

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE**

**VLIV MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI A STUPNĚ  
VĚTVENÍ ALIFATICKÝCH OLIGOESTERŮ NA  
JEJICH HYDROLYTICKOU DEGRADACI**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

**Hradec Králové 2015**

**Veronika Müllnerová**

*Děkuji vedoucímu práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné a trpělivé vedení při vypracování této diplomové práce a za poskytnutí cenných rad.*

*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.*

*Hradec Králové, 2015*

*Veronika Müllnerová*

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Kandidát: Veronika Müllnerová  
Konzultant: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.  
Název diplomové práce: Vliv molekulové hmotnosti a stupně větvení alifatických oligoesterů na jejich hydrolytickou degradaci

Teoretická část diplomové práce se zabývá chováním, vlastnostmi či využitím biodegradabilních polyesterů, zejména kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Je zde zmíněna degradace, eroze či mechanismus uvolňování. Dále jsou zde popsány vlastnosti, které ovlivňují uvolňování léčiva ze systémů založených na PLGA. V závěru teoretické části je pojednáno o in situ tvořených implantátech, u nichž je nosičem léčivé látky biodegradabilní polyester. V rámci experimentální části byl zkoumán vliv změny pH média ve fyziologicky obvyklých mezích a také vliv iontové síly na stupeň bobtnání a erozi polymerních tělísek. Tyto parametry degradace byly zkoumány u tří potenciálních polyesterových nosičů léčivých látek – PLGA, M3 (terpolymer kyseliny mléčné a glykolové s přídavkem mannitolu) a T3 (terpolymer kyseliny mléčné a glykolové s přídavkem tripentaerythritolu). Polymerní tělíška byla uložena při teplotě 37°C v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH a různé koncentraci. Vzorky byly z termostatu odebírány v určitých intervalech - 1, 3, 7, 14 a 21 dní. Lineární kopolymer PLGA se od větvených polymerů lišil vyšším stupněm bobtnání a rychlejší erozí. Zároveň bylo potvrzeno, že se zvyšujícím se stupněm větvení se prodlužuje doba eroze.

# Abstract

Charles Univerzity in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Pharmaceutical Technology

Candidate: Veronika Müllnerová  
Consultant: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.  
Title of thesis: Impact of molecular weight and the grade of branching  
of aliphatic oligoesters on their hydrolytic degradation

Theoretical part of the thesis deals with behavior, properties and applications of biodegradable polyesters, mainly copolymers of lactic and glycolic acid (PLGA). This part concerns degradation, erosion and release mechanism. Furthermore, it describes properties that influence the drug release kinetics from systems based on PLGA. The final section of theoretical part is focused on the in situ forming implants, whose carrier of active substance is biodegradable polyester. The experimental part analyzes the influence of different pH of the medium within physiologically common boundaries and also the influence of ionic force on the degree of swelling and polymer erosion. These degradation parameters have been studied on three potential polyester carriers of active substances – PLGA, M3 (terpolymer of lactic and glycolic acid with mannitol) and T3 (terpolymer of lactic and glycolic acid with tripentaerythritol). Polymer bodies were kept in temperature of 37°C inside phosphate-citrate buffers with various pH and various concentration. Samples were taken out of the thermostat in specific intervals – 1 day, 3, 7, 14 and 21 days. Linear copolymer PLGA reported higher grade of swelling and faster erosion compared to the branched polymers. Simultaneously, it was confirmed that the erosion time extends in line with rising grade of branching.

# Obsah

<b>1. Zadání práce .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>4. Teoretická část.....</b>	<b>8</b>
4.1 Biodegradabilní polyestery .....	8
4.2 Degradace PLGA .....	8
4.3 Eroze PLGA .....	9
4.4 Přenos léčiv .....	10
4.5 Souvislost mezi 3 hlavními jevy – degradací, erozí a přenosem léčiv.....	10
4.6 Mechanismus uvolňování.....	11
4.7 Faktory ovlivňující uvolňování léčiva ze systému podávání léčiva založeném na PLGA .....	14
4.7.1 Fyzikálně-chemické procesy .....	14
4.7.2 Faktory ovlivňující fyzikálně-chemické chování PLGA.....	15
4.8 Způsoby uvolňování léčiva .....	16
4.9 Injekční implantáty pro prodloužené uvolňování proteinových a peptidových léčiv .....	17
4.9.1 Injekční implantáty obecně .....	17
4.9.2 Omezení injekčních implantátů.....	18
4.9.3 Některé biodegradabilní implantáty v terapeutické praxi .....	19
4.10 Implantáty tvořené in situ pro léčbu parodontitidy .....	21
<b>5. Experimentální část.....</b>	<b>23</b>
5.1 Použité přístroje .....	23
5.2 Použité chemikálie .....	23
5.3 Postup přípravy .....	24
5.3.1 Příprava pufu.....	24
5.3.2 Příprava polymerních tělísek.....	24
5.3.3 Stanovení stupně bobtnání a eroze .....	25
5.4 Vzorce pro výpočet .....	26
<b>6. Výsledky – tabulky a grafy.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Diskuse.....</b>	<b>63</b>

7.1	K tématu a metodě řešení .....	63
7.2	K bobtnání oligomeru PLGA .....	63
7.3	K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a tripentaerythritolu	64
7.4	K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu .....	65
7.5	K bobtnání a erozi polyesterových nosičů při různých hodnotách pH .....	65
7.6	K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH 6,0.....	66
7.7	K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH 7,0.....	67
7.8	K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH.....	67
7.9	K erozi terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH.....	68
<b>8.</b>	<b>Závěry.....</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>70</b>

# 1. Zadání práce

Hlavní zájem byl směřován na získání nových informací o průběhu bobtnání a eroze jako jednotlivých parametrů degradace a jejich vzájemných souvislostí u tří potenciálních polyesterových nosičů léčivých látek typově odlišných z hlediska architektury molekuly a s různou molekulovou hmotností. Vycházelo se z dříve na pracovišti obhájených diplomových a rigorózních prací, ve kterých byla data popisující pulzní průběh bobtnání. Cílem experimentálně zaměřené práce bylo prozkoumat, jak silný je vliv změny pH média ve fyziologicky obvyklých mezích na bobtnání a erozi tělísek stejné velikosti a tvaru. Dalším problémem předloženým k řešení byl vliv koncentrace pufru, tedy vliv změny iontové síly vodného média na oba děje, které doprovázejí hydrolytický rozklad alifatických polyesterů.



## 2. Seznam použitých zkratek

AHAs - alifatické  $\alpha$ -hydroxy kyseliny

Da - dalton (atomová hmotnostní jednotka)

FDA - Food and drug administration

GA - glykolová kyselina

LA - mléčná kyselina

M3 - terpolymer kyseliny mléčné a glykolové s přídavkem mannitolu

NMP - N-methylpyrrolidon

PCL - polykaprolakton

PEG - polyethylenglykol

PGA - poly-glykolová kyselina

PLA - poly-mléčná kyselina

PLGA - kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

SAIB - sacharóza acetát isobutyryát

T3 - terpolymer kyseliny mléčné a glykolové s přídavkem tripentaerythritolu

$T_g$  - teplota skelného přechodu

### 3. Úvod

PLGA (kopolymer kyseliny mléčné a glykolové) patří mezi biodegradabilní polyestery, což znamená, že může být štěpena až na samotný monomer. V poslední době má studium těchto polymerů čím dál větší význam. Nacházejí své uplatnění v lékových formách s cílenou biodistribucí léčivých látek nebo s řízeným uvolňováním. PLGA může být jako nosič využita pro uvolňování celé řady léčiv, které mohou být aplikovány topicky nebo parenterálně. Oproti klasickým lékovým formám mají hned několik výhod. Mohou léčivou látku uvolňovat postupně (po dobu několika týdnů až měsíců), čímž se zlepšuje pacientova compliance k dané léčbě. Další výhodou je, že implantát, ve kterém je nosičem léčiva biodegradabilní polyester, nemusí být chirurgicky odstraněn a rozpadne se sám na netoxické produkty.

## 4. Teoretická část

### 4.1 Biodegradabilní polyestery

Polyestery odvozené od alifatických  $\alpha$ -hydroxy kyselin (AHAs) patří mezi nejvýznamnější biodegradabilní materiály v medicíně, farmacii a tkáňovém inženýrství. Hlavní důvod tohoto dlouhodobého zájmu je jejich biodegradabilita a biokompatibilita. (1) Je možné ovlivnit průběh degradačních procesů pozměněním struktury a/nebo složení, zatímco biokompatibilita se může zvýšit úpravou povrchu. (2) Můžeme povrchově upravovat PLGA částice, zabudovat do nich kombinaci různých látek ve formě molekulární disperze nebo nanočástic a zacílit tak tento složitý systém na orgány a buňky. Tímto je dosaženo vyššího terapeutického efektu. (3)

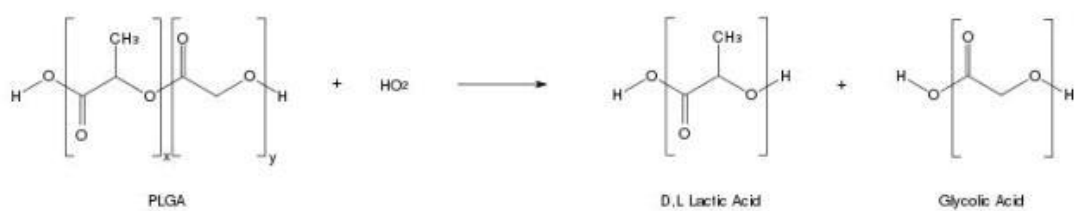
Kopolymery kyseliny mléčné (LA) a glykolové (GA) se používají v praxi jako chirurgické šití už déle než čtyři desetiletí. Od té doby probíhá intenzivní výzkum vývoje vysoce propracovaných materiálů založených na struktuře alifatických polyesterů. (4)

PLGA mikročástice jsou hodně studovány pro jejich využití v systémech s řízeným uvolňováním. A to zejména kvůli jejich biodegradabilitě a vstřebatelnosti, které berou v úvahu pasívní degradaci polymeru ve vodném prostředí, jako jsou živé tkáně, a resorpci degradačních produktů do okolního média. Navzdory těmto výhodám zavedení těchto systémů pro lidskou populaci je pozvolné, charakteristika a vzhled mikročástic závisí především na metodě pokusu a omylu a souhra mezi všemi jevy, které přispívají k uvolňování léku, je stále zkoumána. Systémy s řízeným uvolňováním mají ve srovnání s tradičním režimem potenciál zachovat látkovou koncentraci v cílové oblasti, eliminovat vedlejší účinky způsobené extrémními koncentracemi a opakovaným podáváním, a zlepšit pacientovu compliance. (5)

### 4.2 Degradace PLGA

Degradace se týká procesů, kterými jsou řetězcové vazby polymerů hydrolyzovány, a vznikají tak oligomery a monomery. PLGA je depolymerizována v přítomnosti vody. Esterové vazby v polymerovém řetězci se štěpí hydrolyticky.

Reakce může být katalyzována kyselinami nebo zásadami, ale experimentální data ukazují, že pouze reakční mechanismus katalyzovaný kyselinami je významný. V biologickém prostředí degradace  $\alpha$ -hydroxy kyselin může probíhat buď heterogenně, to znamená v povrchové vrstvě, nebo homogenně. Homogenní degradace probíhá v celém objemu a je charakterizována bobtnáním. (6)



**Schéma 1:** Hydrolýza PLGA (2)

### 4.3 Eroze PLGA

Termín eroze se týká ztráty hmoty difúzí ve vodě rozpustných malých oligomerů a monomerů z polymerní matrice. Eroze závisí na procesech týkajících se degradace, disoluce a difúze.

Eroze může být klasifikována jako povrchová nebo objemová. Pro povrchově erodující polymery, jako jsou například polyanhydridy, je typické, že míra degradace polymeru na povrchu je rychlejší než pronikání vody z tělních tekutin *in vivo* nebo z pufru *in vitro* do polymeru. U objemově erodujících polymerů je pronikání vody rychlejší než degradace polymeru. Degradace a eroze v objemově erodujících polymerech se vyskytuje v celém polymeru. Příčina heterogenní ztráty hmoty u objemově erodujících polymerů je obecně přisuzována společnému efektu autokatalytické degradace a omezení přenosu hmoty. (7)

## 4.4 Přenos léčiv

Počáteční rychlé uvolňování se obvykle objevuje tam, kde významné procento léčiva je uvolňováno během časné fáze procesu. Tento efekt vykazuje mnoho preparátů s PLGA mikrosférami. (8)

Následující řízené uvolňování molekuly léčiva z PLGA mikrosfér závisí na transportních vlastnostech léčiv a dynamických podmínkách degradujícího polymeru. Molekula léčiva z PLGA mikrosfér může být uvolňována kombinací difúze přes polymerní matrici, difúzí přes vodní póry a disolucí současně s rozpouštěním polymeru. Difúze přes hustou polymerní matrici je možná, ale je omezená pouze na malé hydrofobní molekuly, protože PLGA matrice je hydrofobní.

Difúze přes PLGA matrici a přes vodní póry může být považována za paralelní způsob uvolňování z polymerních mikrosfér, aby se uvolnily malé i velké molekuly léčiva a aby byla využita k přenosu před a poté, co se významně rozvine pórovitá síť. Ve vodě rozpustná léčiva pronikají přes vodní póry mnohem snadněji než přes polymerní matrici, takže prostupnost léčiva se zvyšuje s tím, jak se vytváří pórovitá síť. Jakmile je tato síť dostatečně vyvinutá, to znamená, že póry jsou větší než molekuly léčiva, začne se rychlost přenosu léčiva zvyšovat. (9)

## 4.5 Souvislost mezi 3 hlavními jevy – degradací, erozí a přenosem léčiv

Vazba mezi těmito třemi jevy je důležitá pro pochopení, jak jeden jev může dominovat nebo fungovat ve shodě s ostatními za různých podmínek. Mechanismus autokatalytické degradace může urychlovat degradaci a erozi ve středu mikrosfér a zlepšovat přenos léku závislý na velikosti molekul léčiva. Komplexní účinky autokatalýzy je těžké předvídat bez porozumění relativní síle těchto jevů a jejich dynamiky. (10)

U PLGA se může někdy projevit heterogenní eroze, a to když vnitřek degraduje rychleji než povrch polymeru. Tento jev je závislý na velikosti: u větších mikrosfér a tlustších vrstviček byla pozorována rychlejší eroze v jejich středu než u menších mikrosfér a tenčích vrstviček. (11)

Spojený mechanismus pro degradaci a erozi PLGA se skládá ze tří fází. V první fázi je tuhý polymer hydratován a degradace probíhá převážně homogenně nekatalytickou hydrolyzou přes celý polymer, zatímco koncentrace kyselých karboxylových skupin na konci polymerového řetězce je nízká. V druhé fázi, kdy je koncentrace katalyzátoru významná, se autokatalytická hydrolyza stává důležitou reakcí. Třetí fáze se týká disoluce malých oligomerů a monomerů do vodného média. Výrazná ztráta hmoty polymeru se objevuje tím víc, čím více oligomerů je rozpuštěno do pórů a transportováno přes rostoucí pórovitou síť. (12)

Velikost polymerových mikročástic hraje velkou roli v propojení mezi degradací, erozí, přenosem léčiv a autokatalytickým efektem.

#### 4.6 Mechanismus uvolňování

Pojem „mechanismus uvolňování“ je často definován různě. Tento termín může být použit jako popis cesty, kterou jsou molekuly léčiva transportovány nebo uvolňovány, nebo jako popis procesu nebo jevu, který určuje míru uvolňování. (13)

Existují tři možné cesty, kterými jsou molekuly léčiva uvolňovány ze systému podávání léčiv založeném na PLGA:

- přenos přes vodou plněné póry
- přenos přes polymer
- v důsledku disoluce obaleného polymeru (nevyžaduje přenos léčiva).

Přenos přes vodní póry je nejčastější způsob uvolňování, protože proteiny nebo peptidy jsou příliš velké a příliš hydrofilní, aby byly transportovány přes polymer. Nejčastější cestou přenosu přes vodou plněné póry je difúze, tj. náhodný pohyb molekul poháněný gradientem chemického potenciálu, který může být často podobný koncentračnímu gradientu. Další cestou uvolňování přes vodou plněné póry je proudění, které je poháněné silou, jako je osmotický tlak. Osmotický tlak může být vytvářen vtokem vody do neobtnajícího systému. Přenos léčiva poháněný touto silou se nazývá osmotické čerpání. (9)

Tři základní cesty uvolňování zmíněné výše a dva typy transportu zahrnuté v přenosu přes vodu plněné póry vedou ke čtyřem možným mechanismům uvolňování, pokud pojem „mechanismus uvolňování“ je definován jako cesta, kterou jsou molekuly léčiva uvolňovány:

- difúze přes vodu plněné póry
- difúze přes polymer
- osmotické čerpání
- eroze.

Difúze přes vodní póry je velmi závislá na porézní struktuře polymeru, a je proto závislá na procesech, které podněcují utváření a uzavírání pórů. Efektivní difúzní koeficient je závislý na difúzním koeficientu tekutin v pórech, na porozitě a zakřivenosti pórů. Póry musí být souvislé a musí tak spojovat molekulu léčiva s povrchem polymeru a musí být také dostatečně velké, aby rozpuštěná látka mohla projít. Neprůchodné póry, příliš malé póry a míra spojení mezi póry ovlivňují porozitu a zakřivenost. (9)

Difúze přes polymer je možná pro hydrofobní léčiva s malými molekulami. (14) Na rozdíl od difúze přes vodu plněné póry, difúze přes polymer není vysloveně závislá na porézní struktuře. Avšak léčivo musí být rozpuštěné ve vodě předtím, než je uvolňováno, a tento proces může snížit celkovou míru uvolňování. Vysoká porozita zvětšuje plochu pro rozpouštění léčiva, a může tak zlepšit uvolňování léčiva. Míra difúze přes polymer je velmi závislá na fyzickém stavu a v případě malé molekuly může významnost difúze vzrůst o několik řádů, pokud dochází k přechodu polymeru ze skelného stavu v pružný. (15) Teplota skelného přechodu pro původní polymer je nad 37°C. Nicméně po ponoření do vody, která má 37°C, plastifikační efekt způsobený vodou obvykle převede polymer do pružného stavu. PLGA s vysokou molekulovou hmotností může zůstat ve skelném stavu až do chvíle, než degradace a absorpce vody ovlivní polymer. Teplota skelného přechodu PLGA v systému podávání léčiva může být menší než tato teplota původního polymeru kvůli degradaci během výrobního procesu a plastifikačnímu efektu přísad nebo zbytkové vody. Prostupnost

léčiva přes polymer je často vyšší u polymeru s nižší molekulovou hmotností, protože polymerové řetězce jsou více flexibilní. (16)

Osmotické čerpání je jev, který se objevuje, když osmotický tlak způsobený absorpcí vody řídí přenos léčiva. Povaha tohoto transportu je tedy proudění, a ne difúze. Tento mechanismus uvolňování je častější v systémech obsahujících léčiva v jiných polymerech, jako je například ethylcelulóza. Ale jsou zaznamenány i případy osmotického čerpání u systémů podávání léčiva založených na PLGA. (17) Podmínkou pro řízení transportu osmotickým tlakem je vyrovnanost vtoku a výtoku po počáteční fázi úpravy objemu vody. Většina systémů podávání léčiva založených na PLGA se skládá z PLGA s nízkou molekulovou hmotností, které bobtnají rychleji či pomaleji, a každý osmotický tlak bude potom vyrovnán přírůstkem objemu. Osmotický tlak způsobený absorpcí vody může vést k destrukci tělesa polymeru. (9)

Eroze vede ke stejným profilům uvolňování léčiva a eroze polymeru za předpokladu, že léčivo je homogenně rozloženo v celém systému. Shodné uvolňování léčiva a eroze polymeru je popsáno, ačkoliv jsou tyto zprávy vzácné. Eroze polymeru může způsobit, že molekuly léčiva, které jsou velmi blízko povrchu, mohou být uvolňovány bez přenosu, a mechanismem uvolňování by potom byla eroze. Protože však hydratace je obvykle rychlejší než eroze, je pravděpodobnější, že léčivo bude pronikat přes póry vytvořené absorpcí vody. Eroze může být hlavním mechanismem uvolňování u preparátů, které obsahují PLGA s nízkou molekulovou hmotností, ve kterých podstatná část polymeru má molekulovou hmotnost těsně nad limitem pro rozpustnost ve vodě. (18)

Nicméně nejčastější použití termínu „mechanismus uvolňování“ se týká procesů, které určují míru uvolňování, například bobtnání, rozpouštění léčiva nebo vzájemné ovlivňování polymeru a léčiva. Eroze může být zahrnuta do obou definic, ale s jiným významem. Popis procesů kontrolujících míru uvolňování je více informativní než popis cesty uvolňování léčiva. Ale pokud jsou jako mechanismy uvolňování použity tyto procesy, může to vést k těmto problémům: (a) kvůli komplexnosti systému není vždy jasné, který proces dominuje, a (b) v řetězci procesů, které vedou k uvolňování léčiva, není zřejmé, který proces určuje míru uvolňování. (9)



## 4.7 Faktory ovlivňující uvolňování léčiva ze systému podávání léčiva založeném na PLGA

### 4.7.1 Fyzikálně-chemické procesy

Voda je absorbována polymerem okamžitě po ponoření do vody nebo po podání in vivo. Míra absorpce vody nebo hydratace je rychlá ve srovnání s uvolňováním léčiva. Jakýkoliv objem vyplněný vodou uvnitř polymerní matrice může být považován za pór a absorpce vody je proto proces tvořící póry. Tyto póry jsou příliš malé pro přenos léčiva během počáteční fáze tohoto procesu, ale jak se počet a velikost vodou vyplněných pórů zvyšuje, vytváří se porézní souvislá síť umožňující uvolňování léčiva. (19)

Hydrolýza, tj. rozštěpení esterových vazeb a následný pokles molekulové hmotnosti, začíná okamžitě po kontaktu s vodou. Hydrolýza tvoří kyseliny, které katalyzují další hydrolýzu. Tento autokatalytický jev způsobuje heterogenní degradaci uvnitř PLGA matric, tj. rychlejší degradaci ve středu PLGA matrice než na jejím povrchu. Polymery se stávají méně hydrofobní s klesající molekulovou hmotností a při 1100 Da se oligomery stávají rozpustnými ve vodě. (20)

Eroze, tj. ztráta hmoty polymeru, začíná, když jsou rozpuštěné degradační produkty polymeru schopné proniknout do okolního média. PLGA běžně prodělává erozi objemovou, protože PLGA je relativně rychle hydratována. Disoluce degradačních produktů polymeru a eroze vytvářejí póry. Malé póry tvořené absorpcí vody nebo erozí rostou, jakmile kontakt s vodou vede k hydrolýze a lokálně produkované kyseliny katalyzují degradaci a způsobují rozpouštění polymeru uvnitř pórů, což vede k pozdější erozi. Póry se mohou dokonce spojovat se sousedními póry nebo mohou být také uzavřeny. (19) Tento jev souvisí s pohyblivostí polymerových řetězců a s jejich schopností se přeskupovat. Pohyblivost polymerových řetězců závisí na teplotě skelného přechodu ( $T_g$ ). Tato teplota klesá s klesající molekulovou hmotností. (21)

#### 4.7.2 Faktory ovlivňující fyzikálně-chemické chování PLGA

Fyzikálně-chemické procesy zmíněné v kapitole 4.7.1 jsou ovlivněné vlastnostmi systému podávání léčiva a okolním prostředím. Jednou z metod, jak kontrolovat uvolňování léčiva, je vybrat PLGA s vhodnými vlastnostmi. Molekulové hmotnosti PLGA používané v systémech s řízeným uvolňováním jsou obvykle docela nízké, často menší než 50 kDa, a velmi zřídka vyšší než 150 kDa. Poměr monomerních jednotek se pohybuje od 50:50 až k 100:0. Koncové skupiny polymeru mohou nebo nemusí být zakončeny hydrofobními esterovými skupinami. Nízká molekulová hmotnost, nízký poměr monomerních jednotek kyseliny mléčné ke kyselině glykolové a volné koncové skupiny polymeru vedou k méně hydrofobním polymerům se zvýšenou mírou absorpce vody, hydrolýzy a eroze. (22) Počáteční teplota skelného přechodu také závisí na těchto vlastnostech. Polymery pouze s kyselinou L-mléčnou mohou být semikrystalické. (23)

Obalené léčivo a přísady také mohou ovlivňovat mnoho fyzikálně-chemických procesů. Například uvolňování léčiva mohou ovlivnit několika různými cestami: (a) zlepšit nebo potlačit absorpci vody a hydrolýzu kvůli zvyšující se hydrofobicitě/hydrofilicitě, osmolalitě nebo kvůli povrchově aktivním látkám, (b) zvýšit nebo snížit míru hydrolýzy kvůli kyselé nebo bazické katalýze nebo kyselé neutralizaci, (c) plastifikací polymeru, (d) prostorovým uspořádáním krystalické fáze. Aditiva se mohou používat jako stabilizátory proteinů, plastifikátory nebo povrchově aktivní látky. Množství inkorporovaného léčiva a jeho umístění mohou také ovlivnit jeho uvolňování. (24)

Charakteristiky, jako je porozita a hustota polymerního řetězce, jsou také důležité. Rozsáhlá struktura polymeru vede ke zvýšenému pH a autokatalytický efekt na degradaci se tak zlepší. (25) Tvar polymeru, zvláště poměr povrchové části k celkovému objemu, ovlivňuje uvolňování léčiva a degradační produkty PLGA. Velikost částic může ovlivnit rozmístění léčiva uvnitř struktury. Většina vlastností charakterizujících systém podávání léčiva je ovlivněna způsobem výroby. (24)

Místní okolní podmínky ovlivňují fyzikálně-chemické procesy, a tím uvolňování léčiva. Zvýšená teplota zvyšuje všechny chemické reakce, ale také zvyšuje pohyblivost polymeru, a tudíž i míru uzavírání pórů. Nepohyblivá povrchová vrstva

obklopující polymer blokuje uvolňování léčiva. pH nebo pufrovací kapacita je důležitá pro míru degradace, ale také pro utváření a uzavírání pórů. Tyto podmínky proto musejí být brány v úvahu, když se navrhuje metody uvolňování in vitro. Rychlejší degradace polymeru a uvolňování léčiva a kratší fáze zpoždění byly zaznamenány in vivo a jsou přisuzovány efektům enzymů, lipidů, možnému spojování mikročástic a imunitní odpovědi. (18) Nahromadění makrofágů v okolí polymeru je imunitní odpověď a fagocytóza malých mikročástic a uvolňování kyselých produktů těmito buňkami může zvýšit míru degradace. Také bylo zaznamenáno vytváření vláknitých pouzder okolo vstříknutých částic, které mohou snížit pH díky kyselým degradačním produktům. (26)

## 4.8 Způsoby uvolňování léčiva

Profil uvolňování je někdy používán jako základ pro mechanické uvolňování. Ačkoliv uvolňování kinetikou nultého řádu je nejčastěji upřednostňovaný profil, jednofázové uvolňování ze systému podávání léčiva založeném na PLGA je vzácné. Uvolňování léčiva je někdy dvoufázové, ale třífázový profil je pravděpodobně nejběžnější. Velké částice nebo systémy podávání léčiva často vykazují tento třífázový profil uvolňování z důvodu heterogenní degradace. (24) Malé částice a částice obalené tenkou vrstvou PLGA obvykle vykazují dvoufázový profil uvolňování s relativně rychlou druhou fází. Bylo prokázáno, že kombinací částic s různou velikostí lze dosáhnout změn profilu uvolňování léčiva. (27)

Fáze I. v klasickém třífázovém profilu uvolňování je obvykle popsána jako fáze rychlého uvolňování a týká se částic léčiva na povrchu nebo molekul léčiva blízké povrchu, které jsou snadno přístupné hydrataci. Další důvod rychlého uvolňování může být vytváření prasklin a rozštěpení částic. Fáze II. je obvykle fáze pomalého uvolňování, během které léčivo difunduje pomalu, buď přes relativně husté polymery, nebo přes několik existujících pórů, zatímco degradace a hydratace pokračují. Fáze III. je obvykle fází rychlejšího uvolňování a často je připisována počátku eroze. Nicméně všechny profily uvolňování se nedrží tohoto tradičního třífázového profilu uvolňování. Když je druhá fáze rychlá, může být pomalejší fáze na konci uvolňování. Profil uvolňování nemusí vykazovat žádnou fázi prudkého uvolňování. (28)

Existuje mnoho možných vysvětlení, proč mohou být fáze uvolňování různé. Spletitost procesů a jevů, které usnadňují nebo blokuji uvolňování léčiva, ztěžuje vyvozovat jakékoliv závěry pouze z profilu uvolňování. Pomalá druhá fáze nemusí být nutně způsobená nízkou porozitou polymeru, což je běžné vysvětlení. Může být také způsobená uzavřením pórů, interakcemi mezi polymerem a léčivem nebo mezi léčivem a léčivem, což blokuje uvolňování léčiva. Druhé prudké uvolňování nebo rychlá fáze III. je běžně prisuzována počátku eroze polymeru. Ale může být také způsobená prasklinami nebo rozštěpením částic. Jak se pH nebo ostatní charakteristiky okolního prostředí mění s časem, podmínky způsobující pomalé uvolňování mohou být měněny například tak, že proces vytváření pórů dominuje nad uzavíráním pórů. Bylo zjištěno, že rychlá fáze uvolňování může být fáze II. nebo III. v závislosti na typu PLGA. Zjistilo se, že počátek rychlého uvolňování léčiva závisí na intenzivním bobtnání, erozi a deformaci mikročástic a zvýšení míry uvolňování je připisováno dostupnosti nových povrchů. Jeden problém vizuální analýzy uvolňování léčiva je, že začátek a konec každé fáze není vždy zřejmý. Fáze mohou také mít svůj původ v procesech, které se překrývají, nebo v jevech, které působí navzájem. (29)

## 4.9 Injekční implantáty pro prodloužené uvolňování proteinových a peptidových léčiv

### 4.9.1 Injekční implantáty obecně

Proteinové a peptidové makromolekuly se objevily jako slibné léčebné prostředky teprve nedávno. Nicméně jejich dodání do cílového místa může být náročné vzhledem k jejich náchylnosti k denaturaci a degradaci, krátkému poločasu a tudíž i špatné biodostupnosti. Alternativní způsoby podání, jako je bukální, nosní, rektální, vaginální nebo transdermální, byly také zkoumány, ale studie ukázaly, že enzymatická degradace v těchto tkáních je srovnatelná s degradací v gastrointestinálním traktu. Implantáty tvořené in situ představují atraktivní parenterální způsob podání pro proteiny a peptidy, protože se snadno aplikují, dlouhodobě se uvolňují, jsou biokompatibilní s tkáněmi a jednoduše se vyrábějí. Injekční implantáty, které jsou aplikovány intramuskulárně nebo subkutánně a tuhnou in situ, aby vytvořily tuhé nebo

polotuhé depo léčiva, byly vyvinuty jako všestranná alternativa pro řízené parenterální podávání terapeutických látek. (30)

Injekční implantáty mohou dodávat proteiny nebo peptidy v kontrolovatelné míře po delší dobu, čímž se zmenší dávka a frekvence podávání léčiva. Vzhledem k tomu, že také snižují potřebu opakovaných injekcí a operací, injekční implantáty významně zlepšují aplikaci implantátů a tudíž i compliance pacientů. Mezi hlavní výhody injekčních implantátů patří jejich složení z farmaceuticky přijatelných složek, snadnost výroby, a ve většině případů biodegradabilita, biokompatibilita a netoxičnost. Kromě toho polymery používané v injekčních implantátech často stabilizují proteiny a peptidy díky své povrchové aktivitě, výhodnějšímu vylučování, sterickému bránění interakcí mezi proteiny nebo díky zvýšené viskozitě a omezování strukturálního pohybu proteinu. Některé polymery také mohou zabraňovat chemické denaturaci proteinů. Proto je zjevné, že začlenění proteinových a peptidových léčiv do těchto polymerových matric může také snížit jejich enzymatickou degradaci v plazmě. (31)

Implantáty tvořené in situ využívající biodegradabilní polymery k dodání léčiv byly poprvé zaznamenány kolem roku 1990. Byly vynalezeny biodegradabilní implantáty pro zvířata používající jak termoplasty, tak termosety. Od té doby bylo vyvinuto několik injekčních implantátů pro dodávání peptidových hormonů, proteinů, kontraceptiv, antagonistů účinků narkotik a protizánětlivých látek. (32)

#### 4.9.2 Omezení injekčních implantátů

Hlavním omezením většiny injekčních implantátů je počáteční rychlé uvolňování léčiva. Množství léčiva, které se na začátku uvolní, může být někdy vyšší než je doporučená bezpečná hranice, a proto může způsobit podráždění, bolest nebo i toxicitu. Bylo provedeno několik pokusů, aby se zamezilo počátečnímu rychlému uvolňování léčiva, a to zvýšením koncentrace polymeru, úpravou hydrofobicity vstříknutého média a zlepšením odpovědi na okolní podněty. Také bylo navrženo minimalizovat rychlé uvolňování spojením nebo polymerizací molekul léčiva. Bylo dokázáno, že spojením lidského růstového hormonu s poly-L-argininem nebo dimerizací se zinečnatými ionty, počáteční rychlé uvolňování léčiva může být potlačeno. Také může být pozorována lokální toxicita kvůli nereaktivním monomerům

jako výsledek neúplného vytváření implantátů. Mimo to na rozdíl od předlisovaných implantátů, kontrola, která se provádí nad tvarem a velikostí in situ tvořených implantátů, může někdy být nedostatečná. Takže můžeme pozorovat velkou variabilitu v míře degradace polymerní matrice a/nebo heterogenního uvolňování léčiva, což může také přispívat k předávkování nebo poddávkování léčiva a/nebo toxicitě. (33)

Ačkoliv začlenění do matrice polymeru často zabraňuje enzymatické denaturaci proteinů, může se objevit nestabilita léčiva kvůli interakcím mezi polymery. Hydrofobní interakce mezi hydrofilními proteiny a hydrofobními polymery mohou způsobit nerozpojitelné seskupení, což vede ke snížené aktivitě proteinu. Další příčinou spojení je kyselé okolní prostředí vycházející z degradace PLGA, což může znovu vyvolat degradaci proteinů. Stabilita proteinů se může zlepšit použitím kopolymerů PLGA s polyethylenglykolem (PEG), které jsou přirozeně amfifilní. Strana řetězce s PEG zabraňuje adhezi proteinu s polymerem, a proto stabilizuje protein ve vodném médiu. Systém in situ vytváří miniaturní gelové implantáty se zlepšenou stabilitou proteinu a profilem uvolňování ovlivněným kratší vzdáleností difúze proteinu. (34)

#### 4.9.3 Některé biodegradabilní implantáty v terapeutické praxi

Několik injekčních implantátů už bylo uvedeno na trh. Atrigel® (PLGA v NMP) je systém vhodný pro systémové a místní podávání léčiva. Byl vynalezen Dunnem *et al.*, a oprávnění k němu mají laboratoře Atrix pro subgingivální podávání antimikrobních látek pro léčení parodontitidy. Několik systémů, které jsou založené na Atrigelu, bylo od té doby schváleno FDA a jsou nyní na trhu. Atridox™ (Laboratoře Atrix, USA), určený k léčbě chronické parodontitidy dospělých a Doxirobe™ (Pfizer Animal Health, USA) používaný pro veterinární parodontitidu, jsou systémy o dvou stříkačkách, které vytvářejí depa léčiva souběžným vstříkáním Atrigelu a doxycyklinu hyklátu. (35) Eligard® (Sanofi Aventis, USA) je další injekční systém založený na technologii Atrigelu, který uvolňuje leuprolid acetát po dobu jednoho, tří nebo šesti měsíců. Eligard zahrnuje dvě oddělené sterilní injekční stříkačky, jedna obsahuje Atrigel systém a druhá leuprolid acetát, jejichž obsah se musí smísit těsně před aplikací. (36)

SABER<sup>TM</sup> (DURECT, USA) je vícesložkový systém s prodlouženým uvolňováním založený na sacharóze acetátu isobutyrate (SAIB), farmaceuticky přijatelném rozpouštědle a jedné nebo více přísadách. Léčivo je rozptýlené nebo rozpuštěné v SAIB a vstříkováno intramuskulárně nebo subkutánně. In situ se vytváří fázovou disperzí viskózní depo. Byl zjišťován potenciál systému SABER dodávat různé molekuly léčiva a ukázalo se, že prodlouženého uvolňování intaktního růstového hormonu může být dosaženo in vivo alespoň po dobu 7 dnů. SABER se také může používat pro prodloužené uvolňování bupivakainu (POSIDUR<sup>TM</sup>) po dobu 72 hodin, který tlumí pooperační bolest. (37)

ReGel<sup>®</sup> (BTG, UK) je triblokový kopolymer (PLGA-PEG-PLGA), který gelovatí in situ přechodem sol-gel zprostředkovaným teplotou. Jednou z největších výhod je jeho schopnost stabilizovat špatně rozpustná a křehká léčiva. Cytosin<sup>TM</sup> je injekce dovnitř tumoru, která obsahuje ReGel/interleukin-2 a vykazuje prodloužené uvolňování po dobu 72 až 96 hodin a představuje slibný základ pro imunoterapii rakoviny. hGHD-1 je proteinový systém pro prodloužené uvolňování růstového hormonu z Re-Gelu, zatímco OncoGel<sup>TM</sup> je depotní systém používaný pro prodloužené uvolňování paklitaxelu po dobu alespoň 6 měsíců. (38) InGell Gamma (Laboratoře InGell, Nizozemí) je další triblokový PCL-PEG-PCL systém, který je citlivý vůči vyšší teplotě a byl vyvinut pro dodávání různých proteinů, peptidů a dalších terapeutických agens. Díky přítomnosti  $\epsilon$ -kaprolaktonu, InGell Gamma je údajně stabilnější než ReGell a umožňuje delší profil uvolňování. (39)

BioSyntech Inc. (Kanada) vyvinul systém citlivý vůči vyšší teplotě založený na chitosanu, který se kombinuje s  $\beta$ -glycerolfosfátem. Tento hydrogel s prodlouženým uvolňováním je registrován jako BST-gel<sup>TM</sup> a byl navržen pro místně specifické prodloužené uvolňování několika léčiv. Pacligel<sup>®</sup> (Paklitaxel/BST-gel) byl navržen pro léčbu rakoviny prsu a injekce dovnitř tumoru poskytuje prodloužené uvolňování po dobu několika dní s minimálním systémovým ohrožením a tudíž sníženou toxicitou. Byly provedeny také pokusy na zabudování dalších chemoterapeutických léčiv, jako je například kamptotecin, do systému BST-gel. (40)

Octodex<sup>TM</sup> hydrogely jsou vhodné zvláště pro dodávání proteinů a peptidů, protože neobsahují organická rozpouštědla, dochází k příčnému navázání za mírných

podmínek a vykazují jen mírný pokles pH během degradace. Tento hydrogel obsahuje dextran s kyselinou L nebo D-mléčnou, s nimiž je uspořádán do komplexu ve vodném médiu. Jakmile se hydrogel zformuje, degraduje rychle na dva neškodné degradační produkty, kyselinu mléčnou a dextran. InGell Delta (Laboratoře InGell) je další hydrogel s dextranem, který se formuje in situ. Jako v případě Octodexu, InGell Delta je výborný systém pro dodávání proteinů díky mírným podmínkám při přípravě, gelaci in situ a pozdější degradaci. (41)

#### 4.10 Implantáty tvořené in situ pro léčbu parodontitidy

Parodontitidu můžeme definovat jako nemoc, která ovlivňuje dásňové struktury a vede k destrukci podpůrných tkání zubů, vaziv a alveolární kosti, což je výsledek interakcí mezi patogeny v dásních a hostitelskou imunitní odpovědí. Za hlavní faktor způsobující zánět a destrukci tkání jsou považovány mikroorganismy, které osídlují pacientovy dásňové choboty. Přesný mechanismus, jak vzniká tato nemoc, není dodnes zcela pochopen. Předpokládá se, že (a) podezřelé patogeny produkují biologicky aktivní molekuly, které napadají hostitelskou tkáň a/nebo (b) imunitní odpověď hostitele na tyto patogeny vede k destrukci tkání. Důsledek ztráty tkáně je prohloubení dásňových chobotů, a jakmile je mechanické ukotvení zubu nedostatečné, může dojít k jeho ztrátě. (42)

V současnosti spočívá standardní léčba parodontitidy v mechanickém odstranění bakterií a následném očištění kořene. Nicméně anatomie pacientových chobotů může někdy bránit dokonalému odstranění bakterií a v některých případech patogeny mohou znovu osídlit dutiny i po ošetření. Aby se snížilo riziko znovuobjevení se patogenních mikroorganismů, doporučuje se použití různých antimikrobních látek v kombinaci s očištěním kořene. (43)

Bylo navrženo hodně systémů podávání léčiva s řízeným uvolňováním pro léčbu parodontitidy. Implantáty tvořené in situ mají slibný potenciál překonat jednu z největších překážek, která je spojená s lokální léčbou parodontitidy. Tou je omezená přilnavost k okolním tkáním, která vede k vyloučení části nebo i celého implantátu z pacientova chobotu. Mezi další výhody implantátů tvořených in situ patří relativně snadný způsob podání použitím injekční stříkačky a rozšíření uvnitř celého chobotu,



velikost a geometrie výsledného implantátu se přizpůsobí každé dutině, míra uvolňování léčiva může být časově řízená, není potřeba odstraňovat zbytky implantátu a mohou být použity biokompatibilní pomocné látky. (44)

Komerčně dostupný in situ tvořený implantát je Atridox®. Skládá se z kyseliny polymléčné (PLA, 36,7%) rozpuštěné v N-methyl pyrrolidonu (organické rozpouštědlo, 63,3%) a 10% doxycyklinu hydrátu. Po vstříknutí NMP prostupuje do okolního prostředí a hydrofilní biologické tekutiny pronikají do preparátu. Následkem toho se rozpustnost PLA snižuje a polymer precipituje. Léčivo je pak uvolňováno přes degradující polymerovou matici po dobu 1 týdne. Hlavní nevýhoda tohoto systému je jeho omezená přilnavost k okolním tkáním. To vede k velké nejistotě, protože nevíme, kolik léčiva skutečně dosáhne cílové tkáně. Zkouší se k preparátům přidávat různé typy sloučenin, jako jsou plastifikátory (např. acetyltributyl citrát a dibutyl sebakát) nebo bioadhezivní polymery (např. deriváty celulózy jako je hydroxypropyl methylcelulóza), aby se zlepšila přilnavost k okolním tkáním. Musí se ale důkladně prostudovat vliv těchto přísad na další klíčové vlastnosti systému, zejména plasticitu/elasticitu a kinetiku uvolňování léčiva. (35)

## 5. Experimentální část

### 5.1 Použité přístroje

Digitální váhy Kern, max.8100g, d=0,05g

Analytické digitální váhy Kern ABS, max.220g, d=0,1mg

pH metr, HI 221 Microprocessor pH Meter

Elektromagnetická míchačka, Heidolph MR 3001

Biologický termostat, BT 1200 Laboratorní přístroje Praha

Vakuová sušárna, Binder

Horkovzdušná sušárna, Memmert

### 5.2 Použité chemikálie

Polymerní nosiče, FAF UK, Katedra farmaceutické technologie (charakteristiky polymerů viz. Tabulka 1)

Kyselina citronová monohydrát, Lach-Ner Neratovice

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach-Ner Neratovice

**Tabulka 1:** Charakteristiky použitých polymerních nosičů

označení	složení	M <sub>n</sub> [g/mol]	M <sub>w</sub> [g/mol]	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	T <sub>g</sub> [°C]	g <sup>c</sup>
	GA:LA:M(T)					
PLGA	50:50:0	4600	7100	1,54	38,0	1,00
T3	48,5:48,5:3	7900	20600	2,61	21,7	0,31
M3	48,5:48,5:3	2600	3800	1,46	23,7	1,08

GA – kyselina glykolová, LA – kyselina DL-mléčná

M – mannitol, T - tripentaerythritol

M<sub>n</sub> – číselně střední relativní molekulová hmotnost, M<sub>w</sub> – hmotnostně střední relativní molekulová hmotnost

M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> – stupeň polydisperzity

T<sub>g</sub> – teplota skelného přechodu

g<sup>c</sup> – stupeň větvení

## 5.3 Postup přípravy

### 5.3.1 Příprava pufru

Fosfát-citrátový pufr byl připraven smísením roztoků monohydrátu kyseliny citronové a dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného. Navážka kyseliny citronové pro přípravu 1000 ml roztoku byla 21,0g. Navážka hydrogenfosforečnanu disodného pro přípravu 1000 ml roztoku byla 71,5g. Roztoky musely být smíseny v různém poměru, aby bylo dosaženo požadovaného pH. Pro přípravu pufru o pH 5.0 musely být roztoky smíseny v poměru 49 ml roztoku kyseliny citronové a 51 ml roztoku hydrogenfosforečnanu disodného pro přípravu 100 ml pufru. Pro přípravu 100 ml pufru o pH 6.0 bylo smíseno 37,4 ml roztoku kyseliny citronové a 62,6 ml hydrogenfosforečnanu disodného. Aby bylo dosaženo pH 7.0, bylo smíseno 19,0 ml roztoku kyseliny citronové a 81,0 ml roztoku hydrogenfosforečnanu disodného pro přípravu 100 ml. Hodnoty pH byly ověřeny pomocí pH metru. Hodnoty pH připravených pufrů byly 5.01, 6.00 a 6.97. Část takto připraveného fosfát-citrátového pufru o pH 6 a 7 byla naředěna destilovanou vodou a byly připraveny hypotonické pufrы. Část pufru o pH 6 byla naředěna v poměru 1:1 (tento pufr byl označen jako koncentrace  $c = 0,5$ ) a část v poměru 1:7 (koncentrace  $c = 0,125$ ). Část pufru o pH 7 byla také naředěna destilovanou vodou v různém poměru a to 1:1 pro přípravu koncentrace  $c = 0,5$ , 1:3 pro přípravu koncentrace  $c = 0,25$  a 1:7 pro přípravu koncentrace  $c = 0,125$ .

### 5.3.2 Příprava polymerních tělísek

Polymer byl roztaven na silikonové lázni a pomocí injekční stříkačky natažen do silikonové hadičky, kde jsme ho nechali ztuhnout. Poté byla tato hadička rozříznuta žiletkou a vznikl nám tak polymer ve formě dlouhých tyček. Z této tyčky se pak žiletkou odřezávaly kousky cca 3mm dlouhé, které se pak pomocí žiletky a smirkového papíru upravovaly tak, aby měly hmotnost  $0,150g \pm 5\%$ . Tato tělíska pak

byla použita pro stanovení stupně bobtnání a stupně eroze. Všechny tři polymery byly zpracovány stejně.

### 5.3.3 Stanovení stupně bobtnání a eroze

Připravená polymerní tělíska byla vložena do scintilačních lahvíček a každá lahvíčka byla zvážena na analytických vahách. Všechny lahvíčky byly označeny štítky, kde byl uveden den odebrání vzorků, označení paralelního stanovení A nebo B a hodnota pH, případně i koncentrace pufru. Tělíska v lahvíčkách byla zalita pufrům a takto připravené vzorky byly umístěny do biologického termostatu. Teplota zde byla nastavena na 37°C. Vzorky byly z termostatu odebrány v určitých intervalech - 1, 3, 7, 14 a 21 dní. Aby mohla být zjištěna hmotnost nabobtnalého tělíska, musel být z lahvíčky vylit pufr a tělísko a stěny lahvíčky byly osušeny pomocí vlasového vysoušeče a také pomocí vatové tyčinky. Vysoušení muselo probíhat opatrně, aby nedošlo k vysušení polymeru, ale pouze k tomu, aby se odstranila veškerá kapalina z lahvíčky. Takto vysušené lahvíčky s nabobtnalým polymerním tělískem byly zváženy na analytických vahách. Poté byly lahvíčky vloženy do vakuové sušárny, kde jsme nechaly vzorky sušit minimálně 1 týden. Lahvíčky s vysušeným polymerním tělískem byly znovu zváženy na analytických vahách. Ze zjištěných hmotností byly nakonec vypočítány stupně eroze a stupně bobtnání.

U polymerů PLGA a 3T byl ke stanovení použit fosfát-citrátový pufr o pH 5, 6 a 7. U polymerů 3M byly použity také pufrы o pH 5, 6 a 7 a navíc pufr o pH 6 o koncentraci  $c = 0,5$  a  $c = 0,125$  a pufr o pH 7 o koncentraci  $c = 0,5$ ,  $c = 0,25$  a  $c = 0,125$ . Pufrы byly v průběhu experimentu zhruba dvakrát týdně vyměňovány.

## 5.4 Vzorce pro výpočet

### Stupeň bobtnání

$$B = \left( \frac{m_b - m_s}{m_s} \right) \times 100$$

B – stupeň bobtnání (%)

$m_b$  – hmotnost nabobtnalého tělíska (g)

$m_s$  – hmotnost vysušeného tělíska (g)

### Stupeň eroze

$$E = \left[ 1 - \left( \frac{m_0 - m_s}{m_0} \right) \right] \times 100$$

E – stupeň eroze (%)

$m_0$  – počáteční hmotnost polymerního tělíska (g)

$m_s$  – hmotnost vysušeného tělíska (g)

## 6. Výsledky – tabulky a grafy

### 1) Chování PLGA tělísek o hmotnosti 150 mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne - tabulky

**Tabulka 1:** Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 5	13,6960	13,7012	0,1552	13,6987	0,1527	1,6372	101,8000
3/A/pH 5	13,8260	13,8351	0,1591	13,8285	0,1525	4,3279	101,6667
7/A/pH 5	13,9015	14,0094	0,2579	13,8971	0,1456	77,1291	97,0667
14/A/pH 5	13,8598	13,7824	0,0726	13,7659	0,0561	29,4118	37,4000
21/A/pH 5	13,7666	13,6323	0,0157	13,6280	0,0114	37,7193	7,6000

**Tabulka 2:** Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 5	13,9415	13,9492	0,1577	13,9455	0,1540	2,4026	102,6667
3/B/pH 5	13,9636	13,9730	0,1594	13,9653	0,1517	5,0758	101,1333
7/B/pH 5	13,7314	13,8248	0,2434	13,7271	0,1457	67,0556	97,1333
14/B/pH 5	13,7606	13,6857	0,0751	13,6632	0,0526	42,7757	35,0667
21/B/pH 5	13,9382	13,8052	0,0170	13,8007	0,0125	36,0000	8,3333

**Tabulka 3:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	2,0199	102,2334
3	4,7019	101,4000
7	72,0924	97,1000
14	36,0938	36,2334
21	36,8597	7,9667

**Tabulka 4:** Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 6	14,0825	14,0897	0,1572	14,0867	0,1542	1,9455	102,8000
3/A/pH 6	13,7022	13,7250	0,1728	13,7049	0,1527	13,1631	101,8000
7/A/pH 6	13,7071	13,9076	0,3505	13,6902	0,1331	163,3358	88,7333
14/A/pH 6	13,9216	13,7774	0,0058	13,7742	0,0026	123,0769	1,7333
21/A/pH 6	14,7841	14,6427	0,0086	14,6407	0,0066	30,3030	4,4000

**Tabulka 5:** Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 6	13,8832	13,8940	0,1608	13,8870	0,1538	4,5514	102,5333
3/B/pH 6	14,1068	14,1282	0,1714	14,1109	0,1541	11,2265	102,7333
7/B/pH 6	13,9418	14,1413	0,3495	13,9262	0,1344	160,0446	89,6000
14/B/pH 6	13,7114	13,5741	0,0127	13,5727	0,0113	12,3894	7,5333
21/B/pH 6	13,5262	13,3809	0,0047	13,3792	0,0030	56,6667	2,0000

**Tabulka 6:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	3,2485	102,6667
3	12,1948	102,2667
7	161,6902	89,1667
14	67,7332	4,6333
21	43,4849	3,2000

**Tabulka 7:** Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 7	13,9486	13,9718	0,1732	13,9532	0,1546	12,0310	103,0667
3/A/pH 7	13,7948	13,8339	0,1891	13,7978	0,1530	23,5948	102,0000
7/A/pH 7	13,7627	13,9729	0,3602	13,7254	0,1127	219,6096	75,1333
14/A/pH 7	13,8925	13,8582	0,1157	13,7612	0,0187	518,7166	12,4667
21/A/pH 7	14,7599	14,6449	0,0350	14,6216	0,0117	199,1453	7,8000

**Tabulka 8:** Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 7	14,7950	14,8236	0,1786	14,8014	0,1564	14,1944	104,2667
3/B/pH 7	13,5081	13,5448	0,1867	13,5130	0,1549	20,5294	103,2667
7/B/pH 7	13,8449	14,0500	0,3551	13,8102	0,1153	207,9792	76,8667
14/B/pH 7	14,0198	13,9962	0,1264	13,8948	0,0250	405,6000	16,6667
21/B/pH 7	13,8755	13,7921	0,0666	13,7434	0,0179	272,0670	11,9333

**Tabulka 9:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	13,1127	103,6667
3	22,0621	102,6334
7	213,7944	76,0000
14	462,1583	14,5667
21	235,6062	9,8667



**2) Chování 3T tělísek o hmotnosti 150 mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne – tabulky**

**Tabulka 10:** Stupeň bobtnání a eroze 3T o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/A/pH 5	13,9629	13,9696	0,1567	13,9661	0,1532	2,2846	102,1333
3/A/pH 5	13,9063	13,9152	0,1589	13,9076	0,1513	5,0231	100,8667
7/A/pH 5	15,0107	15,0436	0,1829	15,0060	0,1453	25,8775	96,8667
14/A/pH 5	13,7991	13,7998	0,1507	13,7395	0,0904	66,7035	60,2667
21/A/pH 5	13,6708	13,5868	0,0660	13,5775	0,0567	16,4021	37,8000

**Tabulka 11:** Stupeň bobtnání a eroze 3T o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/B/pH 5	14,7860	14,7934	0,1574	14,7903	0,1543	2,0091	102,8667
3/B/pH 5	13,9016	13,9103	0,1587	13,9033	0,1517	4,6144	101,1333
7/B/pH 5	15,0418	15,0738	0,1820	15,0406	0,1488	22,3118	99,2000
14/B/pH 5	13,4225	13,4289	0,1564	13,3568	0,0843	85,5279	56,2000
21/B/pH 5	15,4894	15,4000	0,0606	15,3918	0,0524	15,6489	34,9333

**Tabulka 12:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3T o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	2,1469	102,5000
3	4,8188	101,0000
7	24,0947	98,0334
14	76,1157	58,2334
21	16,0255	36,3667

**Tabulka 13:** Stupeň bobtnání a eroze 3T o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/A/pH 6	15,5353	15,5426	0,1573	15,5394	0,1541	2,0766	102,7333
3/A/pH 6	13,8122	13,8244	0,1622	13,8111	0,1489	8,9322	99,2667
7/A/pH 6	14,9379	14,9934	0,2055	14,9248	0,1369	50,1096	91,2667
14/A/pH 6	13,9064	14,0408	0,2844	13,8607	0,1043	172,6750	69,5333
21/A/pH 6	13,9123	13,8919	0,1296	13,8336	0,0713	81,7672	47,5333

**Tabulka 14:** Stupeň bobtnání a eroze 3T o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/B/pH 6	13,4053	13,4145	0,1592	13,4119	0,1566	1,6603	104,4000
3/B/pH 6	13,4835	13,4983	0,1648	13,4855	0,1520	8,4211	101,3333
7/B/pH 6	13,7578	13,8102	0,2024	13,7486	0,1408	43,7500	93,8667
14/B/pH 6	14,0117	14,0927	0,2310	13,9587	0,0970	138,1443	64,6667
21/B/pH 6	13,9212	13,8801	0,1089	13,8422	0,0710	53,3803	47,3333

**Tabulka 15:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3T o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	1,8685	103,5667
3	8,6767	96,5667
7	46,9298	92,5667
14	155,4097	67,1000
21	67,5738	47,4333

**Tabulka 16:** Stupeň bobtnání a eroze 3T o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 7	13,8463	13,8582	0,1619	13,8506	0,1543	4,9255	102,8667
3/A/pH 7	13,7640	13,7859	0,1719	13,7641	0,1501	14,5237	100,0667
7/A/pH 7	13,9215	14,0165	0,2450	13,9083	0,1368	79,0936	91,2000
14/A/pH 7	13,4954	13,5744	0,2290	13,4448	0,0994	130,3823	66,2667
21/A/pH 7	13,8262	13,7627	0,0865	13,7422	0,0660	31,0606	44,0000

**Tabulka 17:** Stupeň bobtnání a eroze 3T o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 7	13,7122	13,7230	0,1608	13,7166	0,1544	4,1451	102,9333
3/B/pH 7	14,0636	14,0888	0,1752	14,0663	0,1527	14,7348	101,8000
7/B/pH 7	14,3277	14,4012	0,2235	14,3202	0,1425	56,8421	95,0000
14/B/pH 7	13,9770	14,1612	0,3342	13,9373	0,1103	202,9918	73,5333
21/B/pH 7	15,3292	15,2845	0,1053	15,2518	0,0726	45,0413	48,4000

**Tabulka 18:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3T o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	4,5353	102,9000
3	14,6293	100,9334
7	67,9679	93,1000
14	166,6871	69,9000
21	38,0510	46,2000

**3) Chování 3M tělísek o hmotnosti 150 mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne - tabulky**

**Tabulka 19:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/A/pH 5	13,7948	13,8078	0,1630	13,7969	0,1521	7,1663	101,4000
3/A/pH 5	13,7663	13,7940	0,1777	13,7593	0,1430	24,2657	95,3333
7/A/pH 5	13,4656	13,4333	0,1177	13,4148	0,0992	18,6492	66,1333
14/A/pH 5	13,9354	13,8323	0,0469	13,8265	0,0411	14,1119	27,4000
21/A/pH 5	13,7653	13,6408	0,0255	13,6376	0,0223	14,3498	14,8667

**Tabulka 20:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/B/pH 5	13,5465	13,5614	0,1649	13,5505	0,1540	7,0779	102,6667
3/B/pH 5	13,8349	13,8610	0,1761	13,8268	0,1419	24,1015	94,6000
7/B/pH 5	13,6966	13,6712	0,1246	13,6510	0,1044	19,3487	69,6000
14/B/pH 5	13,5407	13,4352	0,0445	13,4238	0,0331	34,4411	22,0667
21/B/pH 5	13,7872	13,6664	0,0292	13,6631	0,0259	12,7413	17,2667

**Tabulka 21:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	7,1221	102,0334
3	24,1836	94,9667
7	18,9990	67,8667
14	24,2765	24,7334
21	13,5456	16,0667

**Tabulka 22:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 6	13,7625	13,8037	0,1912	13,7602	0,1477	29,4516	98,4667
3/A/pH 6	13,6683	13,7802	0,2619	13,6528	0,1345	94,7212	89,6667
7/A/pH 6	13,8675	13,9297	0,2122	13,8133	0,0958	121,5031	63,8667
14/A/pH 6	14,0355	13,9511	0,0656	13,9321	0,0466	40,7725	31,0667
21/A/pH 6	14,0090	13,9064	0,0474	13,8918	0,0328	44,5122	21,8667

**Tabulka 23:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{Lt}$	$m_{Lb}$	$m_b$	$m_{Ls}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 6	13,7655	13,8057	0,1902	13,7620	0,1465	29,8294	97,6667
3/B/pH 6	13,4522	13,5661	0,2639	13,4388	0,1366	93,1918	91,0667
7/B/pH 6	13,9566	14,0314	0,2248	13,9054	0,0988	127,5304	65,8667
14/B/pH 6	13,8239	13,7473	0,0734	13,7273	0,0534	37,4532	35,6000
21/B/pH 6	13,3974	13,2940	0,0466	13,2827	0,0353	32,0113	23,5333

**Tabulka 24:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	29,6405	98,0667
3	93,9565	90,3667
7	124,5168	64,8667
14	39,1129	33,3334
21	38,2618	22,7000

**Tabulka 25:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/A/pH 7	14,0538	14,0853	0,1815	14,0472	0,1434	26,5690	95,6000
3/A/pH 7	13,9820	14,0598	0,2278	13,9632	0,1312	73,6280	87,4667
7/A/pH 7	13,7965	13,8236	0,1771	13,7425	0,0960	84,4792	64,0000
14/A/pH 7	15,4487	15,3789	0,0802	15,3546	0,0559	43,4705	37,2667
21/A/pH 7	13,9525	13,8627	0,0602	13,8420	0,0395	52,4051	26,3333

**Tabulka 26:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/B/pH 7	14,7870	14,8146	0,1776	14,7822	0,1452	22,3140	96,8000
3/B/pH 7	14,0361	14,1120	0,2259	14,0162	0,1301	73,6357	86,7333
7/B/pH 7	13,8880	13,9216	0,1836	13,8391	0,1011	81,6024	67,4000
14/B/pH 7	13,9299	13,8664	0,0865	13,8379	0,0580	49,1379	38,6667
21/B/pH 7	13,6907	13,6006	0,0599	13,5726	0,0319	87,7743	21,2667

**Tabulka 27:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	24,4415	96,2000
3	73,6319	87,1000
7	83,0408	65,7000
14	46,3042	37,9667
21	70,0897	23,8000

**Tabulka 28:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,5$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{L_t}$	$m_{L_b}$	$m_b$	$m_{L_s}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 6 0,5	13,9248	13,9356	0,1608	13,9081	0,1333	20,6302	88,8667
3/A/pH 6 0,5	15,1497	15,1706	0,1709	15,1112	0,1115	53,2735	74,3333
7/A/pH 6 0,5	14,7688	14,7917	0,1729	14,7042	0,0854	102,4590	56,9333
14/A/pH 6 0,5	14,6067	14,5290	0,0723	14,5042	0,0475	52,2105	31,6667
21/A/pH 6 0,5	15,6363	15,5165	0,0302	15,5050	0,0187	61,4973	12,4667

**Tabulka 29:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,5$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{L_t}$	$m_{L_b}$	$m_b$	$m_{L_s}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 6 0,5	13,7469	13,7638	0,1669	13,7290	0,1321	26,3437	88,0667
3/B/pH 6 0,5	15,5568	15,5813	0,1745	15,5215	0,1147	52,1360	76,4667
7/B/pH 6 0,5	15,2671	15,2680	0,1509	15,2011	0,0840	79,6429	56,0000
14/B/pH 6 0,5	13,8880	13,7952	0,0572	13,7753	0,0373	53,3512	24,8667
21/B/pH 6 0,5	13,7384	13,6208	0,0324	13,6115	0,0231	40,2597	15,4000

**Tabulka 30:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,5$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	23,4870	88,4667
3	52,7048	75,4000
7	91,0510	56,4667
14	52,7809	28,2667
21	50,8785	13,9334

**Tabulka 31:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{L_t}$	$m_{L_b}$	$m_b$	$m_{L_s}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 6 0,125	14,1109	14,1429	0,1820	14,1074	0,1465	24,2321	97,6667
3/A/pH 6 0,125	13,3909	13,5156	0,2747	13,3781	0,1372	100,2187	91,4667
7/A/pH 6 0,125	14,5004	14,4579	0,1075	14,4430	0,0926	16,0907	61,7333
14/A/pH 6 0,125	14,5067	14,3936	0,0369	14,3897	0,0330	11,8182	22,0000
21/A/pH 6 0,125	15,7029	15,5746	0,0217	15,5684	0,0155	40,0000	10,3333

**Tabulka 32:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{L_t}$	$m_{L_b}$	$m_b$	$m_{L_s}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 6 0,125	15,6082	15,6364	0,1782	15,6050	0,1468	21,3896	97,8667
3/B/pH 6 0,125	14,5780	14,6615	0,2335	14,5670	0,1390	67,9856	92,6667
7/B/pH 6 0,125	15,5078	15,4704	0,1126	15,4518	0,0940	19,7872	62,6667
14/B/pH 6 0,125	13,9277	13,8229	0,0452	13,8179	0,0402	12,4378	26,8000
21/B/pH 6 0,125	14,3847	14,2480	0,0133	14,2459	0,0112	18,7500	7,4667

**Tabulka 33:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	22,8109	97,7667
3	84,1022	92,0667
7	17,9390	62,2000
14	12,1280	24,4000
21	29,3750	8,9000



**Tabulka 34:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci c = 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/A/pH 7 0,5	14,0164	14,0537	0,1873	13,9869	0,1205	55,4357	80,3333
3/A/pH 7 0,5	15,7014	15,8384	0,2870	15,6644	0,1130	153,9823	75,3333
7/A/pH 7 0,5	13,9645	13,9943	0,1798	13,9007	0,0862	108,5847	57,4667
14/A/pH 7 0,5	15,5940	15,5844	0,1404	15,5014	0,0574	144,5993	38,2667
21/A/pH 7 0,5	14,2541	14,2074	0,1033	14,1440	0,0399	158,8972	26,6000

**Tabulka 35:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg±5% vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci c = 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

	m <sub>Lt</sub>	m <sub>Lb</sub>	m <sub>b</sub>	m <sub>Ls</sub>	m <sub>s</sub>	B	E
1/B/pH 7 0,5	15,6190	15,6464	0,1774	15,5929	0,1239	43,1800	82,6000
3/B/pH 7 0,5	15,5135	15,6179	0,2544	15,4716	0,1081	135,3377	72,0667
7/B/pH 7 0,5	13,6757	13,7574	0,2317	13,6088	0,0831	178,8207	55,4000
14/B/pH 7 0,5	13,9779	13,9691	0,1412	13,8875	0,0596	136,9128	39,7333
21/B/pH 7 0,5	14,8375	14,7933	0,1058	14,7313	0,0438	141,5525	29,2000

**Tabulka 36:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci c = 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	49,3079	81,4667
3	144,6600	73,7000
7	143,7027	56,4334
14	140,7561	39,0000
21	150,2249	27,9000

**Tabulka 37:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,25$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{L,t}$	$m_{L,b}$	$m_b$	$m_{L,s}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 7 0,25	15,6056	15,5824	0,1268	15,5490	0,0934	35,7602	62,2667
3/A/pH 7 0,25	15,5751	15,4804	0,0553	15,4628	0,0377	46,6844	25,1333
7/A/pH 7 0,25	13,6519	13,5253	0,0234	13,5146	0,0127	84,2520	8,4667
14/A/pH 7 0,25	13,5012	13,4297	0,0785	13,3615	0,0103	662,1359	6,8667
21/A/pH 7 0,25	14,3836	14,2527	0,0191	14,2356	0,0020	855,0000	1,3333

**Tabulka 38:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,25$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{L,t}$	$m_{L,b}$	$m_b$	$m_{L,s}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 7 0,25	15,6178	15,5956	0,1278	15,5613	0,0935	36,6845	62,3333
3/B/pH 7 0,25	15,5935	15,5050	0,0615	15,4806	0,0371	65,7682	24,7333
7/B/pH 7 0,25	13,8600	13,7304	0,0204	13,7171	0,0071	187,3239	4,7333
14/B/pH 7 0,25	15,5185	15,4355	0,0670	15,3757	0,0072	830,5556	4,8000
21/B/pH 7 0,25	13,9541	13,8272	0,0231	13,8066	0,0025	824,0000	1,6667

**Tabulka 39:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,25$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

Dny	B	E
1	36,2224	62,3000
3	56,2263	24,9333
7	135,7880	6,6000
14	746,3458	5,8334
21	839,5000	1,5000

**Tabulka 40:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

	$m_{L_t}$	$m_{L_b}$	$m_b$	$m_{L_s}$	$m_s$	B	E
1/A/pH 7 0,125	15,6502	15,7004	0,2002	15,6340	0,1338	49,6263	89,2000
3/A/pH 7 0,125	15,4448	15,5506	0,2558	15,4107	0,1159	120,7075	77,2667
7/A/pH 7 0,125	13,8511	13,8360	0,1349	13,7843	0,0832	62,1394	55,4667
14/A/pH 7 0,125	15,2505	15,1424	0,0419	15,1231	0,0226	85,3982	15,0667
21/A/pH 7 0,125	14,9658	14,8377	0,0219	14,8291	0,0133	64,6617	8,8667

**Tabulka 41:** Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

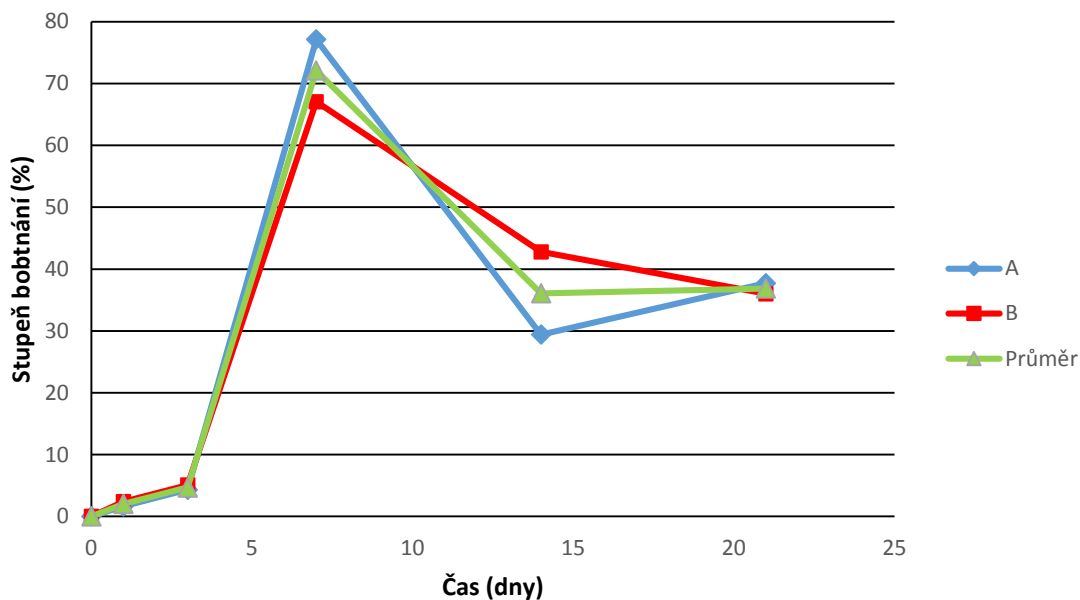
	$m_{L_t}$	$m_{L_b}$	$m_b$	$m_{L_s}$	$m_s$	B	E
1/B/pH 7 0,125	15,6045	15,6481	0,1936	15,5887	0,1342	44,2623	89,4667
3/B/pH 7 0,125	15,6157	15,7158	0,2501	15,5826	0,1169	113,9435	77,9333
7/B/pH 7 0,125	13,7015	13,6753	0,1238	13,6308	0,0793	56,1160	52,8667
14/B/pH 7 0,125	15,6649	15,5566	0,0417	15,5410	0,0261	59,7701	17,4000
21/B/pH 7 0,125	14,9008	14,7670	0,0162	14,7586	0,0078	107,6923	5,2000

**Tabulka 42:** Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti  $150 \text{ mg} \pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

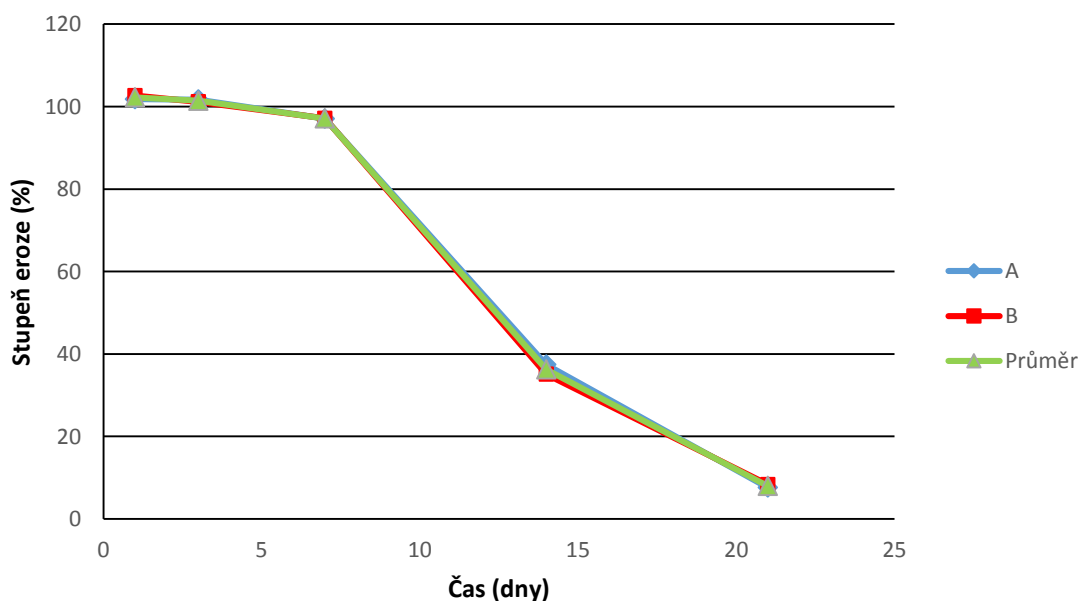
Dny	B	E
1	46,9443	89,3334
3	117,3255	77,6000
7	59,1277	54,1667
14	72,5842	16,2334
21	86,1770	7,0334

1) Chování PLGA tělísek o hmotnosti 150 mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne – obrázky

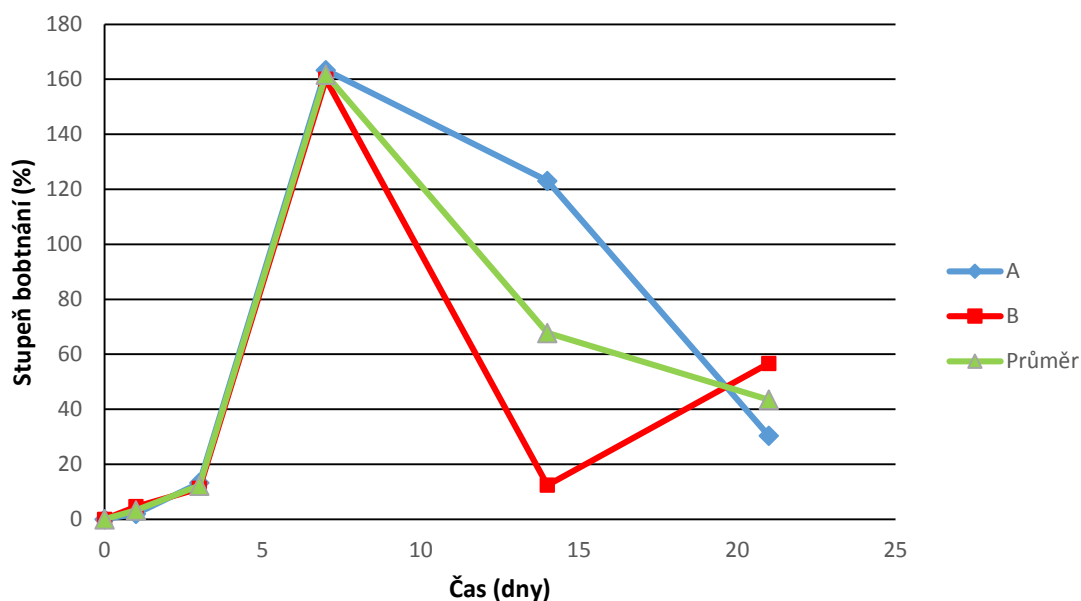
**Obr. 1:** Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.



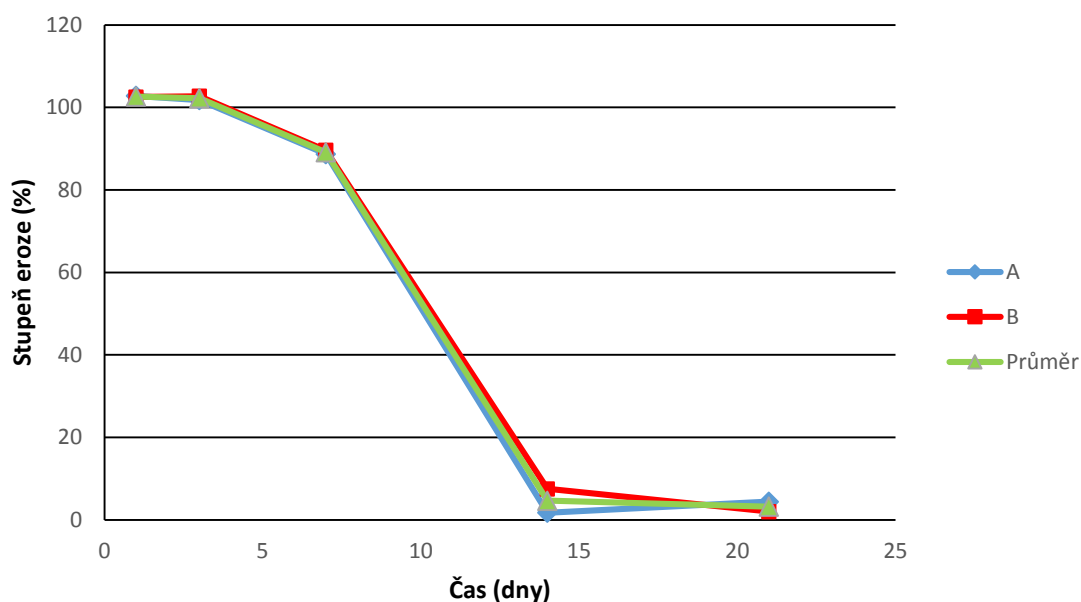
**Obr. 2:** Stupeň eroze PLGA o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.



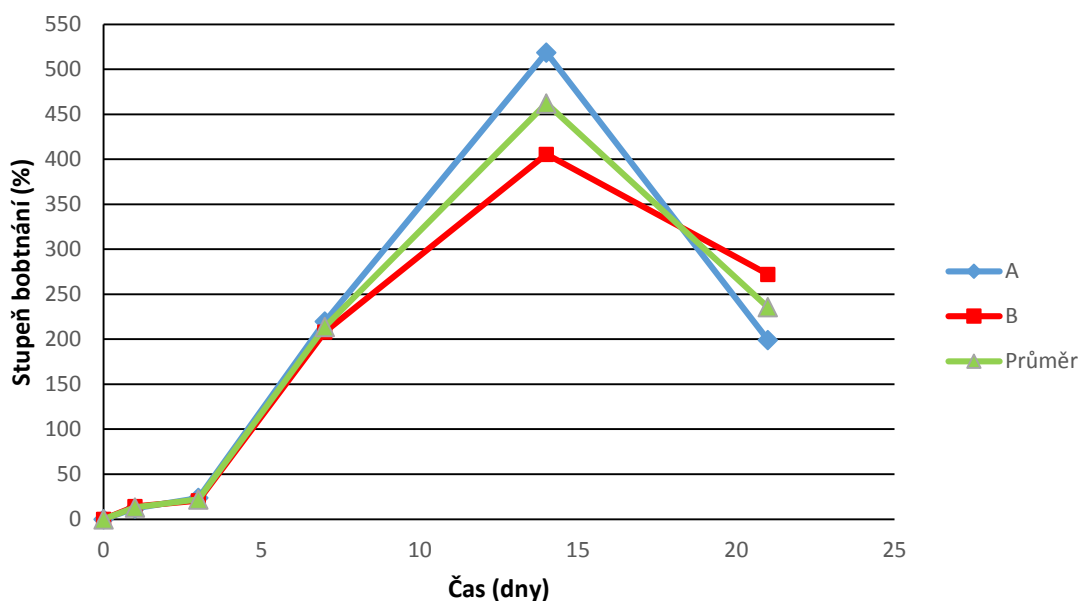
**Obr. 3:** Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



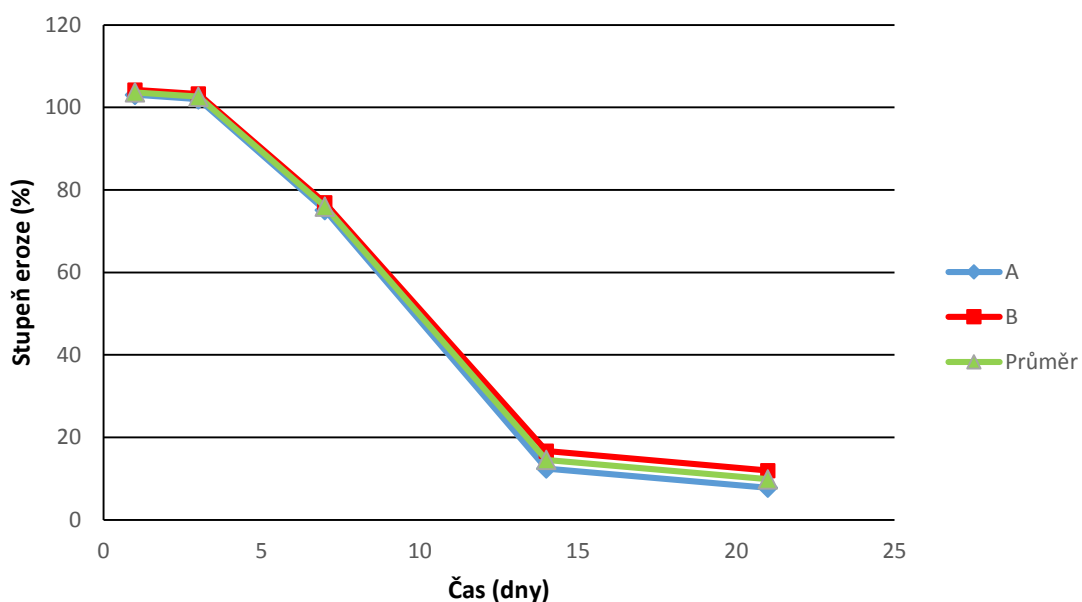
**Obr. 4:** Stupeň eroze PLGA o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



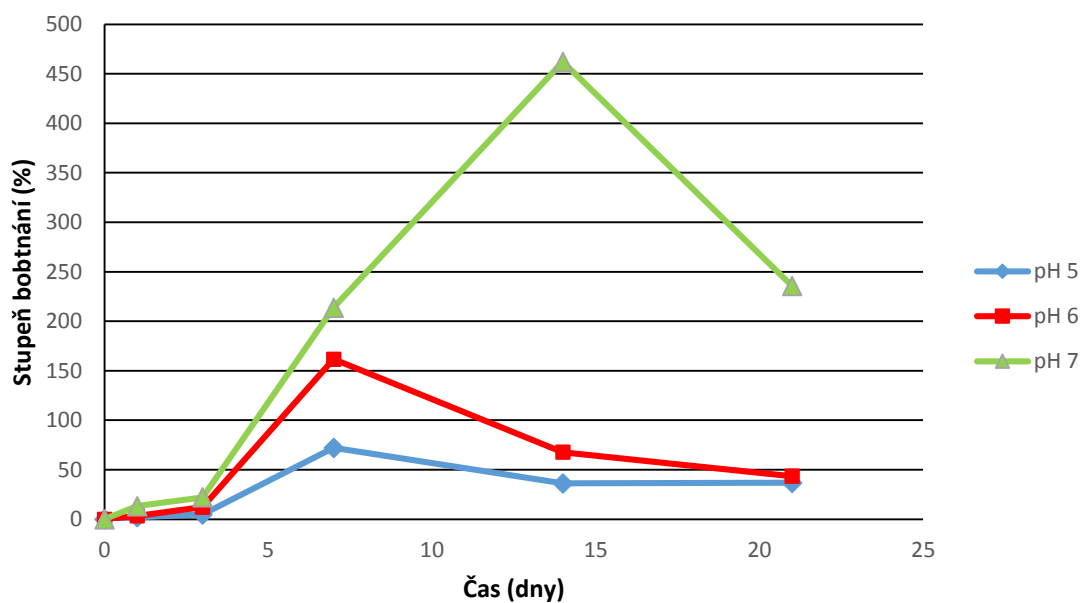
**Obr. 5:** Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



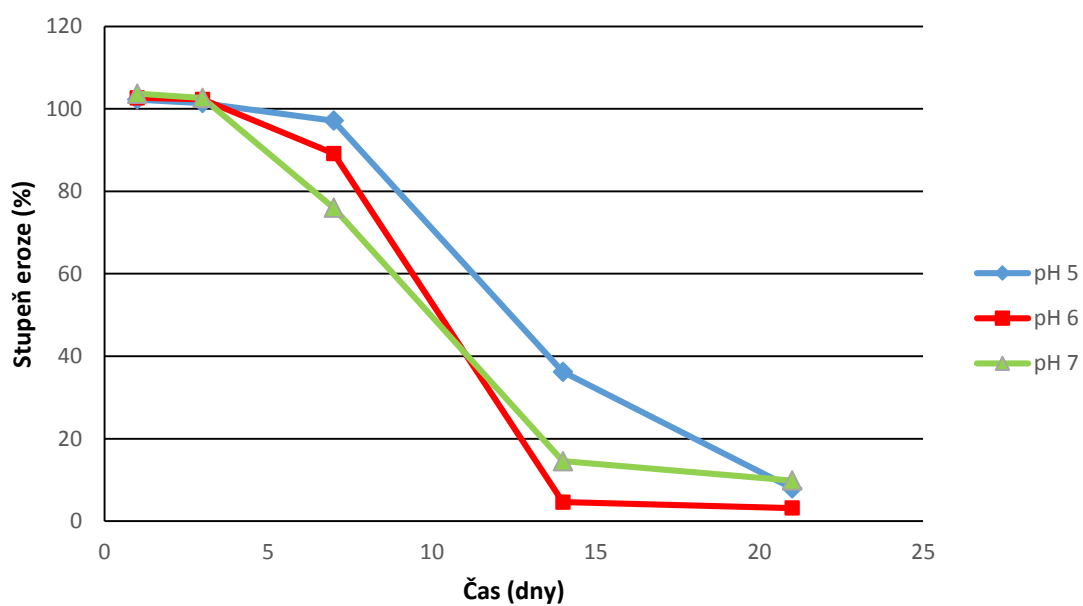
**Obr. 6:** Stupeň eroze PLGA o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



**Obr. 7:** Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání PLGA v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH.

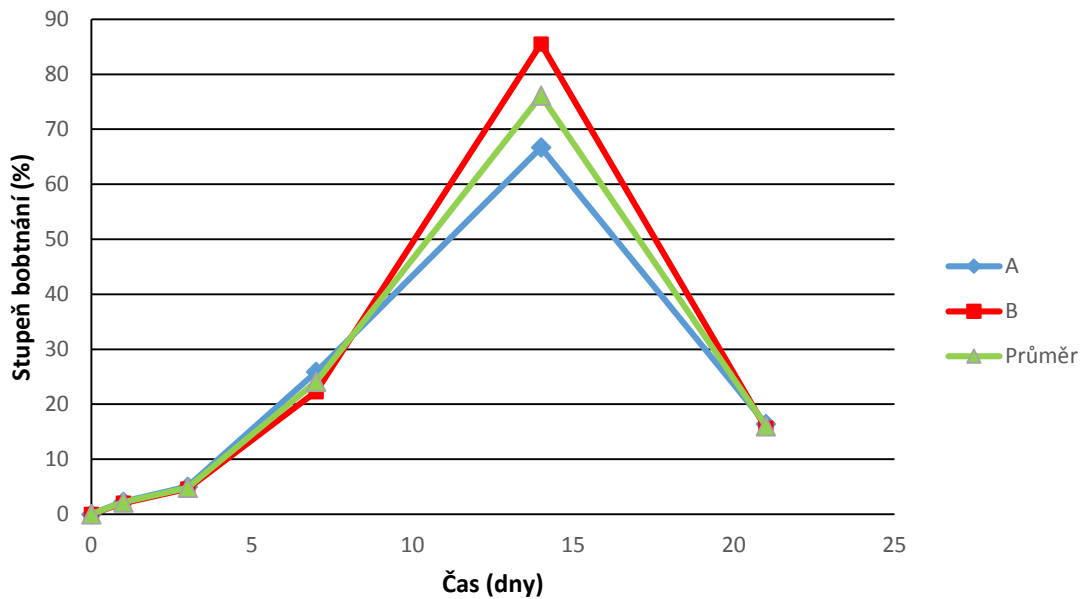


**Obr. 8:** Porovnání průměrných hodnot stupně eroze PLGA v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH.

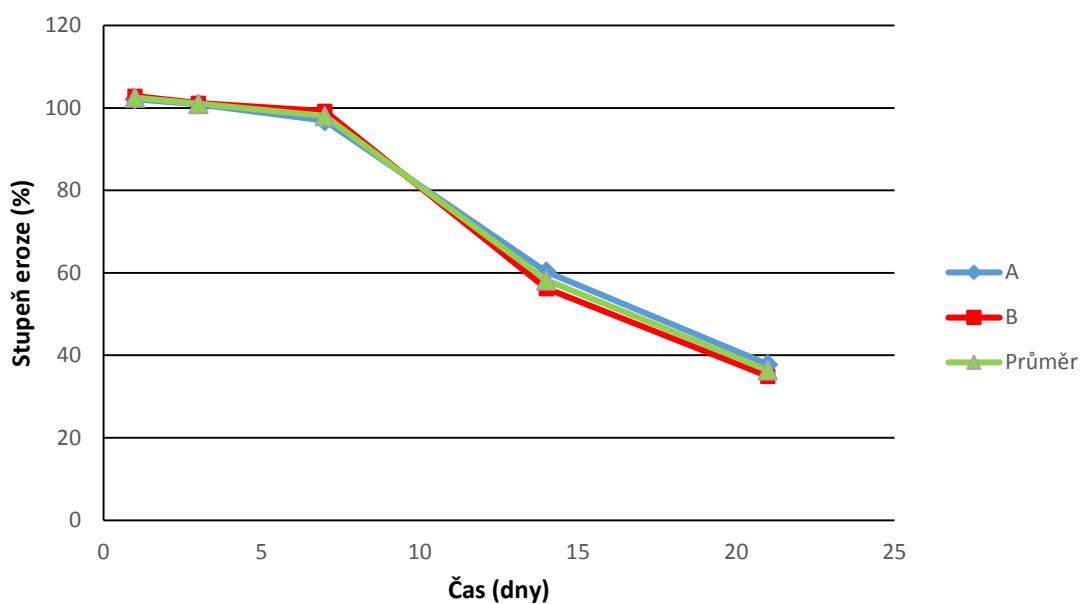


2) Chování 3T tělísek o hmotnosti 150mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne – obrázky

**Obr. 9:** Stupeň bobtnání 3T o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

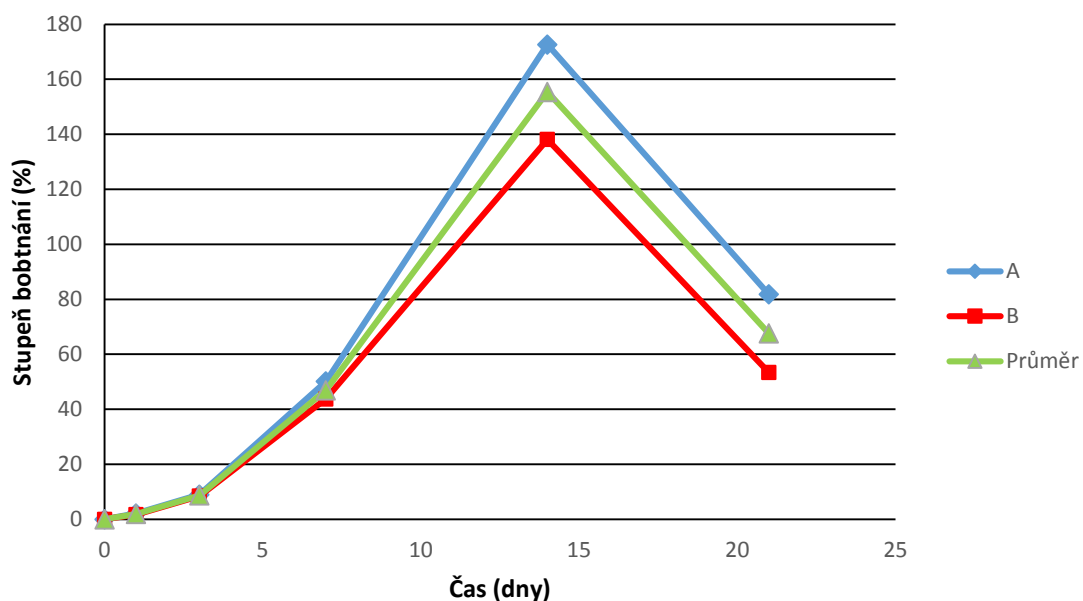


**Obr. 10:** Stupeň eroze 3T o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.

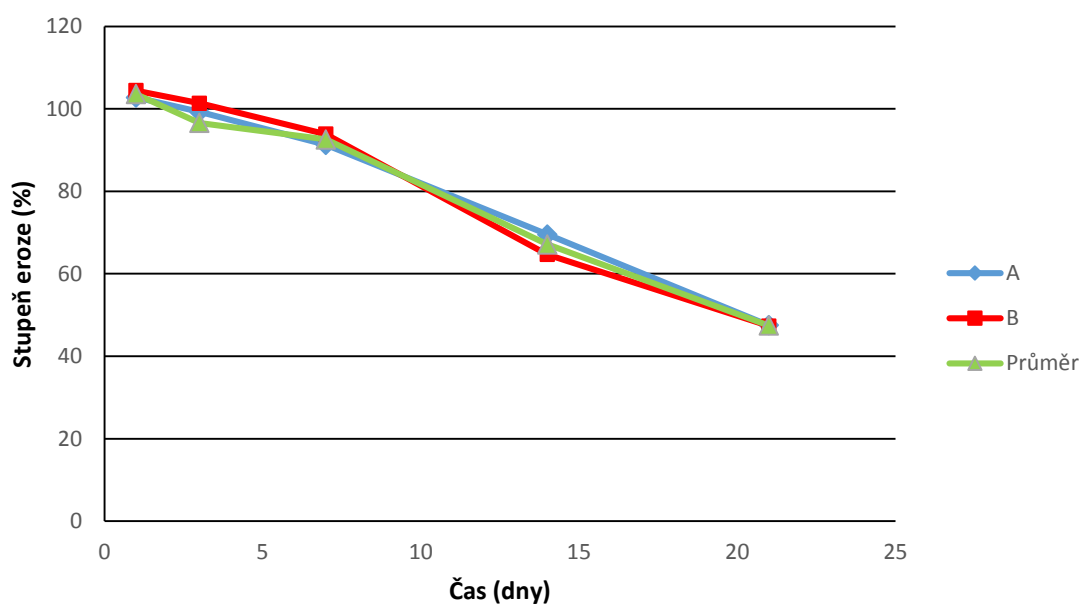




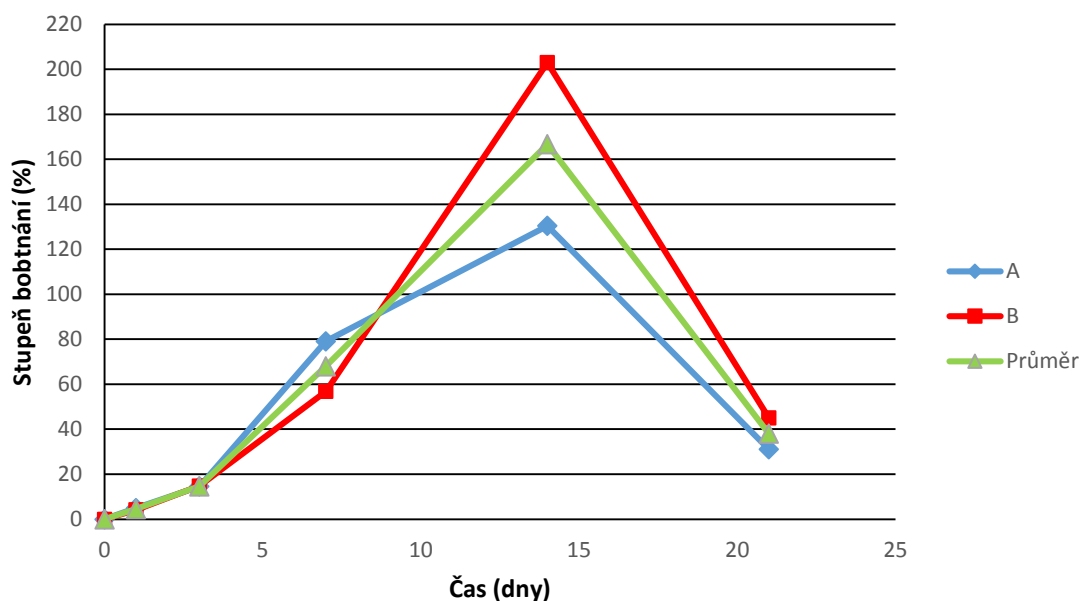
**Obr. 11:** Stupeň bobtnání 3T o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citratového pufru pH 6 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



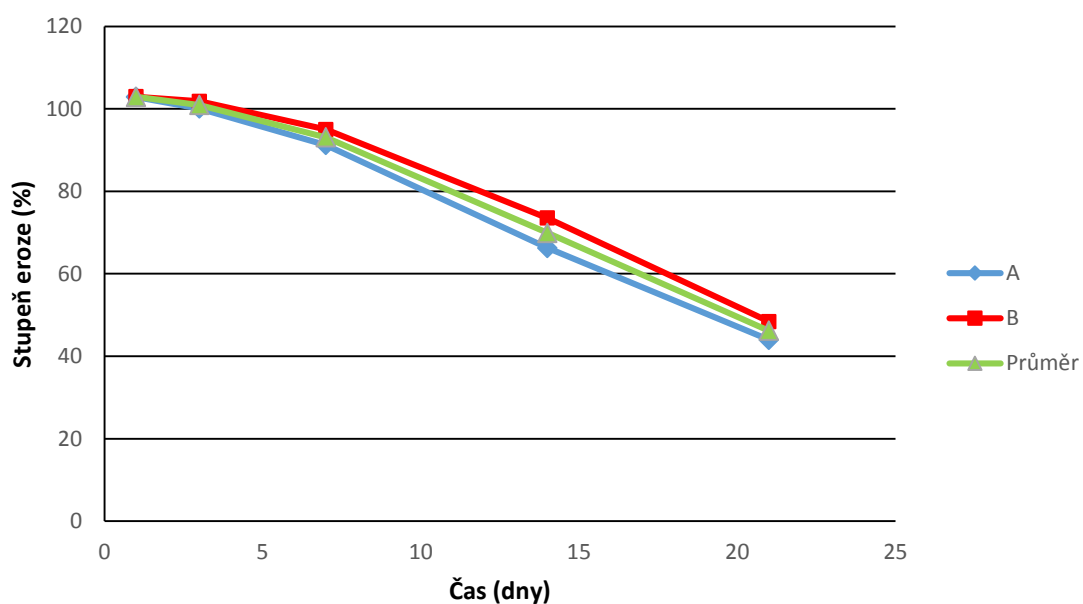
**Obr. 12:** Stupeň eroze 3T o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citratového pufru pH 6 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



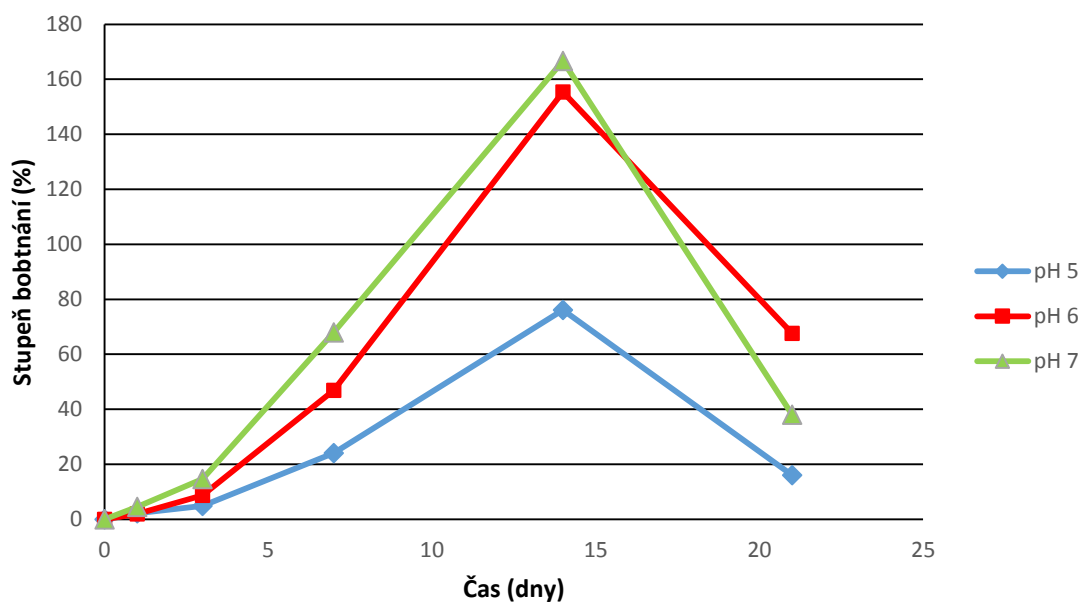
**Obr. 13:** Stupeň bobtnání 3T o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



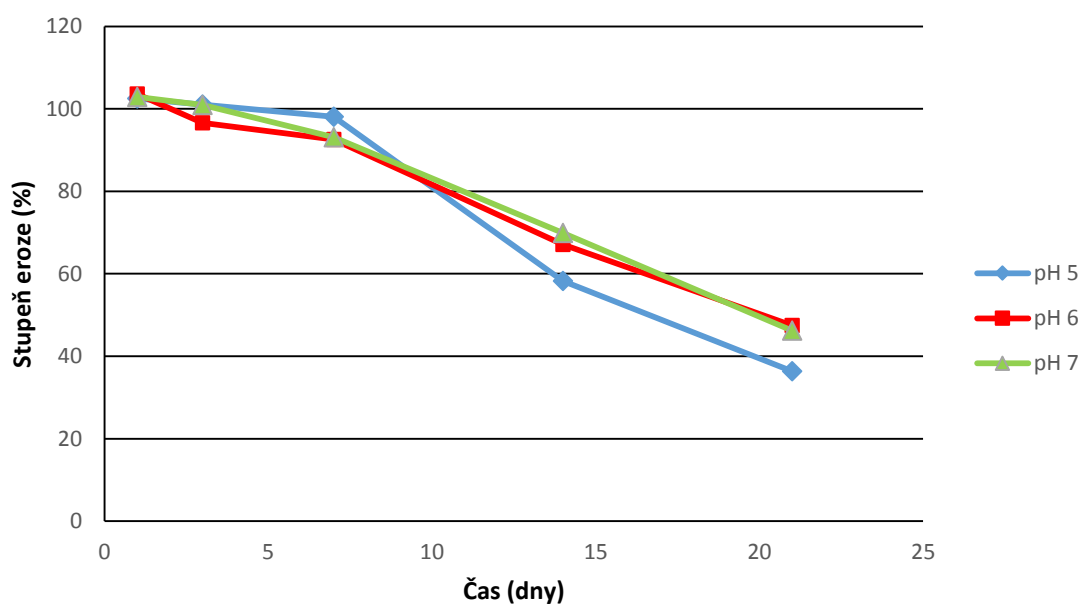
**Obr. 14:** Stupeň eroze 3T o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



**Obr. 15:** Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání 3T v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH.

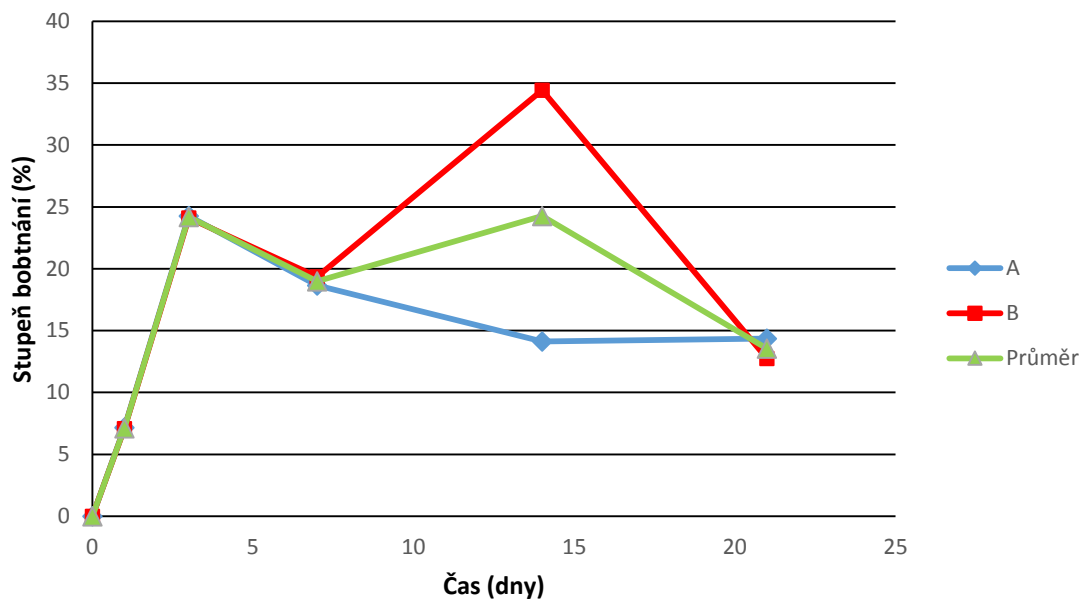


**Obr. 16:** Porovnání průměrných hodnot stupně eroze 3T v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH.

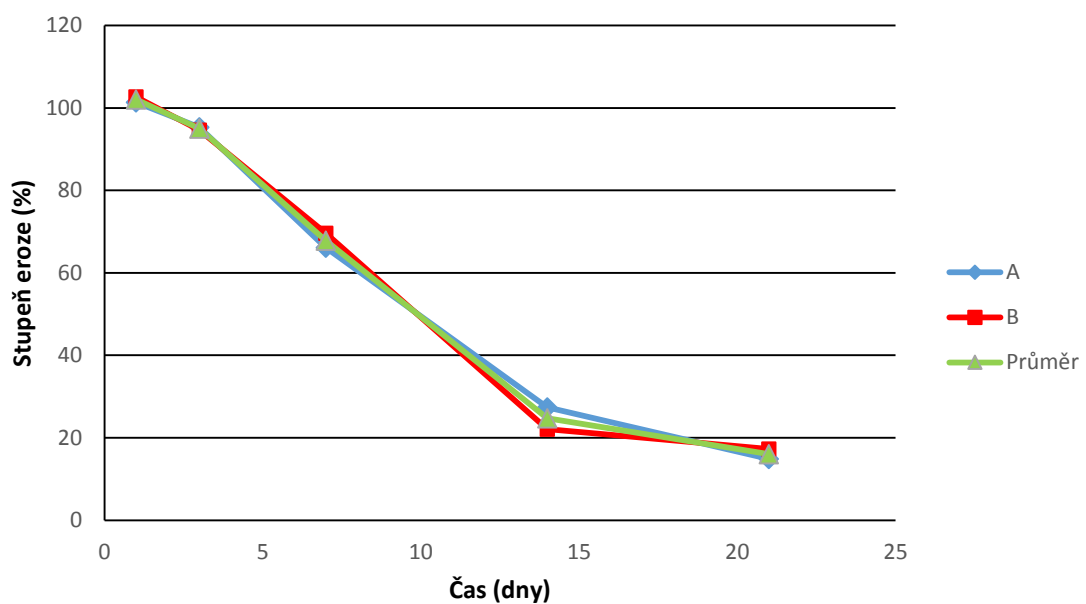


3) Chování 3M tělísek o hmotnosti 150mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne – obrázky

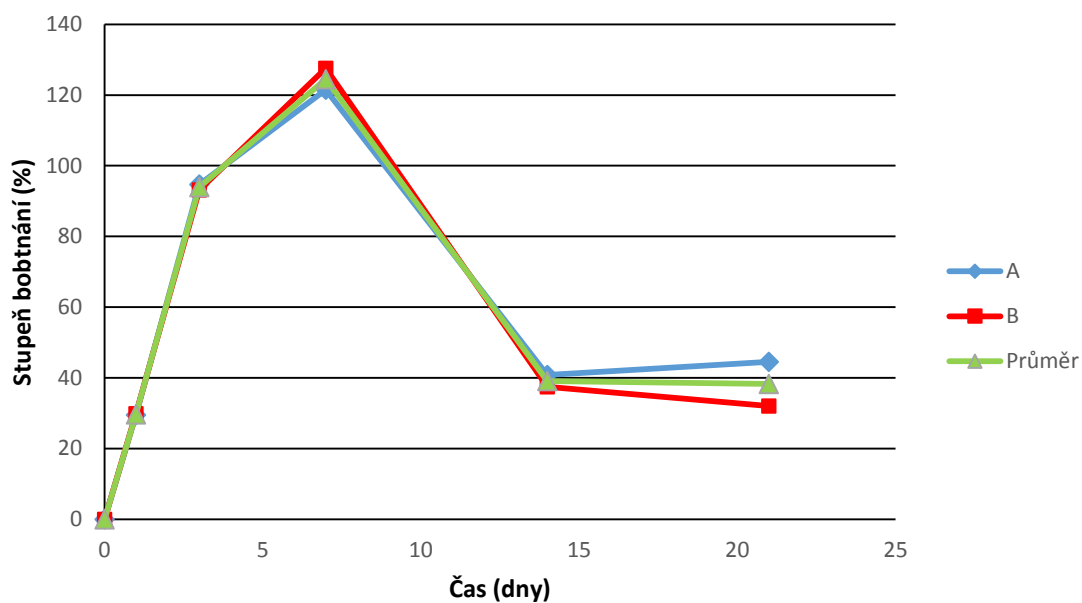
**Obr. 17:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.



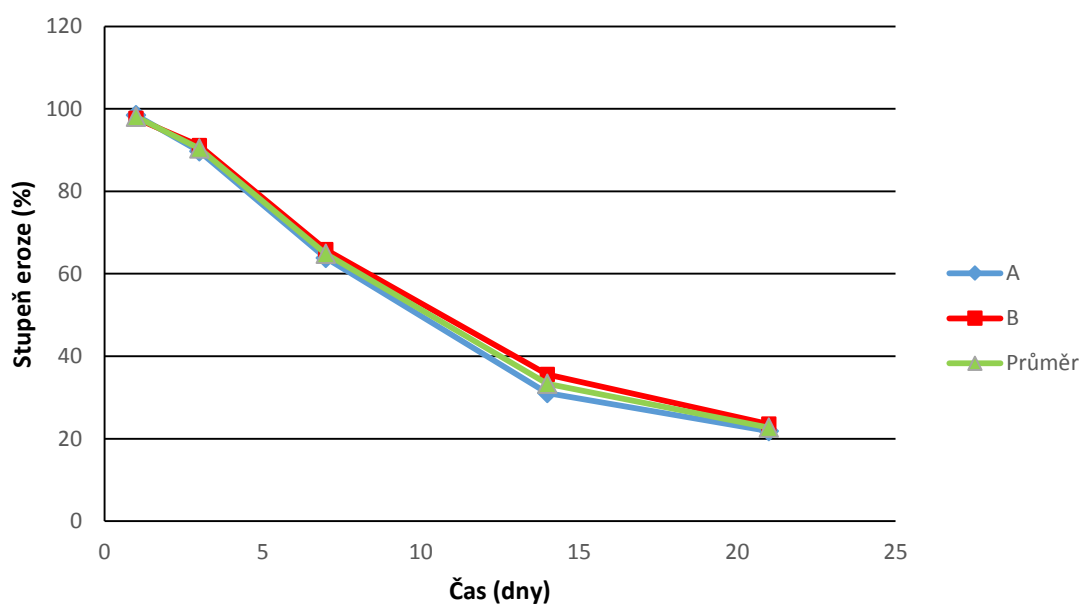
**Obr. 18:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti 150mg±5% vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne.



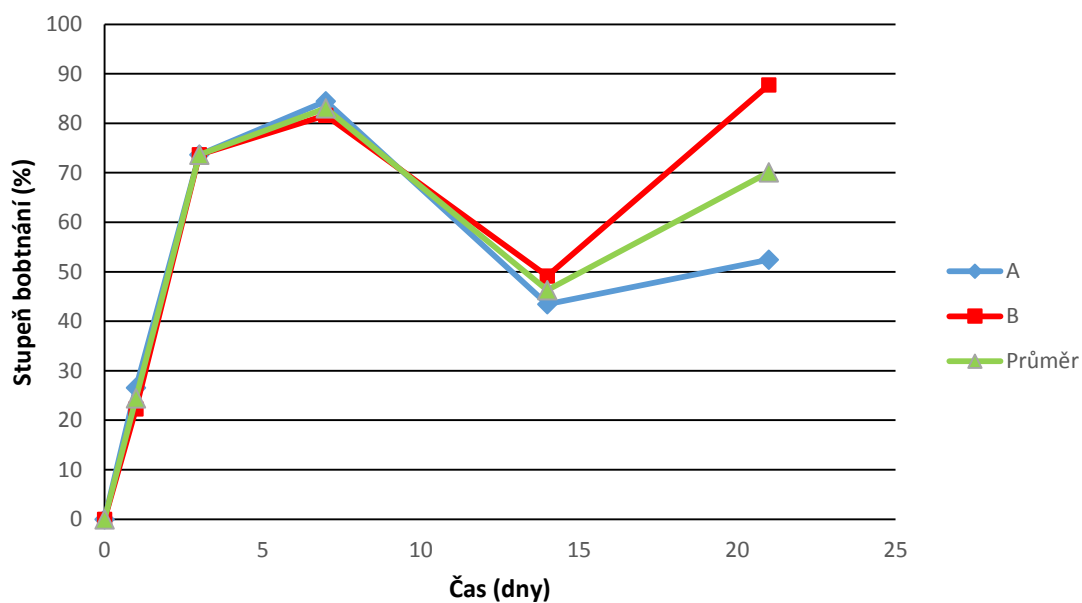
**Obr. 19:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



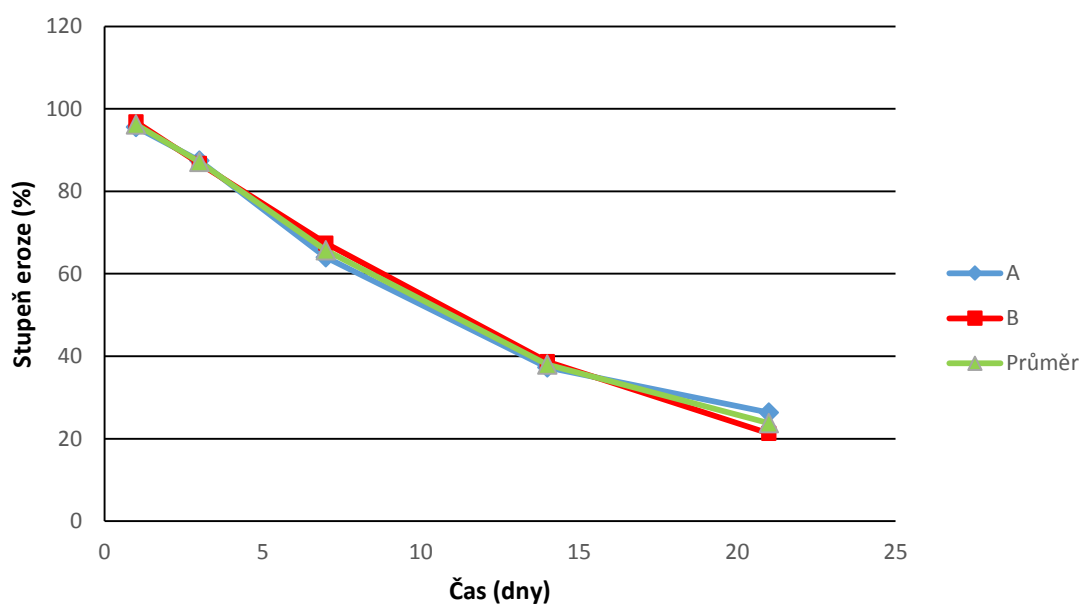
**Obr. 20:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



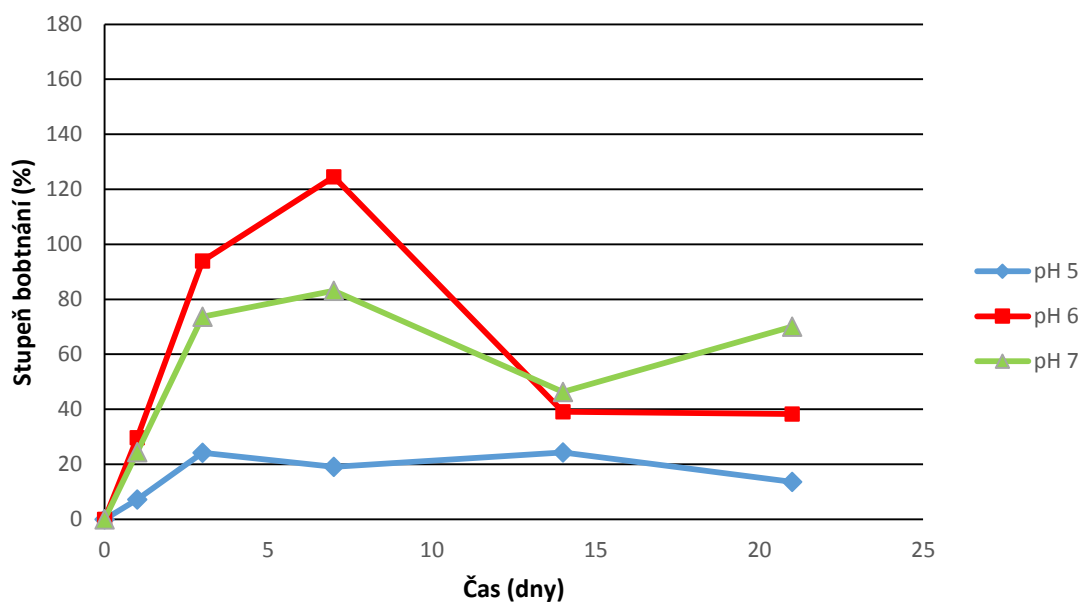
**Obr. 21:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



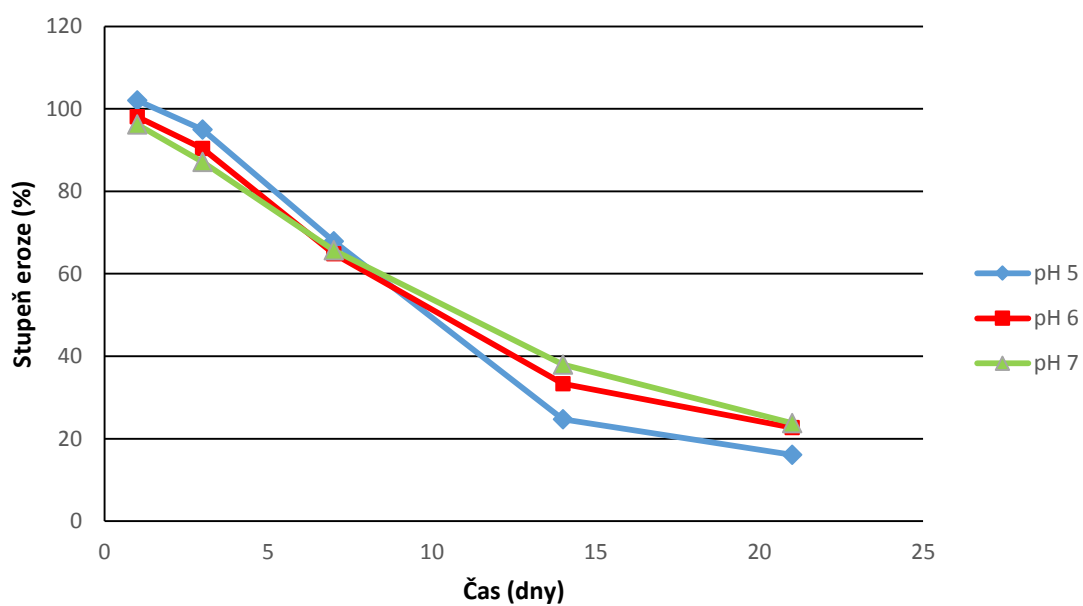
**Obr. 22:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



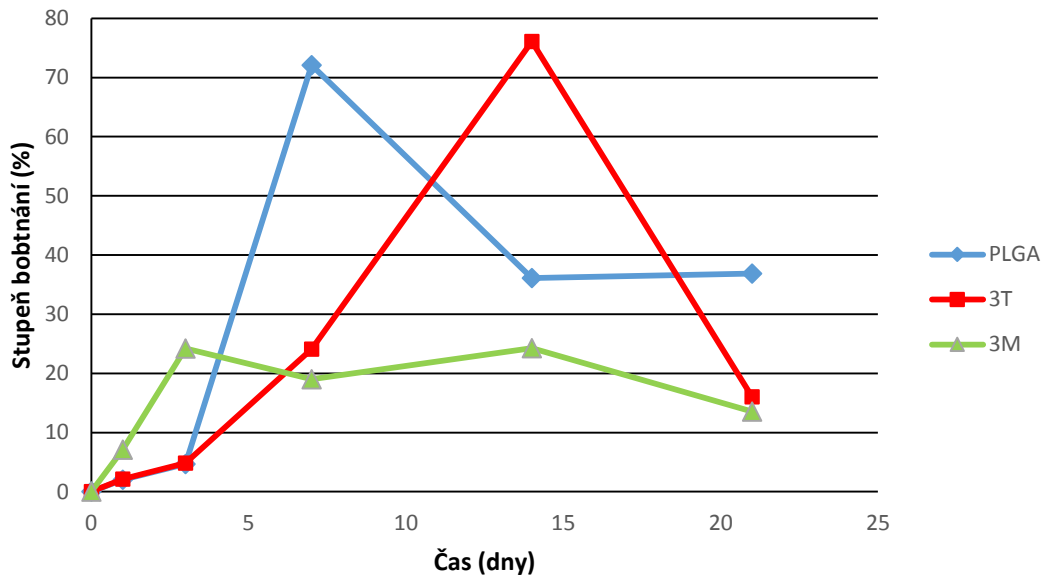
**Obr. 23:** Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání 3M v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH.



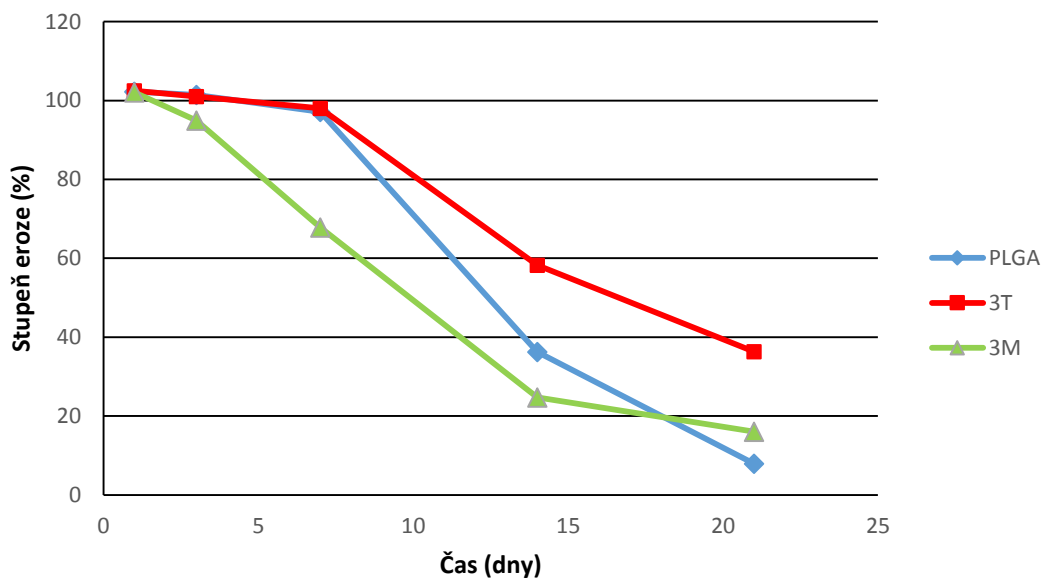
**Obr. 24:** Porovnání průměrných hodnot stupně eroze 3M v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH.



**Obr. 25:** Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání jednotlivých polymerů (PLGA, 3T a 3M) v prostředí fosfát-citrátového pufru o pH 5.

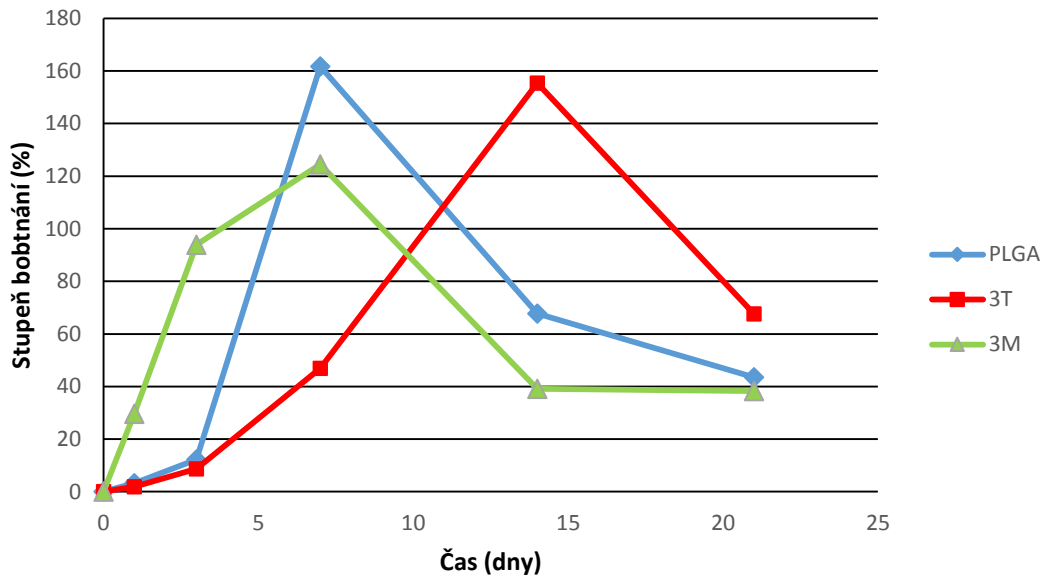


**Obr. 26:** Porovnání průměrných hodnot stupně eroze jednotlivých polymerů (PLGA, 3T a 3M) v prostředí fosfát-citrátového pufru o pH 5.

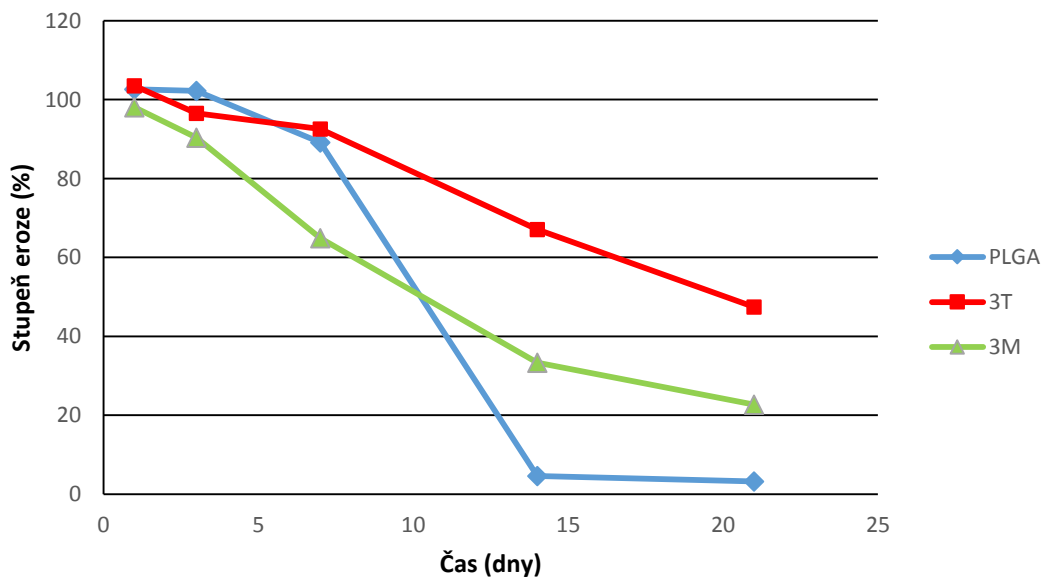




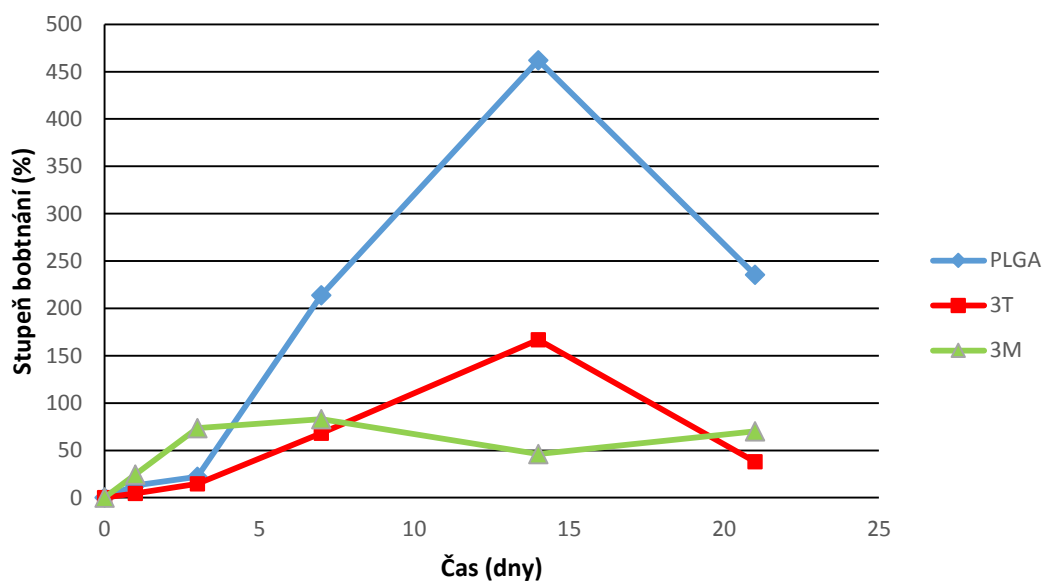
**Obr. 27:** Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání jednotlivých polymerů (PLGA, 3T a 3M) v prostředí fosfát-citrátového pufru o pH 6.



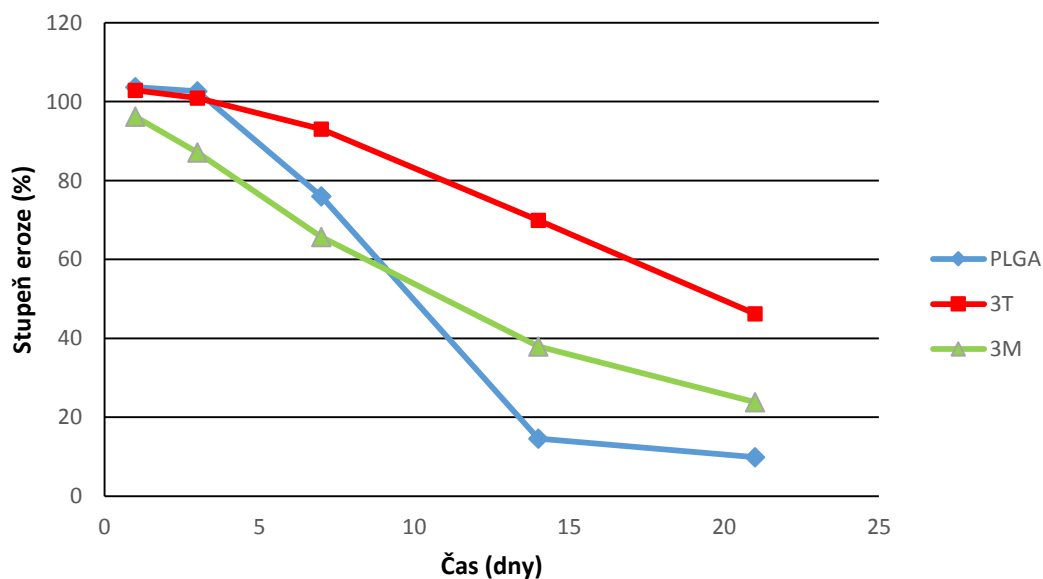
**Obr. 28:** Porovnání průměrných hodnot stupně eroze jednotlivých polymerů (PLGA, 3T a 3M) v prostředí fosfát-citrátového pufru o pH 6.



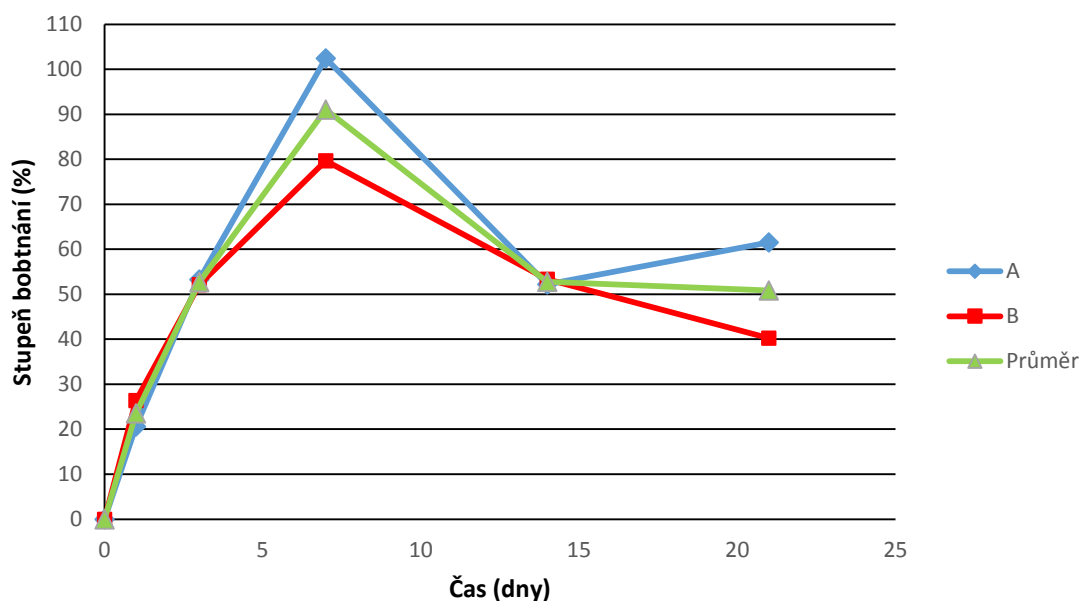
**Obr. 29:** Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání jednotlivých polymerů (PLGA, 3T a 3M) v prostředí fosfát-citrátového pufru o pH 7.



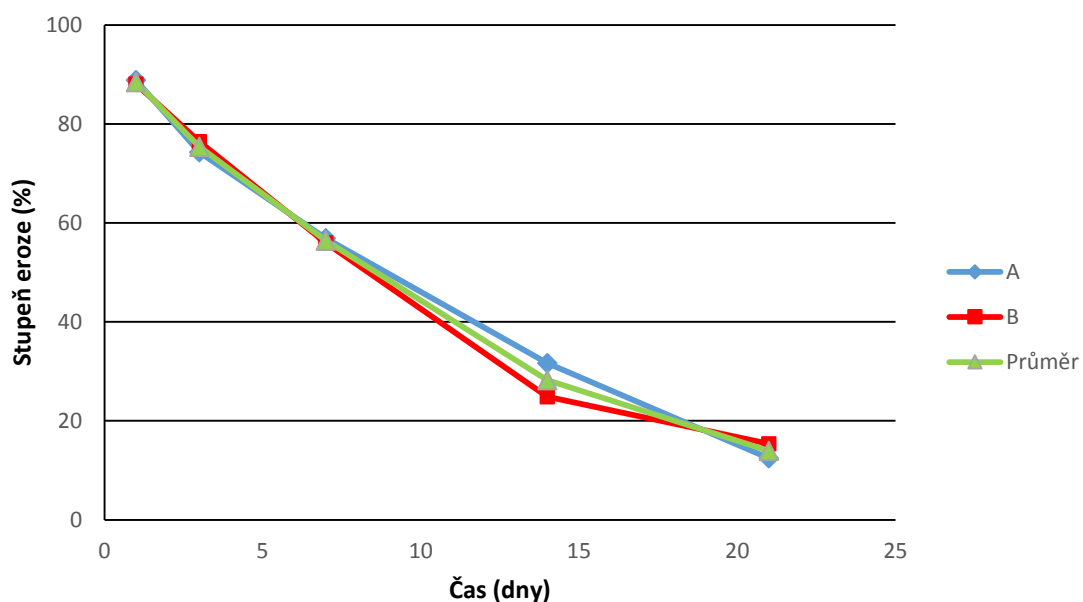
**Obr. 30:** Porovnání průměrných hodnot stupně eroze jednotlivých polymerů (PLGA, 3T a 3M) v prostředí fosfát-citrátového pufru o pH 7.



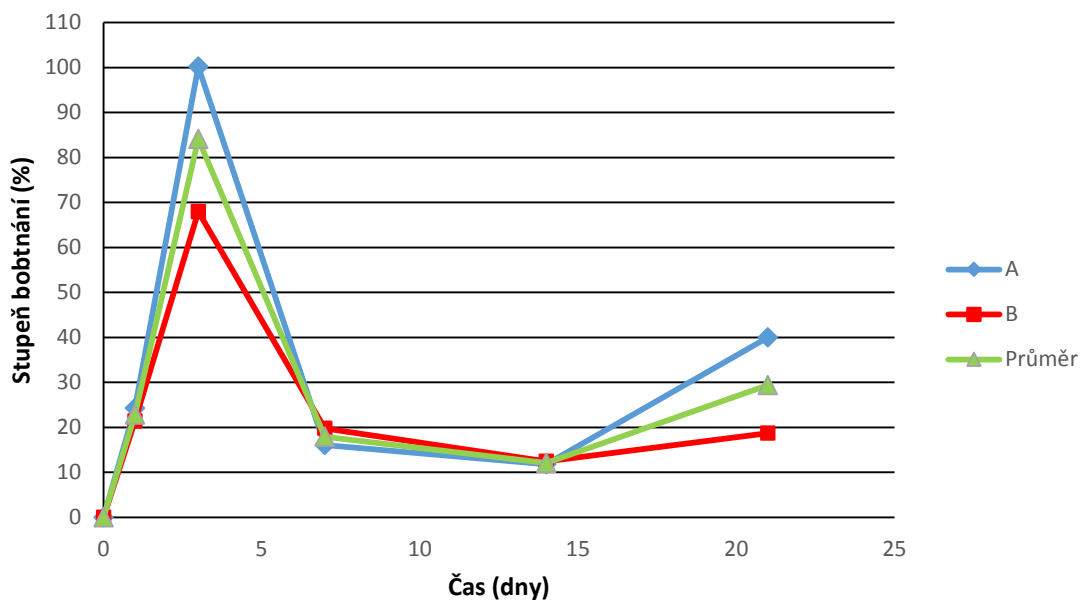
**Obr. 31:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,5$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



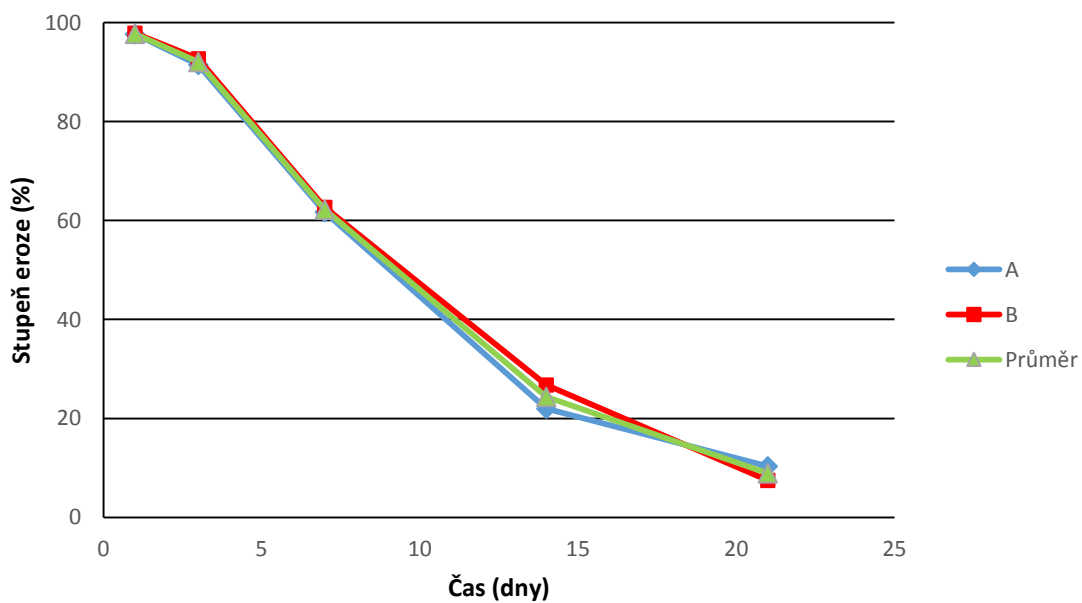
**Obr. 32:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,5$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



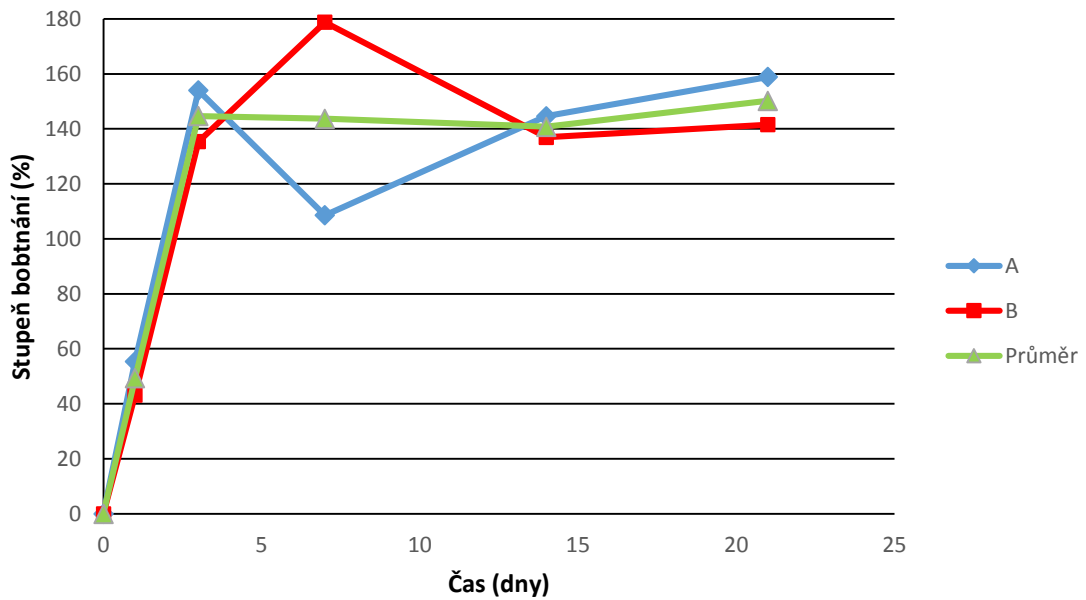
**Obr. 33:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



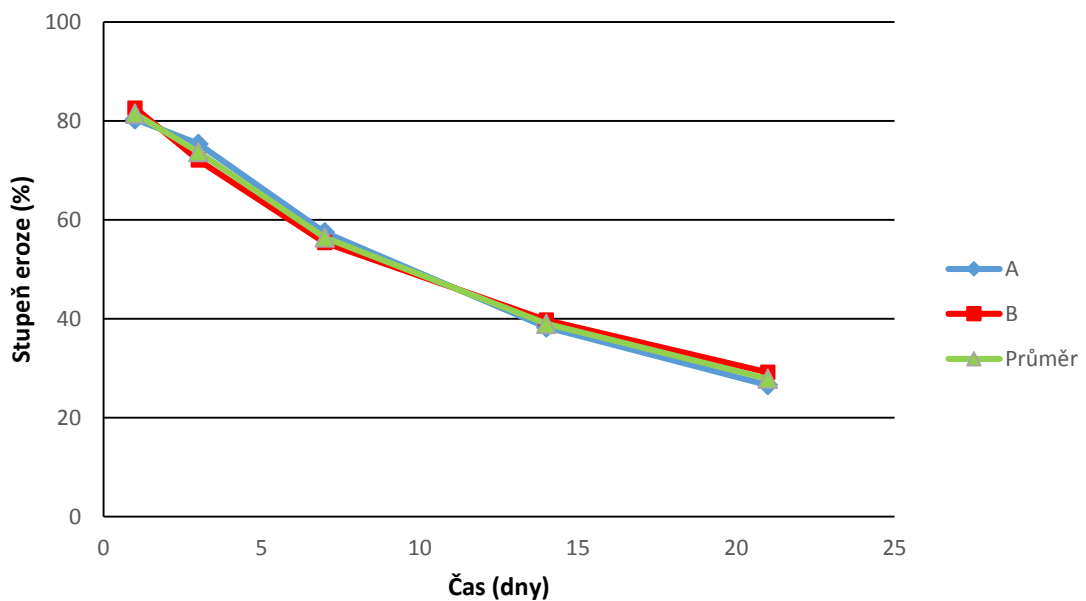
**Obr. 34:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 6 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



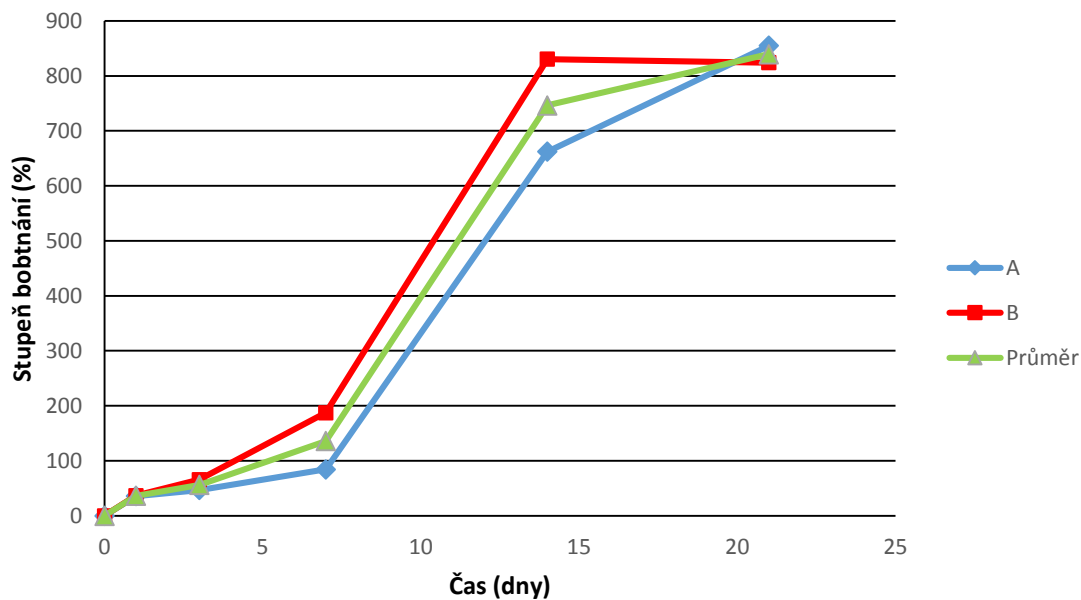
**Obr. 35:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,5$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



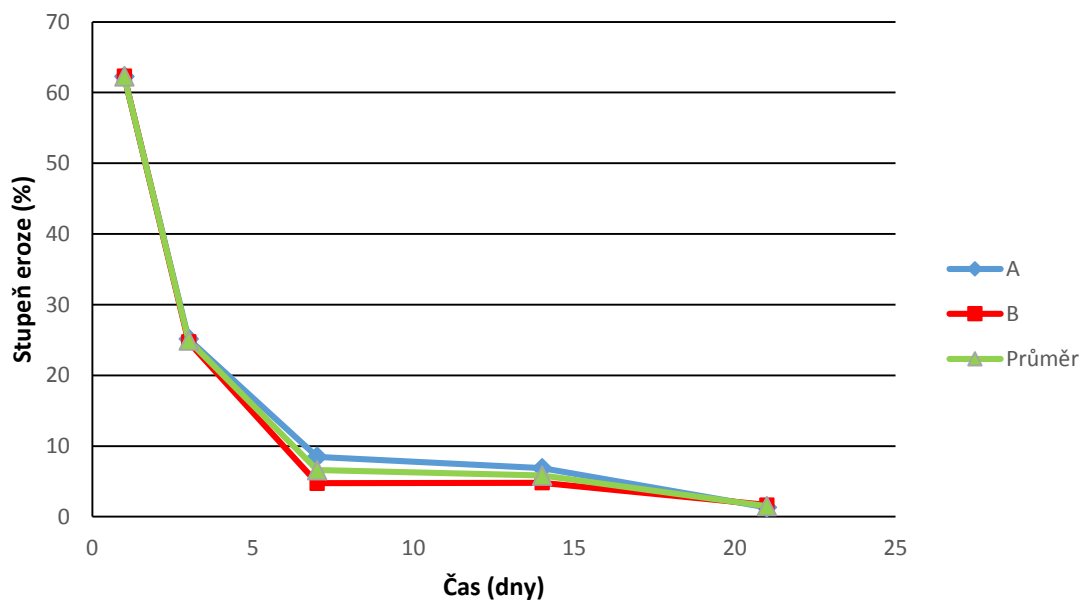
**Obr. 36:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,5$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



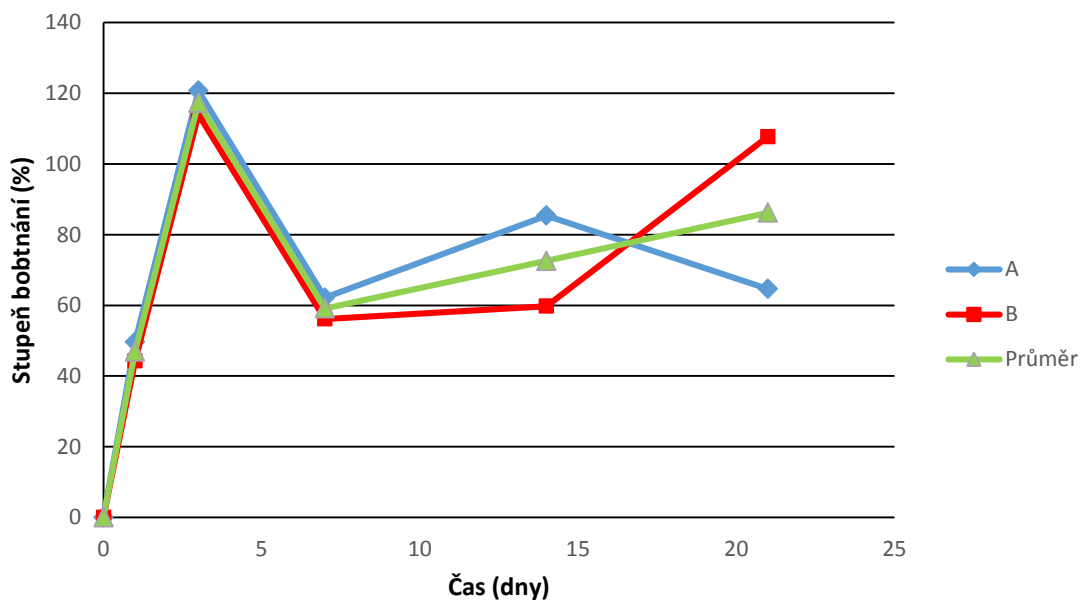
**Obr. 37:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,25$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



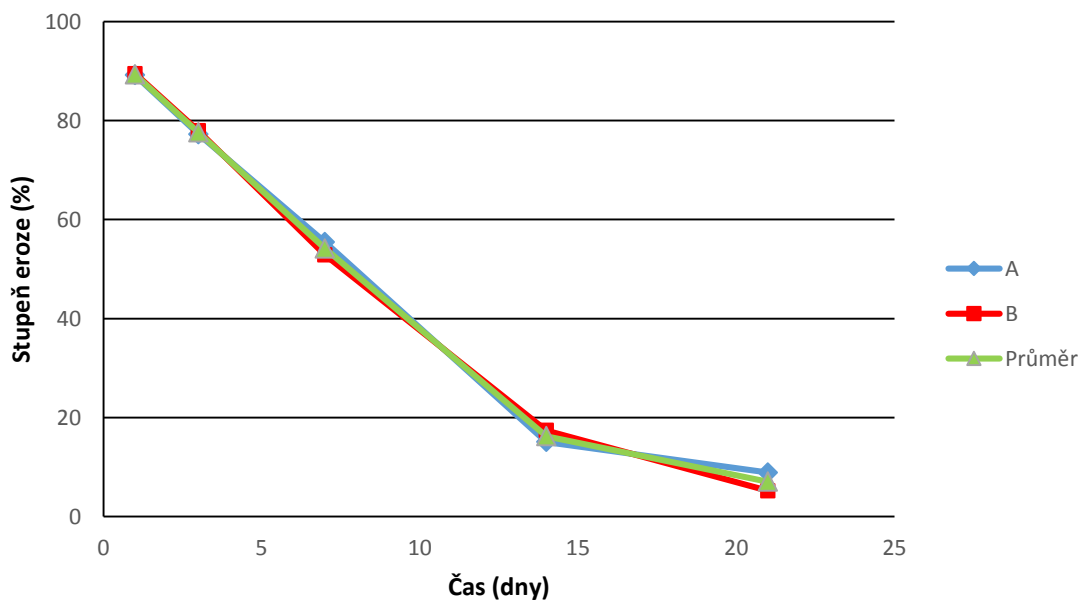
**Obr. 38:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,25$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



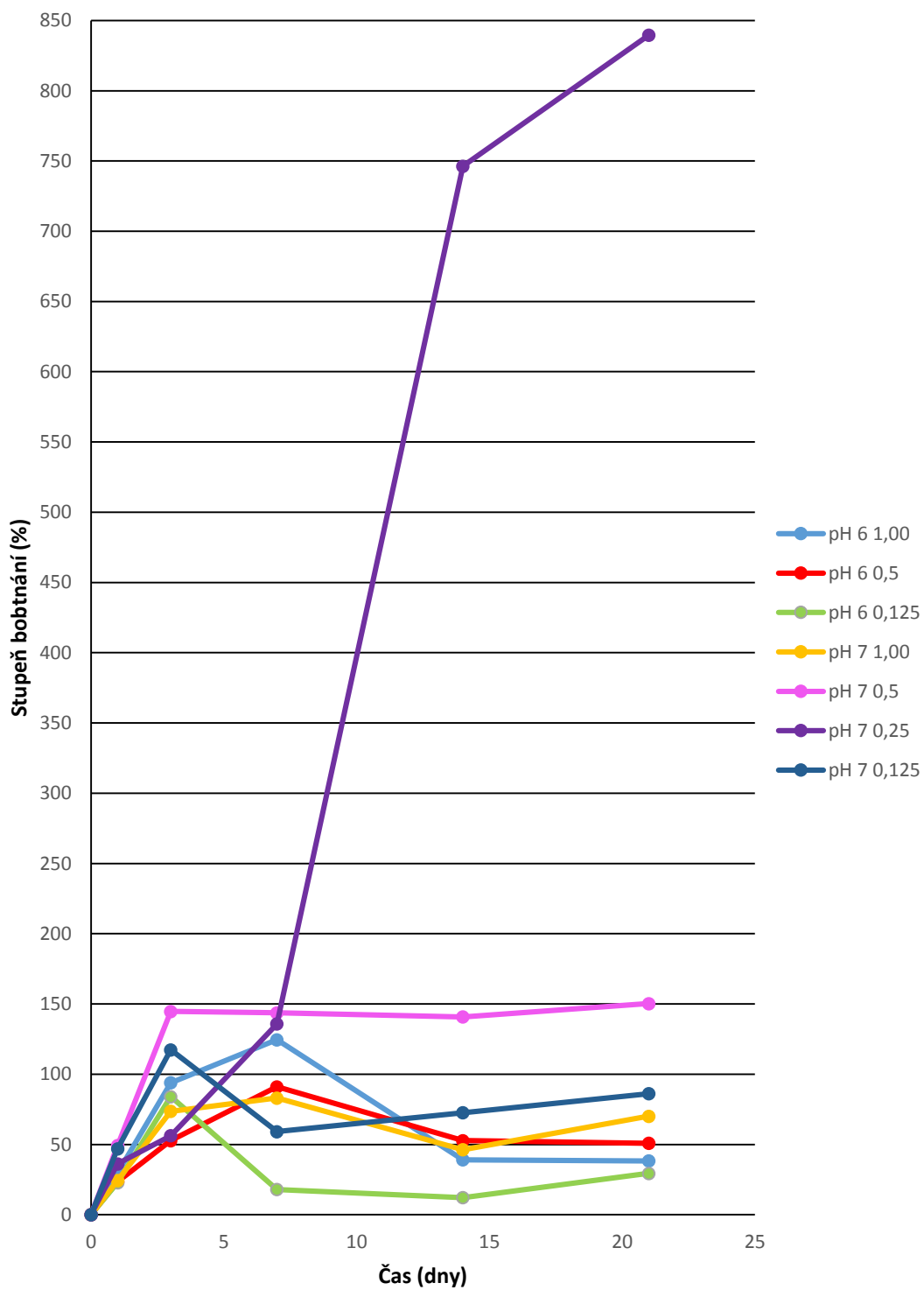
**Obr. 39:** Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.



**Obr. 40:** Stupeň eroze 3M o hmotnosti  $150\text{mg}\pm 5\%$  vzorků A a B v prostředí fosfát-citrátového pufru pH 7 o koncentraci  $c = 0,125$  při  $37^\circ\text{C}$  v průběhu 1. – 21. dne.

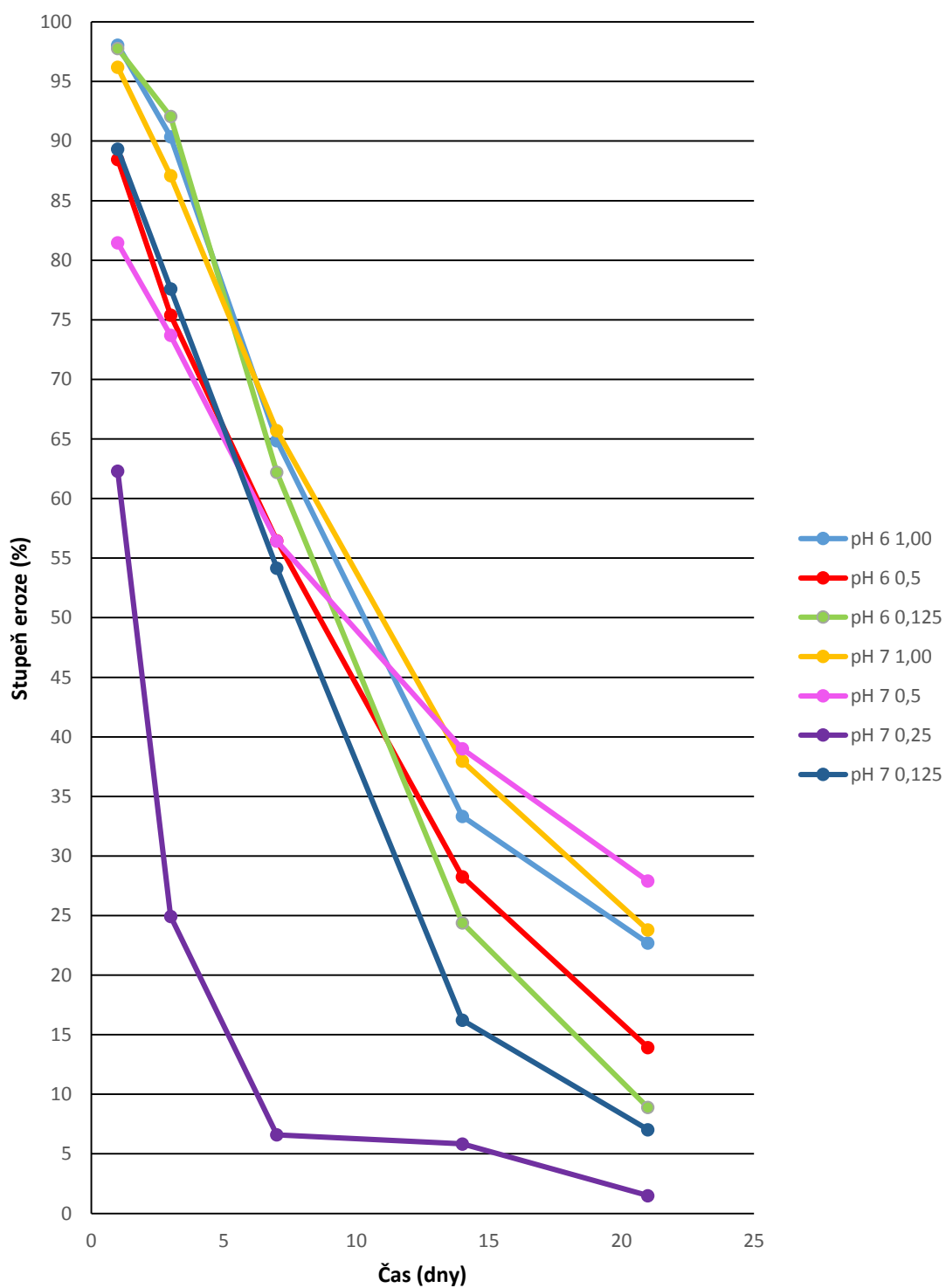


**Obr. 41:** Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání 3M v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH a různé koncentraci.





**Obr. 42:** Porovnání průměrných hodnot stupně eroze 3M v prostředí fosfát-citrátového pufru o různém pH a různé koncentraci.



## 7. Diskuse

### 7.1 K tématu a metodě řešení

Polyestery alifatických hydroxykyselin se používají jako nosiče léčivých látek při vývoji nových biodegradovatelných implantovaných přípravků. Kinetika liberace léčivé látky z implantátů monolitického i částicového typu se řídí do značné míry procesy, které doprovází degradaci nosiče. Mezi ně patří bobtnání, což je konvekce okolní kapaliny do tělesa za zvětšování jeho objemu. Na pracovišti školitele byl popsán a vysvětlen jev cyklického bobtnání a odbobtnání polyesterů a oligoesterů alifatických kyselin. (45) Bylo také prokázáno, že tento jev je ovlivněn řadou faktorů, jako je teplota, konstituce molekuly, velikost tělesa, iontová síla média a jeho hodnota pH.

Cílem této diplomové práce bylo upřesnit a rozšířit dosavadní poznatky o faktorech ovlivňujících kinetiku bobtnání. Pro řešení tématu byly předloženy tři polyesterové sloučeniny, které se lišily architekturou molekuly a typem koncových skupin. Tyto definované sloučeniny byly sledovány z hlediska bobtnání a eroze při třech různých hodnotách pH roztoku fosfát citátového pufru v různém stupni zředění. Všechny vzorky by sledovány po dobu 21 dní. Za tuto dobu došlo u většiny vzorků k erozi, která překročila 90% hranici.

### 7.2 K bobtnání oligomeru PLGA

Jedná se o lineární kopolymer, o němž je známo, že se vyznačuje relativně vysokým stupněm bobtnání v celém objemu tělesa. Z obr. 1 až 3 je zřejmé, že bobtnání probíhá ve třech nebo čtyřech fázích. Zpočátku, v intervalu prvních tří dní probíhá pomalu, potom se výrazně zrychlí a po dosažení maxima následuje prudký pokles hodnot. V maximu nebo po dosažení maxima se výrazně zvýší variabilita naměřených hodnot. Pokud jde o erozi, zpočátku je pomalá, za 3 až 7 dní se v blízkosti maxima zrychlí. V poslední fázi po 14 dnech působení média dojde ke zpomalení procesu kolapsu struktury.

Na obr. 7 a 8 jsou uvedeny hodnoty průměrných hodnot bobtnání a eroze ze dvou opakování při různých pH média. Vliv různých hodnot pH je zřetelný. Se zvyšováním ionizace karboxylů se zvyšuje stupeň bobtnání. Při nejvyšším pH 7 je maximum výrazně posunuto. To znamená, že schopnost polymeru bobtnat přetrvává delší dobu. Patrně se při vyšší hodnotě pH pufru projeví útlum hydrolýzy autokatalýzou. Souvislost mezi průběhem bobtnání a eroze nebyla nalezena. To tedy znamená, že není významná souvislost mezi aktuální velikostí tělíska a jeho schopností bobtnat. V intervalu 11 dní je neerodovaný zbytek při pH 6 a 7 stejný, avšak stupeň bobtnání se liší 3,5 násobně. Rozhodující je tedy stupeň ionizace karboxylů. Mezi 3. a 7. dnem byla eroze pomalejší při pH 7, což je možno přičítat výše uvedenému slabšímu autokatalytickému efektu hydrolýzy způsobenému vyšším stupněm bobtnání.

### 7.3 K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a tripentaerythritolu

Tento nosič se lišil od výše uvedeného vyšší molekulovou hmotností a také vysokým stupněm větvení. Jak z obr. 10 až 14 plyne, oba faktory měly vliv na bobtnání a na erozi. Rozdíl mezi první pomalou fází bobtnání a druhou rychlejší není tak výrazný jako u PLGA. Doba dosažení maxima stupně bobtnání je přibližně stejná. Eroze polymeru probíhala s vysokou reprodukovatelností při všech hodnotách pH. Probíhala nižší rychlostí, což je v souladu se známou skutečností o pomalejší erozi větvených polymerů ve srovnání s lineárními. Větvená molekula má menší možnost expandovat na základě konformačních změn.

Na obr. 15 a 16 jsou průměrné hodnoty ze dvou vzorků z nosiče T3. Vliv hodnot pH je zřetelně patrný. Rozdíl mezi pH 6 a pH 7 je patrně malý, může být ovlivněný vyšší variabilitou v maximální hodnotě charakteristiky. Výsledky vedou k hypotéze, že ionizace karboxylů se při bobtnání projeví v menším rozsahu, protože vysoce větvený terpolymer má zpočátku vysokou koncentraci hydroxylů a malou koncentraci více hydrofilních karboxylů. Ta postupně stoupá tak, jak přibývají lineární fragmenty molekul vzniklé hydrolýzou esterových vazeb a snižuje se zároveň stupeň větvení. Pomalejší eroze je v souladu s obecně známou skutečností. Menší stupeň bobtnání při pH 5 ovlivňuje rychlejší erozi zvýšeným autokatalytickým efektem nově

vznikajících karboxylů s menším potenciálem pro jejich neutralizaci sodnými kationty.

#### 7.4 K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu

Terpolymer označený symbolem M3 se vyznačoval jednak nízkou hodnotou molekulové hmotnosti a také nižším stupněm větvení než terpolymer T3. Při pohledu na výsledky testování bylo zaznamenáno několik zajímavých skutečností. Počáteční rychlost bobtnání byla mimořádně vysoká, poté následovalo maximum. Se stoupající hodnotou pH se více projevovала tendence k minimálnímu bobtnání v intervalu okolo 14. dne. Při pH 7 bylo minimum výrazné. Při velmi nízké hodnotě molekulové hmotnosti byla eroze velmi pomalá, což je možno přičíst vysokému stupni bobtnání a s ním souvisící eliminaci nebo výraznému snížení autokatalytické hydrolyzy.

Shrnutí výsledků týkajících se nosiče větveného na mannitolu je na obr. 23 a 24. Relativně pomalejší eroze při pH 7 by mohla mít vysvětlení u dříve popsaných nosičů ve vyšším stupni bobtnání a ve výše uvedené snížené autokatalytické degradaci. Skutečnost je však překvapivě jiná. Při pH 6 v intervalu do maxima, které je 7. den, těleso bobtná rychleji než při pH 7. Jediné vysvětlení může vycházet z odlišného mechanismu hydrolyzy s odlišným časovým průběhem stupně bobtnání. Tuto domněnku by bylo nutno prokázat měřením stupně větvení v průběhu degradace.

#### 7.5 K bobtnání a erozi polyesterových nosičů při různých hodnotách pH

Na obr. 25 a 26 je průběh bobtnání a eroze při pH 5. Polymery se projevíly podle očekávání. Nejméně bobtnal nosič s malým stupněm větvení, u něhož se projevila především jeho velmi nízká molekulová hmotnost. Vysoce větvený terpolymer bobtnal a také erodoval nejpomaleji. Jako zajímavý poznatek je možno hodnotit zastavení bobtnání u lineární PLGA po 14 denním intervalu. Tento nosič erodoval v celém rozsahu nejrychleji.

Při pH 6 byly základní relace mezi stupněm bobtnání jednotlivých vzorků stejné. Pouze nosič větvený na mannitolu bobtnal relativně k ostatním ve vyšším rozsahu. Při tomto pH se také výrazněji projevila rychlejší eroze PLGA a pomalejší u vysoce větvených T3 a M3 (obr. 27 a 28).

Jako velmi zajímavou je možno hodnotit prakticky stejnou erozi všech tří modelových polyesterů při pH 7 ve srovnání s pH 6 (obr. 29 a 30). Z aspektu stupně bobtnání se výrazně projevila intenzivní relaxace lineárního kopolymeru na základě ionizace četnějších koncových karboxylů. U nízkomolekulárního M3 došlo ve srovnání s T3 k většímu bobtnání a také erozi vlivem vyšší koncentrace karboxylů, později se bobtnání snížilo sníženou schopností nosiče bobtnat. Také eroze se zpomalila vlivem větvení.

## 7.6 K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH 6,0

Cílem bylo vyzkoušet citlivost polymeru při stejné hodnotě pH nejen na měnící se iontovou sílu kapalného média, ale také na různou kapacitu pufru v degradujícím tělese. Srovnáním průběhu bobtnání z obr. 19, 31 a 33 je možno posoudit, jak se projevuje objemová změna tělesa se snižující se koncentrací pufru. Při isotonické koncentraci je velmi rychlé bobtnání do 3. dne, potom se zpomaluje přibližně do 7. dne, následující rychlé odbobtnání končí v dalším týdenním intervalu, ve třetím týdnu je fáze bez větších objemových změn.

V případě pufru zředěného na poloviční koncentraci je počáteční fáze pomalejší, maximum bobtnání je menší a přibližně ve stejném intervalu a klidová fáze ve třetím týdnu se projevila také. Další ředění pufru na osminovou koncentraci se projevilo ještě výrazněji rychlejším iniciálním bobtnáním, posunem maxima do kratšího časového úseku, rychlejším a výraznějším odbobtnáním, následovaným fází relativní objemové stability. Ve finální fázi degradace došlo k druhému bobtnání.

Celková eroze probíhala nejrychleji v nejvíce zředěném pufru, nejpomaleji v neředěném isotonickém. V iniciální fázi působení média oligomerní tělísko erodovalo překvapivě nejrychleji při použití polovičně zředěného isotonického pufru.

## 7.7 K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH 7,0

V části této diskuse 7.4 se v intervalu do 14 dní prokázalo neočekávaně nižší bobtnání nosiče při pH 7 než při pH 6 (obr. 23). Po dvojnásobném ředění pufru došlo ke zrychlení iniciálního bobtnání v prvních třech dnech (obr. 35). Zajímavá je také velmi rychlá 20% eroze v prvním dnu. Další průběh bobtnání je zatížen značnou variabilitou v intervalu 7. den. Případné minimum stupně bobtnání blízko intervalu 14. dne je u zředěného pufru značně méně výrazné.

Po dalším ředění pufru na čtvrtinu původní koncentrace byl zaznamenán zcela odlišný průběh bobtnání a eroze (obr. 37). Do 7. dne probíhalo bobtnání rychlostí srovnatelnou s polovičně zředěným pufrům. Poté následovala fáze velmi intenzivního bobtnání na více než sedminásobek původního objemu. Obvyklému bobtnání v počáteční fázi odpovídala neobvykle rychlá eroze v tomto časovém úseku. Za prvních 7 dní erodovalo více než 90 % oligomeru M3 (obr. 38).

Po dalším zředění na osminu původní isotonické koncentrace pufru došlo k další pronikavé změně v bobtnání tělísek do maxima ve 3. dni, přibližně v 7. dni se projevilo minimum a následovalo pomalé progresivní bobtnání do 21. dne. Eroze se svým průběhem výrazně lišila (obr. 40), do 14. dne probíhala prakticky ve shodě s kinetikou nultého řádu. To znamená, že se jednalo o děj, který měl zcela odlišný průběh od průběhu bobtnání.

## 7.8 K bobtnání terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH

Výsledky jsou shrnuty na obr. 41. Výrazně odlišné je bobtnání při pH 7 a čtyřnásobném zředění isotonického pufru. Patrně v tomto případě se jedná o synergické působení několika vlivů, k jejichž prozkoumání by bylo nutno provést další upřesňující experimenty. Zajímavé je, že při stejném pH a pokračujícím zředění se schopnost tělísek bobtnat pronikavě snížila. Je možné, že v médiu byla nedostatečná koncentrace kationtů k ionizaci karboxylů.

Opačným extrémem je bobtnání při pH 6 při osminásobném zředění. Hlavní roli hrála pravděpodobně nízká koncentrace kationtů. Suprese bobtnání iontovou silou měla podružnou roli.

## 7.9 K erozi terpolymeru kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu při různé iontové síle a pH

Bezkonkurenčně nejrychlejší eroze byla u nosiče při pH 7 a při zředění 0,25. Tento vzorek také extrémně bobtnal. Vzorek, který bobtnal nejméně, zpočátku nejpomaleji erodoval, postupně se faktor nízkého stupně bobtnání projevil na nejrychlejší erozi, kromě extrémního výše popsaného případu (obr. 42). V intervalu 1. až 21. dne byla nejpomalejší eroze při pH 7 a ředění 0,50. Jedná se o vzorek, který zpočátku bobtnal nejrychleji a potom náhle, v intervalu 3. dne došlo k zastavení bobtnání a setrvání v labilní rovnováze do ukončení pokusu 21. dne v objemově rovnovážném stavu.

## 8. Závěry

A) Lineární kopolymer PLGA se lišil od větvených vyšším stupněm bobtnání, výrazným odbobtnáním s velkou variabilitou průběhu a rychlejší erozí. Nebyla prokázána výrazná souvislost mezi aktuální velikostí tělesa a jeho schopností bobtnat, rozhodující je u tohoto kopolymeru stupeň ionizace karboxylů.

B) Ovlivnění stupně bobtnání změnou pH od 5 do 7 bylo u PLGA značně výraznější než u větvených kopolymerů.

C) Potvrdilo se, že se zvyšujícím se stupněm větvení se prodlužuje doba eroze, vysoce větvený terpolymer byl méně citlivý na změny hodnot pH média než lineární.

D) Autokatalytický účinek nízkomolekulární frakce na pokračující hydrolyzu esterových vazeb s dopadem na erozi byl podle předpokladu výraznější u vzorků s nižším stupněm bobtnání.

E) Kopolymer PLGA větvený na mannitolu byl mimořádně citlivý na průběh bobtnání a eroze vyvolaný změnou iontové síly pufrů pH 6 a pH 7. Jeho atypická schopnost bobtnat byla limitována nízkou molekulární hmotností, projevila se vyšším stupněm bobtnání při pH 6 než při pH 7.

F) Změna iontové síly pufru má značný vliv na průběh bobtnání a eroze tělísek ze středně větveného terpolymeru. Na značné variabilitě průběhu obou dějů mají svůj podíl interakce mezi různými ději, jako je časový průběh změny koncentrace koncových skupin, měnící kvantitativní podíl podle jejich typu, jejich stupeň ionizace, měnící se koncentrace nově vznikající nízkomolekulární oligomerní frakce rozpustné ve vodě, jejich schopnost opouštět matrici difúzí, měnící se obstrukční efekt, různý stupeň větvení molekul, kapacita pufru, jeho iontová síla apod.



## 9. Použitá literatura

1. GENTILE, P., CHIONO, V., CARMAGNOLA, I., HATTON, P.V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15 (3), s. 3640-3659
2. MAKADIA, H.K., SIEGEL, S.J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*, 2011, 3 (3), s. 1377-1397
3. STEVANOVIĆ, M., BRAČKO, I., MILENKOVIĆ, M., FILIPOVIĆ, N., NUNIĆ, J., FILIPIĆ, M., USKOKOVIĆ, D.P. Multifunctional PLGA particles containing poly(L-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity. *Acta. Biomater.*, 2014, 10 (1), s. 151-162
4. MENG, Z.X., WANG, Y.S., MA, C., ZHENG, W., LI, L., ZHENG, Y.F. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Mater. Sci. and Eng. C*, 2010, 30 (8), s. 1204-1210
5. EDLUND, U., ALBERTSSON, A.-C. Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. *Adv. Polym. Sci.*, 2002, 157, s. 67-112
6. BRUNNER, A., MÄDER, K., GÖPFERICH, A. pH and osmotic pressure inside biodegradable microspheres during erosion. *Pharm. Res.*, 1999, 16 (6), s. 847-853
7. GÖPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 1996, 17 (2), s. 103-114
8. BERKLAND, C., POLLAUF, E., RAMAN, C., SILVERMAN, R., KIM, K., PACK, D.W. Macromolecule release from monodisperse PLG microspheres: control of release rates and investigation of release mechanism. *J. Pharm. Sci.*, 2007, 96 (5), s. 1176-1191
9. FREDENBERG, S., WAHLGREN, M., RESLOW, M., AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review. *Int. J. Pharm.*, 2011, 415 (1-2), s. 34-52
10. VERSYPT, A. N. F., PACK, D.W., BRAATZ, D.R. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres - a review. *J. Control. Release*, 2013, 165 (1), s. 29-37
11. GRAYSON, A.C.R., CIMA, M.J., LANGER, R. Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials*, 2005, 26 (14), s. 2137-2145
12. LYU, S., UNTEREKER, D. Degradability of polymers for implantable biomedical devices. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10 (9), s. 4033-4065

13. KRANZ, H., UBRICH, N., MAINCENT, P., BODMEIER, R. Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states. *J. Pharm. Sci.*, 2000, 89 (12), s. 1558-1566
14. RAMAN, C., BERKLAND, C., KIM, K., PACK, D.W. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. *J. Control. Release*, 2005, 103 (1), s. 149-158
15. BLASI, P., D'SOUZA, S.S., SELMIN, F., DELUCA, P.P. Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide). *J. Control. Release*, 2005, 108 (1), s. 1-9
16. WISCHKE, CH., SCHWENDEMAN S.P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.*, 2008, 364 (2), s. 298-327
17. JONNALAGADDA, S., ROBINSON, D.H. A bioresorbable, polylactide reservoir for diffusional and osmotically controlled drug delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2000, 1 (4), s. 26-34
18. GRAYSON, A.C.R., VOSKERICIAN, G., LYNN, A., ANDERSON, J.M., CIMA, M.J., LANGER, R. Differential degradation rates in vivo and in vitro of biocompatible poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) homo- and co-polymers for a polymeric drug-delivery microchip. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2004, 15 (10), s. 1281-1304
19. BATYCKY, R.P., HANES, J., LANGER, R., EDWARD, D.A. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86 (12), s. 1464-1477
20. LI, S., MCCARTHY, S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide). *Biomaterials*, 20 (1), s. 35-44
21. ZOLNIK, B. S., LEARY, P.E., BURGESS, D.J. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *J. Control. Release*, 2006, 112 (3), s. 293-300
22. HUSMANN, M., SCHENDERLEIN, S., LÜCK, M., LINDNER, H., KLEINEBUDDE, P. Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method. *Int. J. Pharm.*, 2002, 242 (1-2), s. 277-280
23. ALEXIS, F., VENKATRAMAN, S., RATH, S.K., GAN, L.-H. Some insight into hydrolytic scission mechanisms in bioerodible polyesters. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, 102 (4), s. 3111-3117
24. BERKLAND, C., KIM, K.K., PACK, D.W. PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors. *Pharm. Res.*, 2003, 20 (7), s. 1055-1062
25. FU, K., PACK, D.W., KLIBANOV, A.M., LANGER, R. Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres. *Pharm. Res.*, 2000, 17 (1), s. 100-106

26. PARK, T.G., LU, W., CROTTS, G. Importance of in vitro experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly (d,l-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres. *J. Control. Release*, 1995, 33 (2) s. 211-222
27. FREDENBERG, S., WAHLGREN, M., RESLOW, M., AXELSSON, A. Pore formation and pore closure in poly(D,L-lactide-co-glycolide) films. *J. Control. Release*, 2011, 150 (2), s. 142-149
28. HUANG, X., BRAZEL, C.S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J. Control. Release*, 2001, 73 (2-3), s. 121-136
29. KANG, J., SCHWENDEMAN, S.P. Pore closing and opening in biodegradable polymers and their effect on the controlled release of proteins. *Mol. Pharm.*, 4 (1), s. 104-118
30. HATEFI, A., AMSDEN, B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *J. Control. Release*, 2002, 80 (1-3), s. 9-28
31. AL-TAHAMI, K., SINGH, J. Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. *Recent Pat. Drug Deliv. Form.*, 2007, 1 (1), s. 65-71
32. LAMBERT, W. J., PECK, K.D. Development of an in situ forming biodegradable polylactide-coglycolide system for the controlled release of proteins. *J. Control. Release*, 1995, 33 (1), s. 189-195
33. PARK, M.-R. *et al.* Sustained delivery of human growth hormone using a polyelectrolyte complex-loaded thermosensitive polyphosphazene hydrogel. *J. Control. Release*, 2010, 147 (3), s. 359-367
34. CHO, K.Y. *et al.* In situ micro-sized gel-forming injectable implant using biodegradable amphiphilic graft copolymer. *Macromol. Biosci.*, 2007, 7 (6), s. 784-788
35. SOUTHARD, G.L. *et al.* The drug delivery and biomaterial attributes of the ATRIGEL technology in the treatment of periodontal disease. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 1998, 7 (9), s. 1483-1491
36. CHU, F.M. *et al.* A clinical study of 22.5 mg. La-2550: A new subcutaneous depot delivery system for leuprolide acetate for the treatment of prostate cancer. *J. Urol.*, 168 (3), s. 1199-1203
37. OKUMU, F.W. *et al.* Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER. *Biomaterials*, 2002, 23 (22), s. 4353-5358
38. ZENTNER, G.M. *et al.* Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *J. Control. Release*, 2001, 72 (1-3), s. 203-2015

39. ZHANG, Z. et al. Biodegradable and thermoreversible PCLA–PEG–PCLA hydrogel as a barrier for prevention of post-operative adhesion. *Biomaterials*, 2011, 32 (21), s. 4725-4736
40. BERRADA, M. et al. A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy. *Biomaterials*, 2005, 26 (14), s. 2115-2120
41. VERMONDEN, T. et al. Hydrogels for Protein Delivery. *Chem. Rev.*, 2012, 112 (5), s. 2853-2888
42. SILVA-BOGHOSSIAN, C.M., NEVES, A.B., RESENDE, F.A., COLOMBO, A.P.V. Suppuration-associated bacteria in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J. Periodontol.*, 2013, 84 (9), e9-e16
43. K. SWACH-ABDELLAOUI, K., VIVIEN-CASTIONI, N., GURNY, R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, 50 (1), s. 83–99
44. DO, M.P., NEUT, C., DELCOURT, E., CERTO, T.S. SIEPMANN, J., SIEPMANN, F. In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2014, 88 (2), s. 342-350
45. DITTRICH, M., SNEJDROVA, E. Cyclic swelling as a phenomenon inherent to biodegradable polyesters. *J. Pharm. Sci.*, 2014, 103 (11), s. 3560-3566