtyř opakování 4 %. Tuto informaci je možno využít jako test přesnosti gravimetrické metody za daných podmínek.

Průběh bobtnání na obr. 17 je prakticky monotónně stoupavý při velmi dobré reprodukovatelnosti. Za 14 dní byla dosažena hodnota charakteristiky 12 %. Průběh hodnot čísla kyselosti (obr. 18) je odlišný od časového vývoje stupně bobtnání (obr. 19). Zpočátku dochází ke snížení patrně převládající difúzi z povrchových vrstev, po 3. dnu se projevila tendence ke zvyšování koncentrace karboxylů patrně pomalou hydrolyzou. Po 11. dni převládla hydrolyza nad difúzi patrně vlivem autokatalytického působení karboxylových skupin na kyselou hydrolyzu. Difúzní cesty patrně nejsou průchodné pro většinu nově generovaných molekul z důvodu jejich velikosti. Také jistě platí, že mnohé nově vzniklé molekuly nejsou ve vodě rozpustné.

Hodnoty stupně eroze přesahující 100% hranici maximálně o 2% mohou být kromě nepřesností při zpracování vzorků způsobeny sorpcí strukturální vody (obr. 20). Zvětšení povrchu mělo vliv na rychlejší bobtnání překvapivě až po 4. dni působení vody. Možným vysvětlením je prostupnější výše zbotnalá povrchová vrstva polymeru (obr. 21). Dalším neočekávaným výsledkem je vyšší číslo kyselosti v počátečním jednodenním intervalu a jeho pokles v další fázi do 3. dne.

Tento výsledek by bylo vhodné opakovat a potom hledat příčinu. V další fázi byly oba průběhy podobné charakterizované progresivním bobtnáním.

13. ZÁVĚRY

- A) Při teplotě 7°C v prostředí vody nedochází k erozi kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové PLGA 50:50 s hodnotami M_n 4600 a M_w 7100 v měřitelném rozsahu. Zjištěné hodnoty jsou nadhodnocené pravděpodobně přítomností obtížně vysušitelné strukturální vody.
- B) Byly prokázány specificky probíhající jevy při bobtnání a hydrolýze PLGA spočívající v maximálních hodnotách charakteristik stupně kyselosti následované v jednodenním odstupu maximem stupně bobtnání.
- C) Modifikací povrchu testovaných tělísek jejich zdrsněním dojde k progresivnímu vzrůstu hodnot charakteristik bez jejich pulzace.
- D) Byl prokázán vliv velikosti tělísek na průběh bobtnání a na změny koncentrace koncových karboxylových skupin při jejich hmotnosti od 50 mg do 250 mg.
- E) Kromě mechanismu změny obstrukčního efektu gelové struktury je možno také předpokládat mechanismus změny osmotického gradientu degradačních produktů v různých vrstvách zbobtnalých tělísek.

14. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Li S., Vert M., Biodegradation of aliphatic polyesters. In Scott G., Gilead D., editors., Degradable polymers: principles and application., London Chapman&Hall, 1995, 43-87.
- (2) Madhawan N.K., Nimisha R.N. et al., An overreview of the recent development in polylactide (PLA) research., Bioresource Technol. 101, 2010, 8493-8501.
- (3) Li S., McCarthy S., Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(D,L-lactide)., Biomaterials 20, 1999, 35-44.
- (4) Therin M., Christel P. et at., In vivo degradation of massive poly(α -hydroxy acids): validation of in vitro findings., Biomaterials 13, 1992, 594-600.
- (5) Nieuwenhuis J., Synthesis of polylactides, polyglycolides and their copolymers., Clin. Mater. 10, 1992, 59-67.
- (6) Penezec S., Duda A., et al., What we have learned from cyclic esters polymerization., Macromol.Symp. 153, 2000, 1-15.
- (7) Moon S., Lee C., et al., Melt polycondensation of L-lactic acid with Sn(II) catalysts activated by various proton acids: a direct manufacturing route to high molecular weight poly(L-lactic acid)., J. Polym. Sci. Pol. Chem. 38, 2000, 1673-1679.
- (8) Proikalis C., Tarantili P., et al., Synthesis and characterization of low molecular weight polylactic acid., J. Elastom. Plast. 34, 2002, 49-63.
- (9) Lee M., Tan H., et al., Synthesis and characterization of PLLA by melt polycondensation using binary catalyst system., SIMTech. Techn. Rep. 6(3), 2005, 40-44.
- (10) Moon S., Lee C., et al., Melt/solid polycondensation of L-lactic acid: an alternative route to poly(L-lactic acid) with high molecular weight., Polymer 42, 2001, 5059-5062.
- (11) Kenley R., Lee M., et al., Poly (lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro., Macromolecules 20, 1987, 2403-2406.

- (12) Li S., Garreau H., et al., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 1: poly(_{D,L}-lactic acid)., J. Mater. Sci- Mater. M. 1, 1990, 123-130.
- (13) Wiley J. & Sons Inc., Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids., J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.) 48, 1999, 342-353.
- (14) Li S., Vert M., Morphological changes resulting from the hydrolytic degradation of stereocopolymers derived from α - and _{D,L}-lactides. Macromolecules 27, 1994, 3107-3110.
- (15) Hašková V., Interakce oligoesteru PLGA s vodným prostředím., Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2012.
- (16) Maharana T., Mohanty B., et al., Melt-solid-polycondensation of lactic acid and its biodegradability, Prog. Polym. Sci. 34, 2009, 99-124.
- (17) Nugroho P., Mitomo H., et al., Degradation of poly(_L-lactic acid) by γ -irradiation., Polym. Degrad. Stabil. 72, 2001, 337-343.
- (18) Proikakis CS., Mamouzelos N., et al., Swelling and hydrolytic degradation of poly(_{D,L}-lactid acid) in aqueous solutions., Polym. Degrad. Stabil. 91, 2006, 614-619.
- (19) van Nostrum C., Veldhuis T.F.J., et al., Hydrolytic degradation of oligo(lactic acid): a kinetic and mechanistic study., Polymer 45, 2004, 6779-6787.
- (20) Li S., Girod-Holland S., et al., Hydrolytic degradation of poly(_{D,L}-lactic acid) in the presence of caffeine base., J. Control. Release 40, 1996, 41-53.
- (21) Enamul M., Yong L., et al., Mathematical modeling on degradation of 3D tissue engineering scaffold materials., Regenerative research 1, 2012, 58-61.
- (22) www.sciencedirect.com, 16.9.2013, 17:56.
- (23) Li S., Gerreau H., et al., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media, Part 3: influence of the morphology of poly(_L-lactic acid)., J. Mater. Sci-Mater. M. 1, 1990, 198-206.

- (24) Park T. G., Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight., *J. Control. Release* 30, 1994, 161-173.
- (25) Shah S.S., Cha Y., et al., Poly(glycolic acid-co-D,L-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?, *J. Control. Release* 18, 1992, 261-270.
- (26) Makino K., Mogi T., et al., Pulsatile drug release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: how does the composition of the polymer matrixes affect the time interval between the initial burst and the pulsatile release of drugs?, *Colloid. Surf. B., Biointerfaces* 19, 2000, 173-179.
- (27) Freiberg S., Zhu X.X., Polymer microspheres for controlled drug release-review., *Int. J. Pharm.* 282, 2004, 1-18.
- (28) Park T.G., Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition., *Biomaterials* 16, 1995, 1123-1130.
- (29) Vert M., Li S., et al., More about degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. *J. Control. Release* 16, 1991, 15-26.
- (30) Li S., Garreau H., et al., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 2: degradation of lactide/glycolide copolymers PLA_{37,5}GA₂₅ and PLA₇₅GA₂₅, *J. Mater. Sci-Mater. M.* 1, 1990, 131-139.
- (31) Dunne M., Corrigan C.I., et al., Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* 21, 2000, 1659-1668.
- (32) Frank A., Rath S., et al., Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition. *J. Control. Release* 102, 2005, 333-344.
- (33) Li S., Vert M., Hydrolytic degradation of coral/poly(D,L-lactic acid) bioresorbable material., *J. Biomat. Sci- Polym. E.* 7, 1996, 817-827.
- (34) Vashist A., Gupta Y.K., et al., Interpenetrating biopolymer network based hydrogels for an effective drug delivery system., *Carbohydr. Polym.* 87, 2012, 1433-1439.

- (35) Lin Y., Zheng Z., et al., In vitro Degradation and Protein Release of Transparent and Opaque Physical Hydrogels of Block Copolymers at Body Temperature., *Macromol. Research* Vol. 20, No. 3, 2012, 234-243.
- (36) Edlund U., Albertsson A.C., Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery., *Adv. Polym. Sci.* 157, 2002, 67-112.
- (37) Vasir J.K., Tambwekar K., et al., Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system., *Int. J. Pharm.* 195, 2003, 13-32.
- (38) Bai X.L., Yang Y.Y., et al., Effect of polymer compositions on the fabrication of poly(ortho-ester) microspheres for controlled release of protein., *J. Appl. Polym. Sci.* 80, 2001, 1630-1642.