UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Eroze a bobtnání v průběhu degradace oligoesterových nosičů

Erosion and swelling during oligoester carriers degradation process

Vypracovala: Vendula Dvořáková

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

Hradec Králové, 2011

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

……

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

OBSAH

Abstrakt **6**

Abstract **6**

Seznam zkratek **7**

1 ÚVOD **9**

2 TEORETICKÁ ČÁST **10**

2.1 INTELIGENTNÍ BIOMATERIÁLY 10

2.1.1 Citlivé polymerní hydrogely v regulovaném podávání léčiv 10

2.1.2 Reaktivní materiály citlivé na podněty 11

2.1.2.1 Polymerové směsi 11

2.1.2.2 Interpolymerní komplex 11

2.1.3 Biologicky erodovatelné a odbouratelné systémy 12

2.1.4 Systémy regulované bobtnáním 12

2.1.5 Systémy uvolňování citlivé na teplotu 12

2.1.5.1 Negativní termosenzitivní hydrogely 13

2.1.5.2 Pozitivní termosenzitivní hydrogely 13

2.1.6 Systémy uvolňování citlivé na pH 13

2.1.6.1 Kationické hydrogely 14

2.1.6.2 Anionické hydrogely 14

2.1.7 Hydrogely citlivé na bioanalyt 14

2.1.8 Konfigurovaně imprintované biomimetické polymery 14

2.2 VYUŽITÍ INTELIGENTNÍCH BIOMATERIÁLŮ 15

2.2.1 Snímací diagnostické systémy 15

2.2.2 Systémy aplikace léčiv 16

2.2.2.1 Mikročipové systémy aplikace léčiv se zásobníkem 16

2.2.2.2 Mikro a nanotechnologie nosičů pro aplikaci léčiv 17

2.3 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ 17

2.3.1 Biologicky odbouratelné nanokompozity z polymerové matrice pro tkáňové inženýrství 18

2.3.2 Současné polymerové matrice pro bionanokompozity 19

2.3.3 Současné nanostruktury pro bionanokompozity 20

2.4 BIODEGRADACE POLYMERŮ 20

2.4.1 Biodeteriorace 21

2.4.2 Chemická cesta biodeteriorace 21

2.4.3 Odbourávání PLA ... 22
3 CÍL PRÁCE ... 24
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 25
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE ... 25
4.1.1 Chemikálie ... 25
4.1.2 Přístroje ... 25
4.1.3 Pomůcky ... 25
4.1.4 Charakteristika použitých oligoesterových nosičů ... 26
4.2 STANOVENÍ STUPNĚ BOBTNÁNÍ A EROZE TESTOVANÉHO NOSIČE ... 27
4.2.1 Příprava vzorků testovaných nosičů ... 27
4.2.2 Postup při stanovení stupně bobtnání a eroze destruktivní zkouškou pro PLGA / T3 připravených mechanickou fragmentací polymeru ... 27
4.2.3 Postup při stanovení bobtnání nedestruktivní zkouškou pro PLGA připravených formováním taveniny ... 28
4.2.4 Vzorce na výpočet bobtnání a eroze ... 29
***5* VÝSLEDKY ... 30**
5.1 TABULKY ... 30
5.2 OBRÁZKY ... 41
6 DISKUZE ... 59
6.1 K řešenému tématu práce ... 59
6.2 K bobtnání tělísek z větveného terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu při 7 °C ... 59
6.3 K bobtnání tělísek z lineárního kopolymeru kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové při 7 °C ... 60
6.4 K bobtnání tělísek hmotnosti 50 mg z jednotlivých polyesterů při 22 °C ... 61
6.5 K bobtnání tělísek tvarovaných litím taveniny o hmotnosti 44 mg z oligoesteru PLGA při 7 °C ... 61
7 ZÁVĚRY ... 63
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ... 64

Abstrakt

V teoretické části práce je pozornost zaměřena na inteligentní biomateriály, jejich složení, strukturu, mechanismus reakce na impulzy, dále na jejich využití potenciální i skutečné především ve tkáňovém inženýrství. Je připojena pasáž o dosavadních znalostech o biodegradaci polymerů s důrazem na kyselinu polymléčnou. Hlavní částí práce je experiment. Byl studován průběh bobtnání matric z lineárního kopolymeru kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou a z větveného terpolymeru kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou a tripentaerytritolem ve vodném prostředí. Matrice měly různou hmotnost, bylo sledováno jejich bobtnání při 7 °C a při 22 °C destruktivním i nedestruktivním způsobem po dobu 8 dní. Bylo prokázáno, že matrice oscilují z hlediska změn jejich objemu. Průběh děje je ovlivněn teplotou, velikostí matric i strukturou molekuly polyesteru.

Abstract

The theoretical part of the work is focused on the inteligent biomaterials, their composition, structure, mechanism of the answers on impulses, also on their possible and real use, mainly in tissue engineering. There is a text passage including recent knowledge about biodegradation of polymers focusing on polylactic acid. The main part of the work is the experiment. The time-course of swelling of the matrices made from linear copolymer of DL-lactic acid and glycolic acid and branched terpolymer of DL-lactic acid, glycolic acid and tripentaerythritol in the aqueous medium was studied. The matrices were of different weights – 50 mg and 100 mg. Their swelling was monitored by destructive and non-destructive manner at 7 °C and 22 °C during an eight-day period. The volume oscillation of matrices was revealed and documented. The time-course of this phenomenon is influenced by temperature, matrice´s size, and the specific features of molecular structure.

Seznam zkratek

CIBP	konfigurovaně imprintované biomimetické polymery
PMAA	kyselina polymetakrylová
PEG	polyethylenglykol
PLA	kyselina polymléčná
PGA	kyselina polyglykolová
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové
LCST	spodní kritická rozpouštěcí teplota
UCST	horní kritická rozpouštěcí teplota
NIPAAm	poly-*N*-isopropylakrylamid
PAA	kyselina polyakrylová
PAAm	polyakrylamid
CS/PVP	chitosan/polyvinylpyrolidon
PMA	polymetakrylát
ECM	extracelulární matrix
MIP	molekulárně imprintované polymery
DDS	systém aplikace léčiv
MEM	mikroelektromechanický
bioMEM	biomikroelektromechanický
NEM	nanoelektromechanický
PDMS	polydimethylsiloxan
S-FIL	Step and Flash Imprint Lithography
DNA	kyselina deoxyribonukleová
PLA-g-PVA	kyselina polymléčná-g-polyvinylalkohol
PCL	poly-ε-kaprolakton
PHB	polyhydroxybutyrát

FDA	US Food and Drug Administration - Správa potravin a léčiv
HA	hydroxyapatit
PBS	polybutylensukcinát
PBA	polybutylenadipát

1 ÚVOD

Ve farmacii i zdravotnictví jsou polymery využívány jako pomocné látky již desítky let. Nejprve našly své uplatnění nevstřebatelné polymery, které se využívaly pro výrobu šicích materiálů, katetrů, cévních štěpů nebo kontaktních čoček. Později byly objeveny absorbovatelné polymery. Absorbovatelné materiály se dnes využívají hlavně ve výzkumu a vývoji nových lékových forem a léčivých přípravků, např. jako depotní systémy nebo systémy řízeného uvolňování léčiv. Tyto systémy se nejčastěji používají při léčbě chronických onemocnění, kdy polymerní implantát může uvolňovat léčivou látku až po dobu několika měsíců. Neméně důležité je jejich využití v protinádorové léčbě a jako součást vektorů pro genovou terapii. Výhoda takových systémů spočívá v možnosti kontrolovat rychlost uvolňování léčivé látky za současné degradace polymerního nosiče. Nejčastěji se jako matrice účinných látek používají polyestery alifatických hydroxykyselin, zvláště pak polyestery tvořené kyselinou mléčnou, kyselinou glykolovou nebo kopolymery obou těchto kyselin. Při degradaci polymeru vznikají produkty, které jsou pro lidský organismus neškodné a jsou snadno vyloučeny z těla. Při degradaci dochází ke štěpení molekuly polymeru na menší oligomery a monomery.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 INTELIGENTNÍ BIOMATERIÁLY

Polymery jsou preferované materiály pro biologické aplikace kvůli jejich vysoké adaptabilitě a kompatibilitě s biologickými molekulami a buňkami. Pro formování polymerů mohou být použity mnohé mikrotechnologické metody, které jsou založeny na jejich vlastnostech. Regulované systémy aplikace léčiv, které jsou většinou vytvořeny z polymerů, jsou používány u milionů pacientů ročně.[1] Byly vyvinuty „inteligentní“ biomateriály na polymerovém základě, které mají schopnost předvídat a reagovat na biomolekuly, teplotu nebo pH. Použití citlivých polymerních hydrogelů a konfigurovaně imprintovaných biomimetických polymerů (CIBP) jsou dvě nejslibnější metody ve vývoji inteligentních terapeutických systémů.[2]

2.1.1 Citlivé polymerní hydrogely v regulovaném podávání léčiv

Hydrogely jsou trojrozměrné sítě s vysokou molekulární hmotností, složené z polymerního základu, vody a síťovací látky. Jsou stále důležitější pro celou řadu aplikací v medicínských, farmaceutických a jiných příbuzných oblastech. Používají se například pro obvazy, kontaktní čočky, umělé orgány a systémy aplikace léčiv.[3]

Hydrogely jsou polymerní materiály, které se při fyziologické teplotě a pH nerozpouští ve vodě. Ve vodném médiu [4] značně nabobtnají a vykazují mimořádnou kapacitu (>20%) nasávání vody do struktury sítě. Gely, které na změnu externích podmínek, jako např. pH, iontové síly, teploty a elektrického proudu, reagují fázovou přeměnou, jsou známé pod názvem „gely reagující na podněty“ nebo „chytré gely“.[5] Tím, že jsou nerozpustné, mohou tyto trojrozměrné hydrofilní řetězce zadržovat velké množství vody, která nejen přispívá k jejich dobré krevní kompatibilitě, ale zároveň udržuje určitý stupeň strukturální integrity a pružnosti.[6]

Hydrogely lze připravit z přírodních nebo syntetických polymerů.[7] Přestože hydrogely vyrobené z přírodních polymerů nemusí poskytovat dostatečnou mechanickou pevnost a mohou obsahovat patogeny či vyvolávat zánětlivé reakce, přináší řadu výhodných vlastností, jako např. inherentní biologická kompatibilita, biologická odbouratelnost a biologicky rozpoznatelné části, které podporují buněčné aktivity. Naopak syntetické hydrogely tyto inherentní bioaktivní vlastnosti nemají. Syntetické polymery však naštěstí mají

přesně stanovené struktury, které lze upravovat tak, abychom dosáhli požadované odbouratelnosti a funkčnosti.[8]

2.1.2 Reaktivní materiály citlivé na podněty

Hydrogely byly vyvinuty jako materiály reaktivní na podněty, které mohou podstoupit náhlou objemovou změnu v rámci reakce na malé změny parametrů prostředí. Takovými parametry jsou teplota, pH, iontová síla, atd. Tyto jedinečné vlastnosti hydrogelů jsou velice zajímavé pro aplikaci léčiv, zapouzdření buněk a tkáňové inženýrství.[3] Polymery, které reagují na podněty, hrají významnou roli ve vývoji nových „chytrých“ hydrogelů.[9]

Kromě hydrogelů citlivých na pH a teplotu byly vyrobeny i další hydrogely reaktivní na podněty, které vykazují výrazné změny při bobtnání, změně struktury řetězce, prodyšnosti a mechanické pevnosti – to vše je reakce na řadu vnějších podnětů, včetně přítomnosti specifických rozpuštěných látek a přítomnosti elektrických či magnetických polí.[10]

2.1.2.1 Polymerové směsi

Míchání hydrofilních a hydrofobních polymerů produkuje kompozitní hydrogely rozdělených fází. Míchání různých polymerů, kdy však v konečné směsi zůstávají zachovány jejich jednotlivé vlastnosti, je velmi atraktivní, nenákladný a výhodný způsob jak získat nové strukturní materiály.[11] Výsledné polymerové směsi vykazují synergické vlastnosti. Mezi výhody systémů polymerových směsí pro aplikace regulovaného uvolňování může patřit snadná výroba zařízení, manipulace s vlastnostmi zařízení (hydratace, rychlost odbourávání a mechanická pevnost), plnění léčiv a využití rozptýlených fázových oblastí jako mikrozásobníků pro lepší vlastnosti uvolňování.[12] Dvě běžné metody používané k přípravě polymerových směsí jsou: míchání tavením a odlévání rozpouštěním (nebo odlévání v rozpouštědle).[3]

2.1.2.2 Interpolymerní komplex

Interpolymerní komplexy, rovněž známé pod pojmem polykomplexy, jsou nerozpustné makromolekulární struktury, tvořené nekovalentním sdružením polymerů s vzájemnou afinitou. Tyto komplexy se tvoří spojením opakujících se jednotek na různých řetězcích (interpolymerní komplexy) nebo na samostatných částech stejného řetězce (intrapolymerní komplexy). Polymerní komplexy se rozdělují podle druhu spojování. Hlavní třídy polymerních komplexů jsou stereokomplexy, polyelektrolytové komplexy a komplexy s vodíkovými vazbami.[13] Jedním z párů komplexotvorných polymerů, který je nejvíce

zkoumán, je PMAA a PEG. V tomto systému ke komplexaci dochází tvorbou vodíkových vazeb mezi karboxylovými protony PMAA a etherovou skupinou PEG. Tyto komplexy mají vysokou citlivost na pH okolního prostředí a existují v roztocích s pH tak nízkým, že umožňuje důkladnou protonizaci kyselých skupin PMAA.[3]

2.1.3 Biologicky erodovatelné a odbouratelné systémy

Polymer v těchto systémech eroduje díky přítomnosti hydrolyticky či enzymaticky labilních vazeb. Když polymer eroduje, lék je uvolňován do okolního média. Eroze může být buď povrchová, nebo celková.

Hlavní výhodou biologicky odbouratelných systémů je eliminace potřeby jejich chirurgického odstranění, jejich malá velikost a potencionálně nízké náklady. Na druhou stranu musí být všechny biologicky odbouratelné produkty, jakož i jejich metabolity, netoxické, nekarcinogenní a neteratogenní. Tyto požadavky není snadné splnit a musí být předmětem pečlivého zkoumání.[3]

2.1.4 Systémy regulované bobtnáním

Hydrogely se skládají z makromolekulárních řetězců, které jsou síťované tak, aby vytvořily spletitou mřížkovou strukturu, čímž zajistí matrici pro zachycení léčiv. Když takové hydrogely přijdou do styku s termodynamicky kompatibilním rozpouštědlem, polymerové řetězce se uvolní.[14] K tomu dochází, když typická teplota přeměny polymeru sklo-kaučuk je pod teplotou experimentů. Bobtnání je makroskopickým důkazem této přeměny. Rozpuštěné léčivo přechází přes nabobtnanou polymerní vrstvu, vytvořenou kolem hydrogelu, a rozptýlí se do vnějšího přijímacího média. Když hydrogel přijde do styku s uvolňovacím médiem, pronikající molekuly vody naruší povrch hydrogelu. Lze tedy pozorovat pohyblivou přední část, která jasně odděluje nesolvatovanou oblast skelného polymeru od nabobtnané kaučukovité fáze, která je za ní.[15]

2.1.5 Systémy uvolňování citlivé na teplotu

Teplota je nejčastěji používaným spouštěcím signálem pro řadu spouštěných či pulsačních systémů aplikace léčiv. Použití teploty jako signálu bylo odůvodněno tím, že skutečná tělesná teplota v přítomnosti patogenů nebo pyrogenů se od fyziologické hodnoty (37 ºC) často liší. Tato odchylka může být užitečným podnětem, který aktivuje uvolňování terapeutických látek z různých systémů pro aplikaci léčiv, které jsou reaktivní na teplotu, pro onemocnění provázená horečkou. Systémy aplikace léčiv reaktivní na teplotu využívají různé

vlastnosti polymerů, včetně tepelně reverzibilního přechodu polymerních molekul, změnu sítí bobtnáním, skelný přechod a krystalické tání.[16] Tyto hydrogely jsou schopné nabobtnat nebo se vrátit zpět do původního stavu v důsledku změny teploty okolní tekutiny.[17]

2.1.5.1 Negativní termosenzitivní hydrogely

Negativní termosenzitivní hydrogely mají spodní kritickou rozpouštěcí teplotu (LCST), kterou lze definovat jako kritickou teplotu, pod jejíž hodnotou polymer v roztoku bobtná, zatímco dojde-li k jejímu překročení, polymer se smršťuje. Za bobtnání polymeru při hodnotě pod LCST může entalpie, která souvisí s vázáním vodíku mezi polymerem a molekulami vody. Když dojde ke zvýšení teploty nad hodnotu LCST, dominuje entropie (hydrofobní interakce), což vede ke smrštění polymeru. Známým polymerem, jehož LCST je 32ºC, je poly(N-isopropylakrylamid) (NIPAAm) s rozsáhlým použitím jako negativní termosenzitivní hydrogel.

2.1.5.2 Pozitivní termosenzitivní hydrogely

Pozitivní termosenzitivní hydrogel má horní kritickou rozpouštěcí teplotu (UCST). Hydrogel se smršťí, když dojde ke zchlazení pod hodnotu UCST. Polymerové sítě kyseliny polyakrylové (PAA) a polyakrylamidu (PAAm) nebo kopolymeru akrylamidu a butylmethakrylátu vykazují pozitivní teplotní závislost bobtnání.[18]

2.1.6 Systémy uvolňování citlivé na pH

Polyelektrolyt je makromolekula, která se odděluje, aby při rozpouštění ve vodě či v jiném ionizujícím rozpouštědle vypouštěla polymerní ionty. Kvůli odporu mezi náboji polymerového řetězce se řetěz při ionizaci ve vhodném rozpouštědle rozpíná. Pokud však rozpouštědlo ionizaci polyelektrolytu zabrání, rozpuštěný řetězec zůstává v kompaktním, skládaném stavu. Vzájemné působení mezi hydrofobní povrchovou energií a elektrostatickým odpuzováním mezi náboji určuje reakci polyelektrolytu.[19] Vzhledem k tomu, že stupeň ionizace slabého polyelektrolytu ovládá pH a iontové složení vodného média, „chytré“ polymery dramaticky mění tvar podle okamžitých změn v pH vodného prostředí. Všechny polymery citlivé na pH obsahují doplňkové kyselé nebo zásadité skupiny, které reagují na okolní pH, tedy buď přijímají či dávají protony.[20] Bobtnání hydrogelu se u slabě kyselých (anionických) skupin s rostoucím vnějším pH zvyšuje, ale obsahuje-li polymer slabě zásadité (kationické) skupiny, dochází k jeho snížení.

2.1.6.1 Kationické hydrogely

Kationické hydrogely bobtnají a uvolňují léčivo v prostředí s nízkým pH v žaludku. Risbud et al.[21] vyvinuli systém uvolňování léčiv na bázi CS/PVP, který je citlivý na pH a který používá amoxicilin vysušený na vzduchu či lyofilizací. Porézní lyofilizovaný hydrogel, na rozdíl od neporézních hydrogelů sušených na vzduchu, vykazoval vynikající pH dependentní vlastnosti bobtnání. Lyofilizované membrány uvolnily za 3 hodiny při pH 1,0 asi 73% amoxicilinu (33% při sušení na vzduchu), vykazovaly tedy lepší vlastnosti uvolňování léčiv.

2.1.6.2 Anionické hydrogely

Hydrogely z PAA nebo PMA lze použít k vývoji preparátů, které uvolňují léčiva v prostředí s neutrálním pH.[3] Hydrogely z polyaniontů (např. PAA) sítěné s azoaromatickými síťovadly byly vyvinuty pro aplikaci léčiv pro tlusté střevo. Bobtnání těchto hydrogelů v žaludku je minimální a uvolňování léčiva tím pádem také. Bobtnání se zvýší, když hydrogel prochází střevním traktem, což je způsobené zvýšením pH, které vede k ionizaci karboxylových skupin. Kinetiku bobtnání hydrogelů lze regulovat změnou složení polymeru [22], k čemuž může dojít zároveň se změnou pH okolního prostředí.

2.1.7 Hydrogely citlivé na bioanalyt

Pro vývoj citlivých biomateriálů může být použito včlenění dobře rozvinutých biologických mechanismů (jako například vysoce specifických enzymaticky štěpitelných proteinů a peptidů) do syntetických hydrogelů. V závislosti na biologických molekulárních bioanalytech včleněných do hydrogelů mohou být tyto spojené biomateriály snadno přizpůsobeny tak, aby reagovaly na odlišné biologické podmínky. Včleněním proteinů, peptidů a enzymů do polymerních sítí byla vyvinuta široká škála biohybridních hydrogelů pro přenos léků [4, 3] a pro využití ve tkáňovém inženýrství.[23, 3] Ve velké míře byly podávány zprávy o sériích enzymaticky degradabilních hydrogelech specificky vytvořených tak, aby napodobovaly extracelulární matrix (ECM) při používání ve tkáňovém inženýrství.[3]

2.1.8 Konfigurovaně imprintované biomimetické polymery

U mnoha biologických a patofyziologických aplikací je pro vývoj inteligentních léčebných systémů nutné regulovat vlastnosti molekulárního rozpoznávání. Systémy molekulárního rozpoznávání vyžadují 3D infrastrukturu, jejíž chemickou funkčnost a složení

lze přesně regulovat. Hydrogely lze připravit pomocí molekulárního imprintingu k přípravě sítí s chemickými a strukturními funkcemi pro rozpoznávání specifických molekul.[2]

Systémy molekulárně imprintovaných polymerů (MIP) si vydobyly širokou pozornost, jakožto nová třída systému aplikace léčiv a nové diagnostické nástroje molekulárních senzorů při léčbě onemocnění. MIP mají velký potenciál pro použití jako DDS (systém aplikace léčiv), ať již poskytováním mechanismu, který omezí rychlost u regulovaných systémů uvolňování, či tím, že budou fungovat jako spouštěč uvolňování terapeuticky prospěšných látek. A to v rámci reakce na vnější podnět nebo budou dokonce fungovat jako snímací prvky poskytující zpětnou vazbu jako součást biologického senzoru. V průběhu uplynulého desetiletí byla podaná řada zpráv o MIP citlivých na bioanalyt.[24]

Na rozdíl od klasických léčiv, která reagují na příznaky, budou CIBP schopny zabránit výskytu příznaků. Pro úplný terapeutický účinek bude nutné, aby CIBP zachytily peptid vylučovaný v nadměrném množství, když je neaktivní, a z těla ho vyloučily.

Mřížková stavba těchto hydrogelů je činí důležitými látkami systémů regulovaného uvolňování pro podávání léčiv a aplikací pro regeneraci tkáně. Tyto hydrogelové sítě mohou chránit citlivé látky před náročnými podmínkami okolního prostředí a v reakci na změnu okolních podmínek mohou nabobtnat, čímž citlivým látkám umožní rozptýlení mimo síť.[2]

2.2 VYUŽITÍ INTELIGENTNÍCH BIOMATERIÁLŮ

Začlenění inteligentních biomateriálů do systémů na mikroelektromechanickém (MEM) a nanoelektromechanickém (NEM) základě je jednou ze slibných cest ve vývoji lepších diagnostických a léčebných systémů pro patofyziologické stavy. Inteligentní biomateriály, založené na MEM nebo NEM systému, jsou v současné době nové a byly vyvinuty pro účely snímacích diagnostických systémů, systémů aplikace léčiv a tkáňového inženýrství.[2]

2.2.1 Snímací diagnostické systémy

Vývoj takových analytických systémů, jako např. „laboratoř na čip“ (lab-on-a-chip), mikrofluidová zařízení a mikromatricové systémy, byl umožněn použitím klasických mikrotechnologií. Základními komponenty těchto systémů jsou senzory, které mohou odhalit specifickou entitu v okolním prostředí. V případě biosenzorů je nutné navrhnout snímací prvky tak, aby reagovaly na specifické biologické molekuly, které je mají odhalovat a měřit.

Ekologicky reaktivní hydrogely, začleněné do aplikací v mikroměřítku, byly použity jako snímací složka u pokročilých snímacích diagnostických systémů.[25] Velmi pokroková

využití reaktivních hydrogelů pro mikrofluidní systémy zaznamenal Beebe se svými spolupracovníky.[26, 2] Mikrostrukturové složky hydrogelu citlivé na pH byly začleněny do mikrokanálků, aby vytvořily mikrochlopně, které by dokázaly snímat podmínky prostředí s dobou reakce do 10 s.[26]

2.2.2 Systémy aplikace léčiv

Pokrok v mikro a nanotechnologiích zvýšil schopnost vytvořit lépe fungující terapeutické dávkovací systémy pro široké spektrum biologických aplikací. Řada úspěšně implantovatelných a orálních systémů aplikace léčiv se skládala ze silikonu, skla, silikonových elastomerů (např. PDMS). Jiné polymery byly vyrobeny za použití standardních mikrotechnologií.[2] Mikrotechnologie výroby bioMEM zařízení pro regulované uvolňování je možnou cestou vývoje nových metod léčby.

Dvěma nejpoužívanějšími konvenčními metodami aplikace léčiv jsou systémy perorálního a parenterálního podávání. Rychlost podání léku ani jeho cílovou oblast není při perorálním či injekčním podání snadné řídit.[27] Tradiční metody aplikace léčiv mají svá omezení i při poskytování dlouhodobé léčby. Mají úzké terapeutické okno, složité dávkovací schéma, kombinovanou terapii a personalizované dávkování.[28] K překonání těchto omezení je nutné vyvinout kombinované systémy léků a zdravotnických zařízení, které mají schopnost chránit účinné složky, přesně regulovat kinetiku uvolňování léku a podávat opakované dávky. Nový kombinovaný systém zdravotnického zařízení a léku rovněž musí být regulovatelný a musí být schopen upravit uvolňování léčivých látek.

Zařízení vyrobená pomocí mikrotechnologie umožňují naprostou kontrolu nad povrchovou mikrostrukturou, topografií a velikostí celého zařízení. Biologické prostředky lze rovněž začlenit do mikrotechnologických systémů. Mikrotechnologie je pro vývoj systémů aplikace léčiv výhodná, protože umožňuje přímou kontrolu nad velikostí, tvarem, počtem zásobníků, jejich objemem i vlastnostmi povrchu systému aplikace léčiv.[27]

2.2.2.1 Mikročipové systémy aplikace léčiv se zásobníkem

Mikrotechnologie vytvořila novou propracovanou třídu systémů regulovaného uvolňování pro terapeutickou aplikaci na základě programovatelných mikrozařízení. Jejich malá velikost, schopnost integrace mikroelektroniky a zároveň schopnost dle potřeby uchovávat a uvolňovat léky z nich činí velice atraktivní systémy pro regulované uvolňování léčiv.[29] Jednotlivé mikročipy se zásobníkem obsahujícím léčebnou látku, které jsou určené pro aplikaci léků, mají oproti jiným typům jednu zásadní výhodu: mají schopnost absolutní

regulace množství a doby aplikace léku pomocí nepřetržité či bolusové aplikace. Toto provedení je rovněž velmi dobře přizpůsobitelné pro množství různých aplikací, neboť vlastnosti uvolňování lze řídit nezávisle pomocí uvolňovacího mechanismu, léčebného preparátu, či konfigurace zásobníku.[2]

Biologicky odbouratelná verze systému aplikace léčiv s více zásobníky je složená ze zásobníků krytých obnovitelnými membránami. Chemické složení či fyzikální vlastnosti membrán ovlivňují dobu jejich odbourání, a proto se liší i doba uvolňování terapeutických přípravků v zásobníku. Tato polymerová zařízení a zásobníky jsou vyrobeny kompresním lisováním z kyseliny polymléčné (PLA). Poměr PLA a PGA (kyselina polyglykolová) a molekulární váha polymerů se za účelem regulace uvolňování u jednotlivých membrán liší.[30]

2.2.2.2 Mikro a nanotechnologie nosičů pro aplikaci léčiv

Metody výroby pomocí fotolitografie a mikro a nanoimprintingové litografie představují slibné alternativy pro výroby nosičů pro aplikaci léčiv. Procesy mikrolisování jsou již propracované a je možné je snadno přizpůsobit výrobě přesně stanovených dvourozměrných a trojrozměrných struktur různých tvarů a velikostí. V nedávné době došlo k úpravě procesu nanoimprintu (S-FIL) a to tak, aby bylo možné vyrábět nanonosiče specifických tvarů, velikostí a průřezových poměrů, které jsou citlivé na okolní prostředí. Univerzální metoda S-FIL umožňuje výrobu prvků specifických tvarů a velikostí v nanoměřítku z biomateriálů, které umožňují síťování. Tento jemný proces rovněž umožňuje do nanočástic začlenit citlivé biomolekuly, jako např. proteiny a DNA.[31]

2.3 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Cílem tkáňového inženýrství je pěstování živých tkání a orgánů pomocí konstrukce ze syntetických nebo přírodních materiálů, které byly vytvořeny či navrženy tak, aby vyvolávaly žádoucí buněčnou reakci. Důležitou podmínkou metod tkáňového inženýrství je, aby poskytovaly buňky s takovým prostředím, které udržuje jejich normální funkci. Pro konstrukce určené pro tkáňové inženýrství jsou nutné biologicky odbouratelné, vstřebatelné a biokompatibilní materiály. Tyto materiály však také musí umožňovat průnik plynů a tekutin konstrukcí k buňkám. Chemické vlastnosti a stavba takové konstrukce ovlivní funkci a výslednou podobu štěpených buněk.[32] Konstrukce fungují jako substrát pro buněčný růst, proliferaci a podporu tvorby nové tkáně.[33]

Dále se intenzivně pracuje na využití mikrotechnologií k vývoji vysoce organizovaných polyesterových biologicky odbouratelných konstrukcí pro regeneraci

tkáně.[32,34] PLA a PGA a jejich kopolymery (PLGA) byly první biologicky odbouratelné polymery použité k vývoji aplikací pro tkáňové inženýrství. Měkká litografie, která používá elastomer PDMS jako hlavní formu mikrotechnologie, se používá při tvorbě PLGA konstrukce.[32, 2] Tato metoda nejen lisuje PLGA do jednotných struktur a tvarů, které stanoví hlavní forma, zároveň ale také do struktury přináší poréznost, což je vlastnost tkáně *in vivo*. S konstrukcemi PLGA jsou spojeny i některé nevýhody. PLGA má pevné mechanické vlastnosti, nežádoucí kinetiku odbourávání a u některých aplikací omezenou biologickou kompatibilitu [34].

Jedny z prvních materiálů, využitých pro vývoj konstrukcí pro účely tkáňového inženýrství, byly syntetické hydrogely.[34] Hydrogely jsou pro aplikace tkáňového inženýrství výhodné, a to kvůli jejich vysoké biologické kompatibilitě, hydrofilitě a stavbě, která se podobá tkáni. Hydrogelové materiály dávají vědcům možnost do zařízení začlenit fyzikální vlastnosti nutné k získání potřebných fyziologických reakcí, jako např. zapouzdření růstových faktorů do hydrogelu za účelem podpory růstu a proliferace buněk. Hydrogely kyseliny polymléčná-g-polyvinylalkohol (PLA-g-PVA) byly vyvinuty pro náhradu srdeční chlopně a pro podporu růstu buněk chlopní.[35]

2.3.1 Biologicky odbouratelné nanokompozity z polymerové matrice pro tkáňové inženýrství

Materiály používané pro aplikace tkáňového inženýrství musí být navrženy tak, aby napodobovaly specifickou buněčnou reakci na molekulární úrovni. Měly by vyvolávat specifickou interakci s buňkou a tedy přímou vazbu s buňkou, proliferaci, diferenciaci a výrobu a uspořádání extracelulární matrix. Volba biomateriálů představuje pro úspěch tkáňového inženýrství zcela klíčový bod.[36]

Základními požadavky na biomateriály používané k obnově tkání jsou biologicky kompatibilní povrchy a vhodné mechanické vlastnosti. Tradiční jednosložkové polymerové materiály tyto nároky nesplňují. Návrh a příprava multisložkových polymerových systémů tedy představuje vhodnou strategii pro vývoj pokrokových multifunkčních biomateriálů.

Obecně platí, že polymerové nanokompozity jsou výsledkem kombinace polymerů a anorganických/organických plniv v řádu nanometrů.[33] Interakce mezi nanostrukturami a polymerovou matricí je základem pro lepší mechanické a funkční vlastnosti nanokompozitů ve srovnání s běžnými mikrokompozity. Nanokompozitní materiály často vykazují vynikající rovnováhu mezi pevností a houževnatostí a obvykle i lepší vlastnosti ve srovnání s jednotlivými komponenty.[37]

Adheze styčných ploch mezi nanočásticemi a polymerovou matricí je hlavním faktorem, který ovlivňuje vlastnosti nanokompozitů. Mechanické vlastnosti nanokompozitů proto reguluje několik mikrostrukturálních parametrů, jako např. vlastnosti matrice, vlastnosti a distribuce plniva, ale i plošné spojování a zároveň také metody syntézy nebo zpracování. Styčné plochy mohou ovlivnit účinnost přenosu zatížení z polymerové matrice na nanostruktury. Z tohoto důvodu je modifikace povrchu nanostruktur nutná k podpoře lepšího rozptylu plniv a ke zvýšení plošné přilnavosti mezi matricí a nanofází.[33, 38]

2.3.2 Současné polymerové matrice pro bionanokompozity

Polymery jsou základní materiály k výrobě konstrukcí pro aplikace tkáňového inženýrství. Lze je třídit na: (1) materiály na přírodním základě, včetně polysacharidů (škrob, alginát, chitin/chitosan, deriváty kyseliny hyaluronové) a proteinů (sója, kolagen, fibrinogely, hedvábí); (2) syntetické polymery, jako např. kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), poly-ε-kaprolakton (PCL), polyhydroxybutyrát (PHB).[33,39]

Syntetické polymery mají relativně dobrou mechanickou pevnost a lze u nich snadno modifikovat tvar a rychlost odbourávání. Jejich povrch je však hydrofobní a projevuje se nedostatek signálů pro rozpoznávání buněk. Přirozeně získané polymery mají teoretickou výhodu biologického rozpoznávání, která může být pozitivní podporou adheze buněk, ale mají špatné mechanické vlastnosti.[33]

PGA, PLA a jejich kopolymery PLGA tvoří rodinu lineárních alifatických polyesterů, které se nejčastěji používají v oboru tkáňového inženýrství.[33, 40] Bylo dokázáno, že jsou biokompatibilní a rozložitelné na netoxické komponenty s regulovatelnou rychlostí odbourávání *in-vivo*. Již dlouho se používají pro vstřebatelné chirurgické šicí materiály, neboť získaly souhlas FDA pro klinické použití.

Tyto polymery se odbourávají hydrolýzou esterových vazeb.[41] Rozkladné produkty se postupně z těla vyloučí ve formě oxidu uhličitého a vody. Rychlost odbourávání lze upravit tak, aby odpovídala požadavkům, a to od několika týdnů až po několik let. Úprava zahrnuje změnu chemického složení, krystalinity, hodnotu a rozložení molekulární hmotnosti.

Aby se mezi PGA a PLA dosáhlo střední rychlosti odbourávání, používají se jejich různé poměry k syntetizaci PLGA.[33, 42] Kopolymery PLGA s různým poměrem PGA/PLA (50:50, 65:35, 75:25, 85:15, 90:10) se v současné době používají pro regeneraci kožní tkáně a obecně jako materiál pro šití.[43]

2.3.3 Současné nanostruktury pro bionanokompozity

Použití hydroxyapatitu (HA), jako biologicky kompatibilního keramického materiálu, je rozšířené v mnoha oblastech medicíny, zejména se však, kvůli své podobnosti s kostními minerály, používá pro kontakt s kostní tkání.[44] Hydroxyapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) je hlavní minerální složkou (69% váhy) lidských tvrdých tkání, může být přírodní či syntetický a má vynikající biokompatibilitu s kostmi, zuby, kůží i svaly, a to jak *in-vitro*, tak i *in-vivo*. HA je biokompatibilní a osteoindukční, jeho použití je rozšířené v obnově tvrdých tkání v ortopedické chirurgii a ve stomatologii.[45, 46]

Se stále větším zájmem se setkává probíhající výzkum nanočástic z ušlechtilých kovů, které vykazují značně odlišné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti od většiny jejich protějšků. Objevy z uplynulých deseti let prokázaly, že elektromagnetické, optické a katalytické vlastnosti nanočástic z takových ušlechtilých kovů, jako je např. zlato, stříbro a platina, výrazně ovlivňuje tvar a velikost. O vlastnostech malých kovových částic, které závisí na velikosti, víme, že přináší specifické optické, elektrochemické a elektronické vlastnosti.[33]

2.4 BIODEGRADACE POLYMERŮ

Dříve se biologické odbourávání definovalo jako rozklad látek působením mikroorganismů. Tento proces vede k recyklaci uhlíku, mineralizaci (CO_2, H_2O a solí) organických látek a vytváření nové biomasy. V současné době již spletité otázce biodegradace – biologického odbourávání lépe rozumíme a nelze ji tak snadno shrnout.[54, 49]

1) Kombinované působení mikrobiálních společenství, další dekompoziční organismy a/nebo abiotické faktory biologicky odbouratelný materiál rozdělují na malé části. Tento krok se nazývá biodeteriorace.[50, 51]
2) Mikroorganismy vylučují katalytické látky (tj. enzymy a volné radikály), které umí štěpit polymerní molekuly, čímž postupně snižují jejich molekulární hmotnost. Tento proces vytváří oligomery, dimery a monomery. Tento krok se nazývá depolymerizace.
3) Některé molekuly jsou rozpoznány receptory mikrobiálních buněk a mohou projít plazmovou membránou. Jiné molekuly zůstanou v extracelulárním prostředí a mohou být předmětem různých modifikací.
4) V cytoplazmě přepravené molekuly integrují mikrobiální metabolismus tak, aby vytvářel energii, novou biomasu, ukládací měchýřky a četné primární a sekundární metabolity. Tento krok se nazývá asimilace.
5) Zároveň se některé jednoduché i složité metabolity mohou vyloučit a dostat se do

extracelulárního prostředí (např. organické kyseliny, aldehydy, terpeny, antibiotika, atd.). Jednoduché molekuly jako CO_2, N_2, CH_4, H_2O a různé soli z intracelulárních metabolitů, které jsou zcela okysličené, se uvolňují do okolního prostředí. Tato fáze se nazývá mineralizace.

Termín „biodegradace“ ukazuje na převahu biologické aktivity v rámci tohoto jevu. V přírodě však biotické a abiotické faktory při rozkladu organické hmoty působí synergicky.[52, 53]

2.4.1 Biodeteriorace

Deteriorace je povrchová degradace, která mění mechanické, fyzikální a chemické vlastnosti daného materiálu. Biodeteriorace je zejména výsledkem činnosti mikroorganismů, rostoucích na povrchu a/nebo uvnitř daného materiálu.[54] Mikroorganismy fungují mechanicky, chemicky a/nebo enzymaticky.[55]

Mikrobiální vývoj závisí na složení a vlastnostech polymerních materiálů. Důležitými parametry jsou i specifické podmínky okolního prostředí (např. vlhkost, počasí a atmosférické polutanty).[56] Mikroorganismy, podílející se na biodeterioraci, jsou velmi různorodé a patří do skupin bakterií, prvoků, řas, hub a lišejníků.[57] Mohou tvořit společenství se strukturovaným uspořádáním, které se nazývá biofilm.[55] Tento mikrobiální film, který funguje synergicky, vyvolává závažné poškození různých materiálů. Vývoj různých mikrobiálních druhů ve specifickém pořadí zvyšuje biodeterioraci a tak umožňuje tvorbu jednoduchých molekul. Všechny tyto látky fungují jako zdroje uhlíku a dusíku, ale i jako růstové faktory pro mikroorganismy.[54]

2.4.2 Chemická cesta biodeteriorace

Extracelulární polymery, které mikroorganismy produkují, mohou fungovat jako povrchově aktivní látky, které umožňují výměnu mezi hydrofilními a hydrofobními fázemi. Tyto interakce podporují rychlosti průniku u mikrobiálních druhů. Podle Warscheida a Braamse (2000) navíc přítomnost slizu zvyšuje akumulaci atmosférických polutantů a tato akumulace podporuje vývoj mikroorganismů a zrychluje biodeterioraci.[58]

Všechny druhy mikrobiální flóry, které se v materiálech postupně vyvinou, přispívají k chemické biodeterioraci. Chemolitotrofní bakterie používají anorganické sloučeniny (např. amoniak, dusitany, sirovodík, thiosírany a elementární síru) jako zdroj energie a elektronů (Regnault, 1990). Mohou uvolňovat účinné chemikálie, jako např. kyselinu dusitou (*Nitrosomonas* spp.), kyselinu dusičnou (*Nitrobacter* spp.) nebo kyselinu sírovou (*Thiobacillus* spp.). Chemoorganotrofní mikroorganismy používají organické substráty jako

zdroje uhlíku, energie a elektronů.[54] Uvolňují organické kyseliny, jako např. kyselinu šťavelovou, citronovou, glukonovou, glutarovou, glyoxalovou, oxaloctovou a fumarovou.[59]

Kyselina jantarová, adipová, mléčná i jiné kyseliny, stejně jako butandiol se uvolňují abiotickou a/nebo biotickou hydrolýzou některých polymerů (např. PBS, PBA a PLA).[54]

Tyto kyseliny fungují různými způsoby. Některé mohou reagovat s komponenty materiálu a zvýšit erozi povrchu.[56] Jiné mohou odloučit přítomné kationty do matrice (např. Ca^{2+}, Al^{3+}, Si^{4+}, Fe^{2+}, Mn^{2+} a Mg^{2+}) a vytvořit stabilní komplexy. Organické kyseliny jsou pro ustálení kationtů účinnější než kyseliny minerální. Považují se za jedny z hlavních příčin biodeteriorace.[60]

Chemická biodeteriorace může být rovněž důsledkem oxidačních procesů. Některé chemolitotrofní bakterie i některé houby mohou z matrice oxidační reakcí přijímat kationty železa a manganu. Používají speciální proteiny, umístěné do buněčných membrán, které chytají siderofory (tj. sloučeniny chelatující železo, vyloučené jinými mikroorganismy) za účelem znovu získat atomy železa. Redukční reakce mohou probíhat ve fotosyntetických strukturách se siderofory za přítomnosti kyslíku. Některé extracelulární enzymy, zejména peroxidáza, jsou schopné spojit oxidaci kationtů a katalytické odbourávání uhlovodíků.[54]

2.4.3 Odbourávání PLA

K odbourávání polymerů dochází zejména štěpením hlavních či postranních řetězců makromolekul. V přírodě odbourávání polymerů vyvolává tepelná aktivace, hydrolýza, biologická aktivita (tj. enzymy), oxidace, fotolýza nebo radiolýza.[62] Z důvodů koexistence biotických a abiotických procesů by se celý mechanismus odbourávání polymerů v mnoha případech mohl nazývat environmentální degradací. Součástí odbourávání polymerů může být řada chemických, fyzikálních a biologických procesů a tedy různých mechanismů odbourávání.

Faktory související s prostředím ovlivňují nejen polymer, který má být odbourán, ale mají i rozhodující vliv na mikrobiální populaci a samotnou aktivitu různých mikroorganismů. Parametry, jako např. vlhkost, teplota, pH, salinita, přítomnost či nepřítomnost kyslíku a zásobování různými živinami mají na mikrobiální odbourávání polymerů významný vliv a tyto podmínky je tedy při testování biologické odbouratelnosti polymerů třeba zvážit. Celý proces rovněž závisí na chemických a fyzikálních vlastnostech polymeru, jako např. na difuzivitě, poréznosti, morfologii, síťování, čistotě, chemické reaktivitě, mechanické pevnosti, tepelné toleranci a odolnosti proti elektromagnetickému záření.[63]

Bylo zjištěno, že odbourávání PLA závisí na řadě faktorů, jako např. na molekulární

hmotnosti, krystalinitě, čistotě, teplotě, pH, přítomnosti koncových karboxylových nebo hydroxylových skupin, propustnosti vody a aditivech, které se chovají katalyticky, mezi něž mohou patřit enzymy, bakterie či anorganická plniva.[64]

PLA lze vařící vodou nebo párou hydrolyzovat na kyselinu mléčnou, kterou lze recyklovat zpět na monomer. To by mohlo vést k molekulární recyklaci, což by umožnilo recyklaci jak materiálů z výrobního závodu, tak recyklaci spotřebitelských balení. PLA lze hydrolyzovat od 180 ºC do 350 ºC po dobu až 30 minut s tím, že získáme L-kyselinu mléčnou jako konečný produkt.[65]

O PLA se rovněž tvrdí, že v „řízeném kompostovacím prostředí“ se rozkládá na oxid uhličitý a vodu za méně než 90 dní. Kompostování je zrychlené odbourávání heterogenních organických látek za řízených podmínek, pomocí mikrobiálních populací ve vlhkém, teplém a aerobním prostředí.[66]

Co se biologické odbouratelnosti týče, bylo potvrzeno, že PLA se přirozeně odbourává v půdě nebo kompostu a to přesto, že o PLA víme, že je v přirozeném prostředí k odbourávání méně příhodný než jiné alifatické biologicky odbouratelné polymery, jako např. poly-ε-kaprolakton (PCL).[66] Bylo zaznamenáno, že produkty hydrolytického odbourávání PLA mohou být zcela asimilovány takovými mikroorganismy, jako jsou houby nebo bakterie.[47, 48, 61] Biologické odbourávání PLA a jeho kopolymerů se obvykle provádí esterázami, proteinázami a lipázami vyloučenými z mikroorganismů.

Rychlost odbourávání PLA se výrazně zrychlila přidáním 0,1% želatiny do základního média, což naznačuje, že želatina aktivuje enzym, který je schopen odbourávání PLA.[63]

3 CÍL PRÁCE

Záměrem bylo upřesnit a rozšířit dosavadní znalosti o pulzním průběhu bobtnání polyesterových a polyesteramidových matric. Úkolem bylo ověřit dosavadní výsledky testování eroze a bobtnání při 7 °C a rozšířit je o studium chování při 22 °C. Dále byl zadán cíl vyzkoušet vliv různé hmotnosti matric z lineárního polyesteru a z větveného polyesteru. Některé vzorky bylo zadáno připravit litím taveniny do forem a sledovat jejich bobtnání kontinuálně v časové řadě odběru vzorků nedestruktivním způsobem.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

4.1.1 Chemikálie

- Oligoesterové nosiče, Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (Tab. 1)
- Čištěná voda reverzní osmózou, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

4.1.2 Přístroje

- Váhy digitální, KERN 440-53 (max. 6000g, d=1g)
- Analytické digitální váhy, KERN ABS 220-4 (max. 220g, d=0,1mg)
- Horkovzdušná sušárna, HSPT.200
- Vakuová sušárna, BINDER APT.line TM VD 23
- Vysoušeč vlasů, Remington Professional

4.1.3 Pomůcky

- scintilační lahvičky
- skalpel
- pinzety
- štítky
- kádinky
- buničitá vata a gáza
- špejle
- hadičky ze silikonové pryže (se jmenovitým vnitřním průměrem 2 mm)
- injekční stříkačka
- kleště

4.1.4 Charakteristika použitých oligoesterových nosičů

- Syntéza PLGA: stupňová kopolymerace směsi složené z ekvimolárního podílu kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové
- U nosiče T3 se při polykondenzační reakci zabudovává tripentaerythritol jako větvící složka v koncentraci 3%

Tab. 1: Charakteristika testovaných oligoesterů

Označení	Mn	Mw	Mz	Mz-1	Mn/Mw	Tg	Cp
PLGA	1 833	4 086	6 494	8 818	2,23	17,0	0,902
T3	3 355	13 334	27 152	43 224	3,97	21,7	0,508

Vysvětlivky k Tab. 1:

PLGA – kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové, T3 – terpolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové s tripentaerytritolem, Mn – číselně střední relativní molekulová hmotnost, Mw – hmotnostně střední relativní molekulová hmotnost, Mn/Mw – stupeň polydisperzity, Tg – teplota skelného přechodu, Cp – specifická tepelná kapacita

4.2 STANOVENÍ STUPNĚ BOBTNÁNÍ A EROZE TESTOVANÉHO NOSIČE

4.2.1 Příprava vzorků testovaných nosičů

Testované polymery byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Z těchto polymerů byla pomocí skalpelu odřezáváním a odlamováním fragmentů připravena tělíska o požadované hmotnosti 50,0 mg ± 5% a 100,0 mg ± 5%. Jednotlivá tělíska byla přenesena do scintilačních lahviček označených štítkem.

Pro označování štítků byla použita následující symbolika:

Druh polymeru (L/T) - hmotnost polymeru (50/100) - opakování vzorku (A/B/C) - dny bobtnání polymeru - teplota uchovávání polymeru

Vysvětlivky zkratek:

L PLGA – kopolymer kyselin glykolové a kyseliny mléčné

T oligoesterový nosič s přídavkem tripentaerythritolu

50 hmotnost tělíska 50,0 mg ± 5%

100 hmotnost tělíska 100,0 mg ± 5%

A opakování vzorku

B opakování vzorku

C opakování vzorku

7 uchovávání vzorku při teplotě 7 °C

22 uchovávání vzorku při teplotě 22 °C

4.2.2 Postup při stanovení stupně bobtnání a eroze destruktivní zkouškou pro PLGA / T3 připravených mechanickou fragmentací polymeru

Tělísko zkoušeného polymeru o požadované velikosti bylo zváženo, tato hmotnost zaznamenána jako m_0 a přeneseno do vytárované označené scintilační lahvičky. Do každé scintilační lahvičky se vzorkem bylo přidáno 15,0 g média (čištěná voda), následně byly

lahvičky uzavřeny a ponechány při teplotě 22 °C nebo 7 °C. V předem stanovených časových intervalech bylo médium opatrně vylito, stěny lahviček osušeny buničitou vatou namotanou na špejli a krátce dosušeny na povrchu pomoci vysoušeče vlasů. Scintilační lahvičky s nabobtnaným polymerem byly zváženy na analytických vahách a hmotnost zaznamenána jako m_b. Následovalo umístění lahviček s tělísky do vakuové sušárny a sušení do konstantní hmotnosti při teplotě 24 °C. Po vysušení byly lahvičky se vzorky opět zváženy a jejich hmotnost zaznamenána do tabulky jako m_s. Médium (čištěná voda) se každý den vyměňovalo za médium nové o stejné hmotnosti 15,0 g. Pro každý časový interval se pracovalo se třemi tvarově a hmotnostně velmi podobnými vzorky jen s malými odchylkami (označenými písmeny A, B, C) daného polymeru o dvou různých hmotnostech tělísek (50,0 mg ± 5%, 100,0 mg ± 5%).

4.2.3 Postup při stanovení bobtnání nedestruktivní zkouškou pro PLGA připravených formováním taveniny

Tělíska zkoušeného polymeru PLGA pro tuto zkoušku byla připravena odlišným způsobem. Lišila se také tvarem a velikostí povrchu. Polymer byl roztaven v horkovzdušné sušárně při 60 – 80 °C, následně byla tavenina podtlakem nasáta do hadičky ze silikonové pryže (se jmenovitým vnitřním průměrem 2 mm) pomocí injekční stříkačky a ponechána ztuhnout. Tento postup byl opakován z důvodu rychlého tuhnutí polymeru v hadičce. Poté byla ze ztuhlého polymeru opatrně oddělena hadička a skalpelem bylo polymerní těleso rozděleno na tělíska válcovitého tvaru přibližně stejné velikosti s hmotností 44,0 mg ± 5%. Tělíska byla zvážena na analytických vahách, tato hmotnost zaznamenána jako $m_{0.}$ Potom byla tělíska přenesena do vytárovaných a označených scintilačních lahviček. Do každé scintilační lahvičky se vzorkem bylo přidáno 15,0 g media (čištěná voda o teplotě 7 °C), následně byly lahvičky uzavřeny a ponechány při teplotě 7 °C. V předem stanovených časových intervalech bylo médium opatrně vylito, tělísko bylo opatrně přeneseno na buničitou gázu a na povrchu vysušeno. Poté bylo tělísko nabobtnalého polymeru zváženo, hmotnost zaznamenána jako m_b a opatrně přeneseno zpět do scintilační lahvičky. Médium (čištěná voda o teplotě 7 °C) bylo znovu doplněno v množství 15,0 g a vzorek ponechán při teplotě 7 °C do dalšího vážení. Pro každý časový interval se pracovalo s devíti vzorky (A, B, C, D, E, F, G, H, I) daného polymeru a s hmotností tělíska 44,0 mg ± 5%.

4.2.4 Vzorce na výpočet bobtnání a eroze

Stupeň bobtnání pro destruktivní provedení zkoušky:

$$B = \frac{mb - ms}{ms} . 100\ [\%]$$

B *stupeň bobtnání v %*

mb *hmotnost vzorku po nabobtnání v čase t*

ms *hmotnost vzorku po vysušení*

Stupeň eroze pro destruktivní provedení zkoušky:

$$E = \frac{1 - (mo - ms)}{mo} . 100\ [\%]$$

E *stupeň eroze v %*

mo *hmotnost původní navážky vzorku*

ms *hmotnost vzorku po vysušení*

Stupeň bobtnání pro nedestruktivní provedení zkoušky:

$$B = \frac{mb - mo}{mo} . 100\ [\%]$$

B *stupeň bobtnání v %*

mb *hmotnost vzorku po nabobtnání v čase t*

mo *hmotnost vzorku z původní navážky*

5 VÝSLEDKY

5.1 TABULKY

Tab. 2: Stupeň bobtnání (S) a stupeň eroze (E) matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)

		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-50-0,25-A-7	0,25	52,1	76,3	51,2	49,0	98,3
T-50-0,5-A-7	0,5	48,3	56,7	48,6	16,7	100,6
T-50-1-A-7	1	47,5	70,2	47,4	48,1	99,8
T-50-1,5-A-7	1,5	51,6	64,7	51,8	24,9	100,4
T-50-2-A-7	2	50,8	68,0	50,7	34,1	99,8
T-50-3-A-7	3	51,2	68,1	50,8	34,1	99,2
T-50-4-A-7	4	50,7	62,9	50,5	24,6	99,6
T-50-5-A-7	5	52,4	60,1	48,3	24,4	99,2
T-50-6-A-7	6	51,7	64,7	41,3	26,1	99,2
T-50-7-A-7	7	47,6	58,7	47,3	24,1	99,4
T-50-8-A-7	8	50,4	60,6	49,9	21,4	99,0
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-50-0,25-B-7	0,25	49,0	63,2	49,0	28,9	100,0
T-50-0,5-B-7	0,5	50,3	64,0	55,4	15,5	110,1
T-50-1-B-7	1	51,6	73,1	51,6	41,7	100,0
T-50-1,5-B-7	1,5	50,7	59,5	50,7	17,4	100,0
T-50-2-B-7	2	48,7	61,2	48,4	26,4	99,4
T-50-3-B-7	3	51,3	56,9	51,1	11,4	99,6
T-50-4-B-7	4	48,7	58,1	48,3	20,3	99,2
T-50-5-B-7	5	52,1	61,4	51,9	18,3	99,6
T-50-6-B-7	6	51,8	59,1	51,5	14,8	99,4
T-50-7-B-7	7	47,8	58,1	47,0	23,6	98,3
T-50-8-B-7	8	49,9	60,0	50,2	19,5	100,6
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-50-0,25-C-7	0,25	47,6	56,7	47,6	19,1	100,0
T-50-0,5-C-7	0,5	48,3	52,2	48,4	7,9	100,2
T-50-1-C-7	1	51,8	65,9	51,6	27,7	99,6
T-50-1,5-C-7	1,5	52,2	59,2	52,5	12,8	100,6
T-50-2-C-7	2	50,9	60,2	50,7	18,7	99,6
T-50-3-C-7	3	47,9	49,7	47,7	4,2	99,6
T-50-4-C-7	4	50,2	54,0	49,4	9,3	98,4
T-50-5-C-7	5	51,1	60,3	51,1	18,0	100,0
T-50-6-C-7	6	49,7	55,0	49,6	10,9	99,8
T-50-7-C-7	7	48,0	53,8	47,4	13,5	98,7
T-50-8-C-7	8	49,8	58,8	49,6	18,5	99,6

Tab. 3: Stupeň bobtnání (S) a stupeň eroze (E) matrice T3 (T) o hmotnosti 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)

		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-100-0,25-A-7	0,25	99,5	120,4	97,7	23,2	98,2
T-100-0,5-A-7	0,5	103,2	136,7	103,1	32,6	99,9
T-100-1-A-7	1	99,0	133,4	98,3	35,7	99,3
T-100-1,5-A-7	1,5	99,6	110,5	99,5	11,1	99,9
T-100-2-A-7	2	100,6	129,4	100,6	28,6	100,0
T-100-3-A-7	3	98,0	114,9	98,0	17,2	100,0
T-100-4-A-7	4	100,6	118,0	100,5	17,4	99,9
T-100-5-A-7	5	101,4	116,2	100,9	15,2	99,5
T-100-6-A-7	6	96,1	112,7	95,9	17,5	99,8
T-100-7-A-7	7	98,9	118,6	99,6	19,1	100,7
T-100-8-A-7	8	102,4	112,6	98,9	13,9	96,6
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-100-0,25-B-7	0,25	97,7	108,1	97,3	11,1	99,6
T-100-0,5-B-7	0,5	98,2	108,6	97,5	11,4	99,3
T-100-1-B-7	1	101,4	129,7	101,2	28,2	99,8
T-100-1,5-B-7	1,5	105,0	115,7	105,0	10,2	100,0
T-100-2-B-7	2	98,0	109,0	98,1	11,1	100,1
T-100-3-B-7	3	95,9	106,4	92,5	15,0	96,5
T-100-4-B-7	4	95,3	103,8	95,3	8,9	100,0
T-100-5-B-7	5	95,1	106,4	94,0	13,2	98,8
T-100-6-B-7	6	104,7	121,6	104,7	16,1	100,0
T-100-7-B-7	7	100,5	114,6	100,5	14,0	100,0
T-100-8-B-7	8	98,6	109,7	97,9	12,1	99,3
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-100-0,25-C-7	0,25	96,9	103,6	96,6	7,2	99,7
T-100-0,5-C-7	0,5	103,9	114,6	103,8	10,4	99,9
T-100-1-C-7	1	101,5	123,8	101,4	22,1	99,9
T-100-1,5-C-7	1,5	101,4	111,7	101,7	9,8	100,3
T-100-2-C-7	2	101,4	108,0	101,7	6,2	100,3
T-100-3-C-7	3	104,2	118,3	104,2	13,5	100,0
T-100-4-C-7	4	100,6	102,9	100,8	2,9	100,2
T-100-5-C-7	5	96,2	98,0	94,4	3,8	98,1
T-100-6-C-7	6	100,6	112,6	100,6	11,9	100,0
T-100-7-C-7	7	100,9	112,6	101,5	10,9	100,6
T-100-8-C-7	8	95,4	100,9	95,5	5,7	100,1

Tab. 4: Stupeň bobtnání (S) a stupeň eroze (E) matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)

		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-50-0,25-A-7	0,25	51,5	70,4	51,4	36,9	99,8
L-50-0,5-A-7	0,5	51,1	59,8	51,0	17,3	99,8
L-50-1-A-7	1	50,5	65,8	50,8	29,5	100,6
L-50-1,5-A-7	1,5	51,4	56,3	51,5	9,3	100,2
L-50-2-A-7	2	51,6	61,2	50,5	21,2	97,9
L-50-3-A-7	3	50,7	60,7	50,5	20,2	99,6
L-50-4-A-7	4	48,5	57,4	48,3	18,8	99,6
L-50-5-A-7	5	51,5	64,0	51,8	23,6	100,6
L-50-6-A-7	6	50,5	64,6	50,4	28,2	99,8
L-50-7-A-7	7	51,7	58,4	51,7	12,9	100,0
L-50-8-A-7	8	50,3	64,6	50,3	28,4	100,0
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-50-0,25-B-7	0,25	49,7	62,2	49,5	25,7	99,6
L-50-0,5-B-7	0,5	49,9	56,4	49,3	14,4	98,8
L-50-1-B-7	1	51,8	65,8	51,9	26,8	100,2
L-50-1,5-B-7	1,5	50,5	54,3	50,3	7,9	99,6
L-50-2-B-7	2	50,5	60,2	50,4	19,4	99,8
L-50-3-B-7	3	50,5	59,5	49,9	19,2	98,8
L-50-4-B-7	4	51,5	54,2	51,5	5,2	100,0
L-50-5-B-7	5	51,7	58,6	51,4	14,0	99,4
L-50-6-B-7	6	49,5	56,6	49,4	14,6	99,8
L-50-7-B-7	7	51,4	56,4	51,3	9,9	99,8
L-50-8-B-7	8	51,1	60,5	51,7	17,0	101,2
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-50-0,25-C-7	0,25	51,4	59,5	51,8	14,9	100,8
L-50-0,5-C-7	0,5	52,4	57,4	52,4	9,5	100,0
L-50-1-C-7	1	51,4	53,8	51,1	5,3	99,4
L-50-1,5-C-7	1,5	51,1	53,5	51,3	4,3	100,4
L-50-2-C-7	2	50,8	59,7	50,7	17,8	99,8
L-50-3-C-7	3	50,1	59,6	50,0	19,2	99,8
L-50-4-C-7	4	52,1	54,2	52,1	4,0	100,0
L-50-5-C-7	5	50,5	52,6	50,1	4,9	99,2
L-50-6-C-7	6	50,1	54,2	49,4	9,7	98,6
L-50-7-C-7	7	51,2	55,4	51,4	7,8	100,4
L-50-8-C-7	8	49,8	58,7	50,2	16,9	100,8

Tab. 5: Stupeň bobtnání (S) a stupeň eroze (E) matrice PLGA (L) o hmotnosti 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)

		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-100-0,25-A-7	0,25	102,5	113,1	102,7	10,2	100,2
L-100-0,5-A-7	0,5	98,8	120,4	99,5	21,0	100,7
L-100-1-A-7	1	99,8	133,1	99,9	33,2	100,1
L-100-1,5-A-7	1,5	101,4	112,6	101,9	10,5	100,5
L-100-2-A-7	2	103,2	130,6	103,2	26,6	100,0
L-100-3-A-7	3	101,9	123,0	102,2	20,4	100,3
L-100-4-A-7	4	103,3	113,5	102,9	10,3	99,6
L-100-5-A-7	5	98,1	111,2	98,0	13,5	99,9
L-100-6-A-7	6	98,5	110,1	98,7	11,6	100,2
L-100-7-A-7	7	102,9	119,7	102,9	16,3	100,0
L-100-8-A-7	8	102,2	120,9	101,6	18,9	99,4
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-100-0,25-B-7	0,25	100,7	111,3	100,9	10,3	100,2
L-100-0,5-B-7	0,5	101,1	120,5	101,2	19,1	100,1
L-100-1-B-7	1	101,6	113,2	101,9	11,1	100,3
L-100-1,5-B-7	1,5	101,8	110,7	102,3	8,2	100,5
L-100-2-B-7	2	103,0	121,3	103,4	17,3	100,4
L-100-3-B-7	3	98,1	110,4	98,4	12,2	100,3
L-100-4-B-7	4	100,8	110,4	100,8	9,5	100,0
L-100-5-B-7	5	99,1	111,5	99,7	11,8	100,6
L-100-6-B-7	6	97,6	107,5	96,8	11,1	99,2
L-100-7-B-7	7	102,0	115,7	102,0	13,4	100,0
L-100-8-B-7	8	103,5	117,4	103,8	13,1	100,3
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-100-0,25-C-7	0,25	102,5	111,3	103,0	8,1	100,5
L-100-0,5-C-7	0,5	96,3	109,9	96,0	14,5	99,6
L-100-1-C-7	1	101,8	107,0	102,1	4,8	100,3
L-100-1,5-C-7	1,5	103,3	105,8	103,5	2,2	100,2
L-100-2-C-7	2	104,4	109,8	104,8	4,8	100,4
L-100-3-C-7	3	101,2	108,1	101,4	6,6	100,2
L-100-4-C-7	4	103,2	111,2	102,8	8,2	99,6
L-100-5-C-7	5	100,3	109,6	100,5	9,1	100,2
L-100-6-C-7	6	102,6	111,2	102,9	8,1	100,3
L-100-7-C-7	7	99,7	112,0	99,9	12,1	100,2
L-100-8-C-7	8	95,6	107,9	95,5	12,9	99,9

Tab. 6: Stupeň bobtnání (S) a stupeň eroze (E) matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C (vzorky A, B, C)

		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-50-0,25-A-22	0,25	50,9	53,7	51,1	5,1	100,4
T-50-0,5-A-22	0,5	51,9	63,1	51,9	21,9	100,0
T-50-1-A-22	1	48,8	53,0	48,6	9,1	99,6
T-50-1,5-A-22	1,5	49,8	54,9	43,4	26,5	87,1
T-50-2-A-22	2	51,6	60,9	51,6	18,0	100,0
T-50-3-A-22	3	47,6	63,2	41,6	51,9	87,4
T-50-4-A-22	4	50,0	81,6	50,2	62,5	100,4
T-50-5-A-22	5	50,4	65,4	50,4	29,8	100,0
T-50-6-A-22	6	47,6	71,1	50,2	41,6	105,5
T-50-7-A-22	7	51,1	75,7	51,8	46,1	101,4
T-50-8-A-22	8	51,3	93,5	52,4	78,4	102,1
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-50-0,25-B-22	0,25	52,1	53,2	52,3	1,7	100,4
T-50-0,5-B-22	0,5	51,1	56,9	51,0	11,6	99,8
T-50-1-B-22	1	51,5	56,1	51,2	9,6	99,4
T-50-1,5-B-22	1,5	47,9	53,8	46,7	15,2	97,5
T-50-2-B-22	2	50,0	56,6	50,1	12,9	100,2
T-50-3-B-22	3	51,9	66,8	51,6	29,5	99,4
T-50-4-B-22	4	49,2	75,0	48,6	54,3	98,8
T-50-5-B-22	5	52,0	63,7	51,9	22,7	99,8
T-50-6-B-22	6	51,2	69,6	51,3	35,7	100,2
T-50-7-B-22	7	48,0	68,6	48,0	42,9	100,0
T-50-8-B-22	8	49,6	89,0	50,3	76,9	101,4
		mo	mb	ms	S	E
vzorky	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
T-50-0,25-C-22	0,25	52,0	52,4	52,1	0,6	100,2
T-50-0,5-C-22	0,5	49,2	50,4	49,5	1,8	100,6
T-50-1-C-22	1	50,4	54,5	50,1	8,8	99,4
T-50-1,5-C-22	1,5	49,7	54,9	48,7	12,7	97,9
T-50-2-C-22	2	49,1	53,8	49,0	9,8	99,8
T-50-3-C-22	3	51,8	63,2	51,8	22,0	100,0
T-50-4-C-22	4	49,6	74,7	50,0	49,4	100,8
T-50-5-C-22	5	51,3	62,0	51,7	19,9	100,8
T-50-6-C-22	6	52,4	70,8	52,8	34,1	100,7
T-50-7-C-22	7	48,7	67,2	49,2	36,6	101,0
T-50-8-C-22	8	49,7	74,3	49,7	49,5	100,0

Tab. 7: Stupeň bobtnání (S) a stupeň eroze (E) matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C (vzorky A, B, C)

		mo	mb	ms	S	E
vzorek	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-50-0,25-A-22	0,25	51,9	61,3	51,9	18,1	100,0
L-50-0,5-A-22	0,5	50,0	61,3	50,8	20,7	101,6
L-50-1-A-22	1	51,8	56,3	52,2	7,8	100,8
L-50-1,5-A-22	1,5	49,2	59,2	49,7	19,1	101,0
L-50-2-A-22	2	52,0	60,0	52,4	14,5	100,8
L-50-3-A-22	3	51,6	61,6	51,5	19,6	99,8
L-50-4-A-22	4	50,3	70,3	50,9	38,1	101,2
L-50-5-A-22	5	48,7	54,8	48,7	12,5	100,0
L-50-6-A-22	6	48,5	57,8	48,9	18,2	100,8
L-50-7-A-22	7	48,5	63,2	48,7	29,8	100,4
L-50-8-A-22	8	47,6	71,0	48,1	47,6	101,1
		mo	mb	ms	S	E
vzorek	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-50-0,25-B-22	0,25	51,3	55,2	50,6	9,1	98,6
L-50-0,5-B-22	0,5	47,5	56,0	47,5	17,9	100,0
L-50-1-B-22	1	52,0	55,9	52,8	5,9	101,5
L-50-1,5-B-22	1,5	48,1	56,7	48,4	17,2	100,6
L-50-2-B-22	2	50,7	57,9	51,1	13,3	100,8
K-50-3-B-22	3	51,5	60,6	51,6	17,4	100,2
L-50-4-B-22	4	48,1	60,9	48,2	26,3	100,2
L-50-5-B-22	5	47,5	53,4	47,9	11,5	100,8
L-50-6-B-22	6	50,2	59,4	50,5	17,6	100,6
L-50-7-B-22	7	49,6	61,2	49,6	23,3	100,0
L-50-8-B-22	8	50,6	68,1	50,9	33,8	100,6
		mo	mb	ms	S	E
vzorek	dny	mg			%	
	0				0,0	100,0
L-50-0,25-C-22	0,25	47,5	52,0	47,9	8,6	100,8
L-50-0,5-C-22	0,5	49,8	56,5	49,9	13,2	100,2
L-50-1-C-22	1	51,2	54,3	52,1	4,2	101,8
L-50-1,5-C-22	1,5	51,2	58,2	51,7	12,6	100,9
L-50-2-C-22	2	49,1	55,1	49,9	10,4	101,6
L-50-3-C-22	3	51,5	56,1	50,6	10,9	98,3
L-50-4-C-22	4	50,5	61,4	50,3	22,1	99,6
L-50-5-C-22	5	50,9	56,9	51,2	11,1	100,6
L-50-6-C-22	6	51,7	60,6	51,7	17,2	100,0
L-50-7-C-22	7	52,1	62,9	52,1	20,7	100,0
L-50-8-C-22	8	49,4	64,6	50,7	27,4	102,6

Tab. 8: Hmotnost zbobtnalých tělísek z matrice PLGA (L) připravených formováním taveniny o hmotnosti 44 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)

	vzorky	mo	čas (dny)																	
		mg	0,25	0,315	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
m	L-44-A-7	43,5	43,7	44,0	44,2	44,0	44,4	44,4	44,6	44,6	44,8	44,8	45,0	45,2	45,1	45,3	45,4	45,4	45,5	45,7
S	L-44-A-7		0,46	1,15	1,61	1,15	2,07	2,07	2,53	2,53	2,99	2,99	3,45	3,91	3,68	4,14	4,37	4,37	4,60	5,06
m	L-44-B-7	43,4	43,8	44,0	44,1	43,7	44,3	44,4	44,6	44,5	44,7	44,8	44,7	44,7	44,9	45,0	45,0	45,2	45,3	45,4
S	L-44-B-7		0,92	1,38	1,61	0,69	2,07	2,30	2,76	2,53	3,00	3,23	3,00	3,00	3,46	3,69	3,69	4,15	4,38	4,61
m	L-44-C-7	44,3	43,9	44,3	44,5	43,8	44,4	44,5	44,6	44,6	44,8	44,8	44,9	44,8	44,8	45,0	45,1	45,3	45,4	45,6
S	L-44-C-7		1,15	2,07	2,53	0,92	2,30	2,53	2,76	2,76	3,23	3,23	3,46	3,23	3,23	3,69	3,92	4,38	4,61	5,07
m	L-44-D-7	43,7	44,4	44,4	44,4	44,1	44,7	44,7	45,1	45,0	45,2	45,0	45,2	45,3	45,1	45,6	45,8	45,9	45,9	46,0
S	L-44-D-7		1,60	1,60	1,60	0,92	2,29	2,29	3,20	2,97	3,43	2,97	3,43	3,66	3,20	4,35	4,81	5,03	5,03	5,26
m	L-44-E-7	43,4	44,0	43,8	43,9	43,5	44,1	44,1	44,4	44,5	44,6	44,4	44,4	44,3	44,9	45,2	45,2	45,2	45,4	45,6
S	L-44-D-7		1,38	0,92	1,15	0,23	1,61	1,61	2,30	2,53	2,76	2,30	2,30	2,07	3,46	4,15	4,15	4,15	4,61	5,07
m	L-44-F-7	43,6	44,3	44,2	44,2	43,9	44,5	44,6	45,0	44,6	45,1	44,8	45,2	45,4	45,4	45,7	45,8	45,8	46,0	46,0
S	L-44-F-7		1,61	1,38	1,38	0,69	2,06	2,29	3,21	2,29	3,44	2,75	3,67	4,13	4,13	4,82	5,05	5,05	5,50	5,50
m	L-44-G-7	44,2	44,8	44,7	44,8	44,3	44,8	44,8	45,5	44,8	45,5	45,4	45,5	45,7	45,8	46,2	46,0	46,0	46,2	46,6
S	L-44-G-7		1,36	1,13	1,36	0,23	1,36	1,36	2,94	1,36	2,94	2,71	2,94	3,39	3,62	4,52	4,07	4,07	4,52	5,43
m	L-44-H-7	43,8	44,7	44,4	44,7	44,1	44,7	44,7	45,1	44,8	45,5	45,6	45,7	45,9	45,8	46,0	46,0	46,0	46,2	46,5
S	L-44-H-7		2,05	1,37	2,05	0,68	2,05	2,05	2,97	2,28	3,88	4,11	4,34	4,79	4,57	5,02	5,02	5,02	5,48	6,16
m	L-44-I-7	43,7	43,7	44,4	44,5	43,8	44,3	44,3	44,7	44,3	44,9	45,1	45,2	45,3	45,4	45,5	45,4	45,6	45,8	45,9
S	L-44-I-7		0,23	1,60	1,83	0,23	1,37	1,37	2,29	1,37	2,75	3,20	3,43	3,66	3,89	4,12	3,89	4,35	4,81	5,03

Tab. 9: Průměr hodnot stupně bobtnání z jednotlivých měření; matrice PLGA (L); prostředí čištěné vody při 7°C; vzorky byly připraveny formováním taveniny; počáteční průměrná hmotnost tělísek 43,6 mg

čas (dny)	ø S (%)
0,25	1,17
0,315	1,40
0,5	1,68
1	0,63
1,5	1,91
2	1,99
2,5	2,78
3	2,29
3,5	3,16
4	3,60
4,5	3,34
5	3,54
5,5	3,69
6	4,28
6,5	4,29
7	4,52
7,5	4,74
8	5,23

Tab. 10: Průměr stupně bobtnání (vzorků A, B, C) matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg a 100mg v prostředí čištěné vody při 7 °C

	ø S	
dny	T-50-7	T-100-7
0	0,0	0,0
0,25	32,4	13,9
0,5	17,2	18,1
1	39,2	28,7
1,5	18,3	10,4
2	26,4	15,3
3	16,5	15,3
4	18,1	9,5
5	18,9	10,7
6	17,3	15,2
7	20,4	14,7
8	19,8	10,5

Tab. 11: Průměr stupně bobtnání (vzorků A, B, C) matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg a 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C

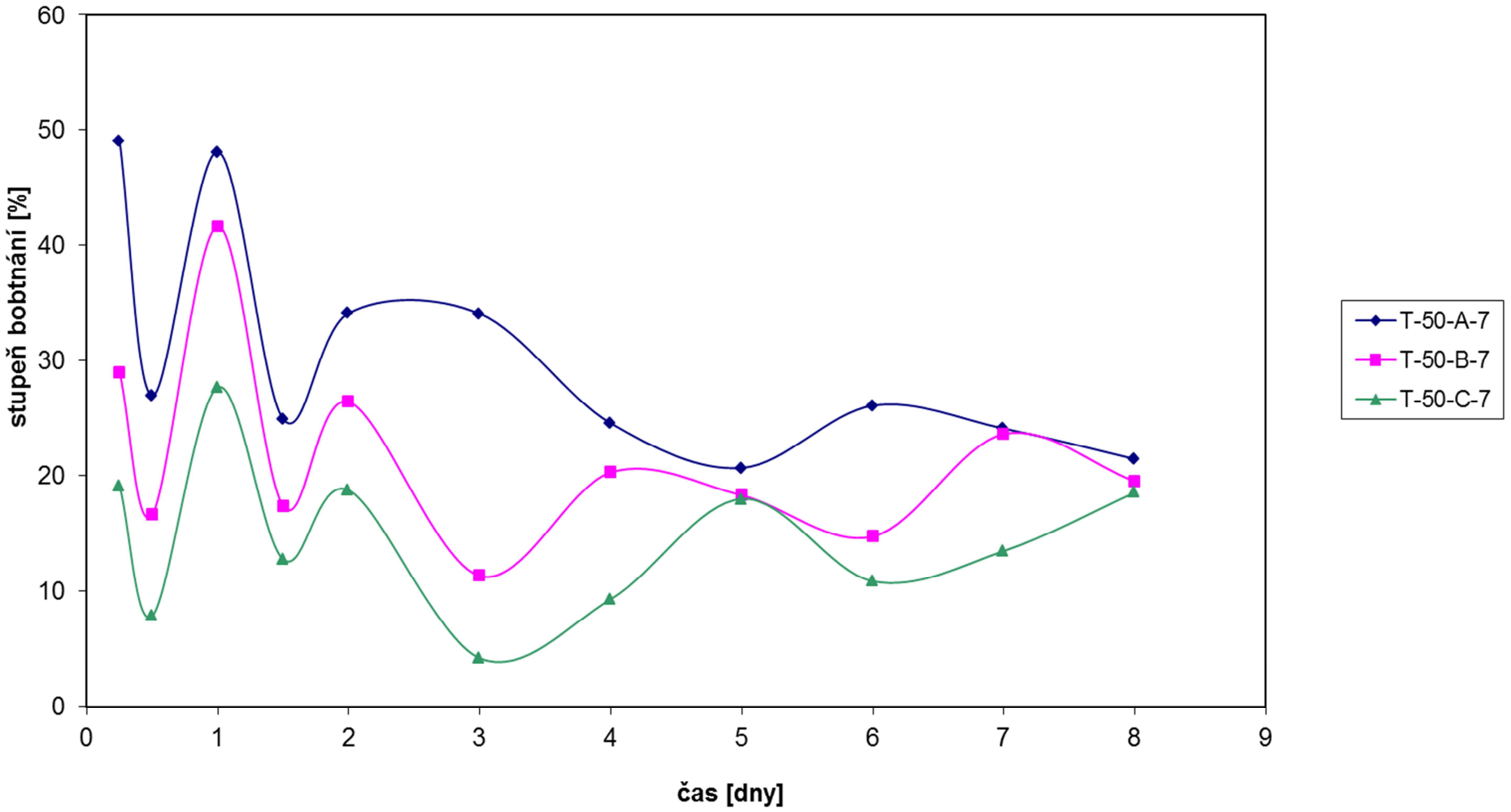
	ø S	
dny	L-50-7	L-100-7
0	0,0	0,0
0,25	25,8	9,5
0,5	13,7	18,2
1	20,5	17,6
1,5	7,2	6,9
2	19,5	16,2
3	19,5	13,1
4	9,4	9,3
5	14,2	11,5
6	17,5	10,2
7	10,2	13,9
8	20,8	15,0

Tab. 12: Průměr stupně bobtnání (vzorků A, B, C) matrice T3 (T) a PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C

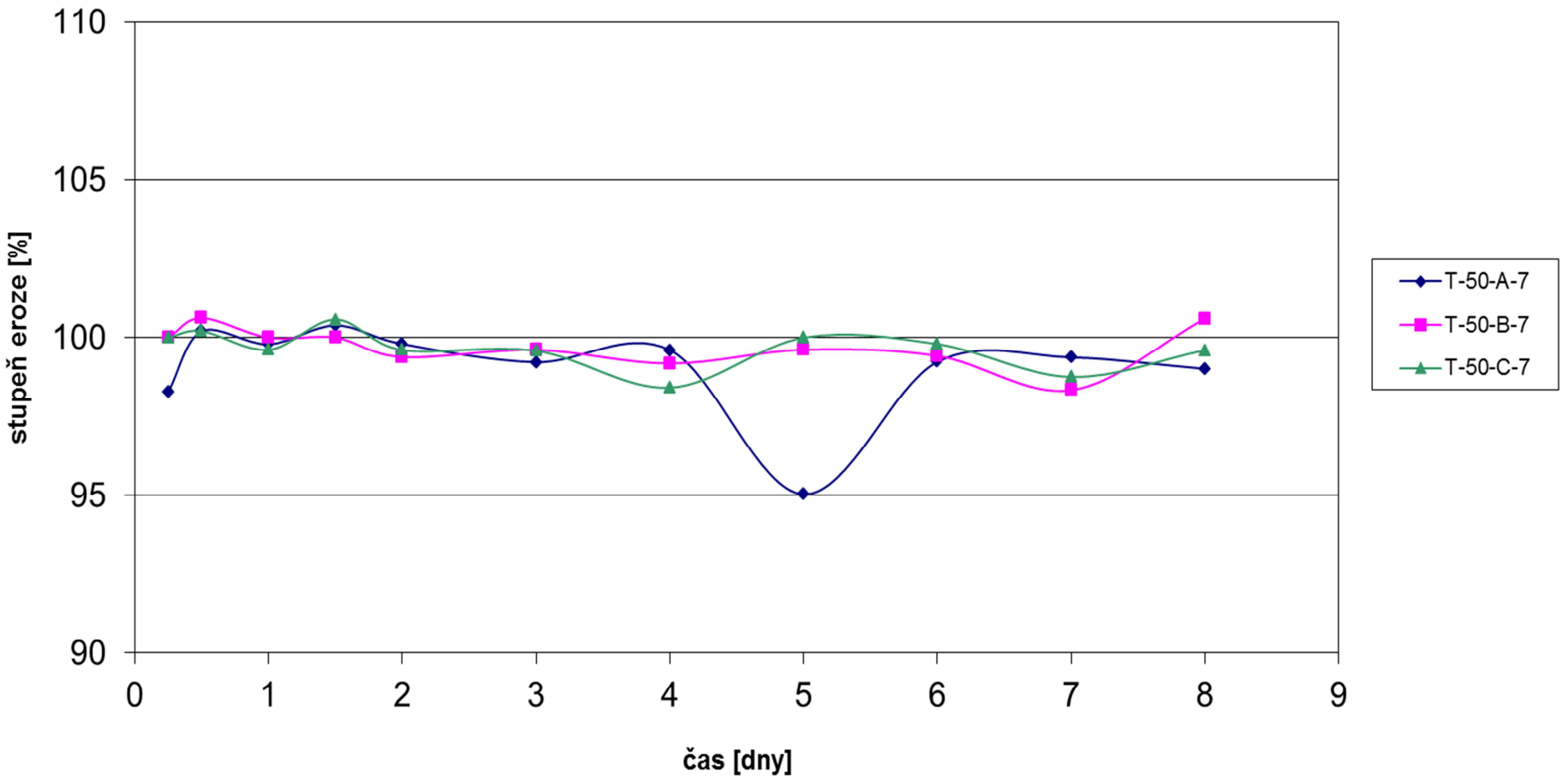
	ø S	
dny	T-50-22	L-50-22
0	0,0	0,0
0,25	2,5	11,9
0,5	11,7	17,3
1	9,1	5,9
1,5	13,5	16,3
2	13,6	12,7
3	28,6	15,9
4	55,4	28,9
5	24,1	11,7
6	38,8	17,7
7	41,9	24,6
8	68,3	36,3

5.2 OBRÁZKY

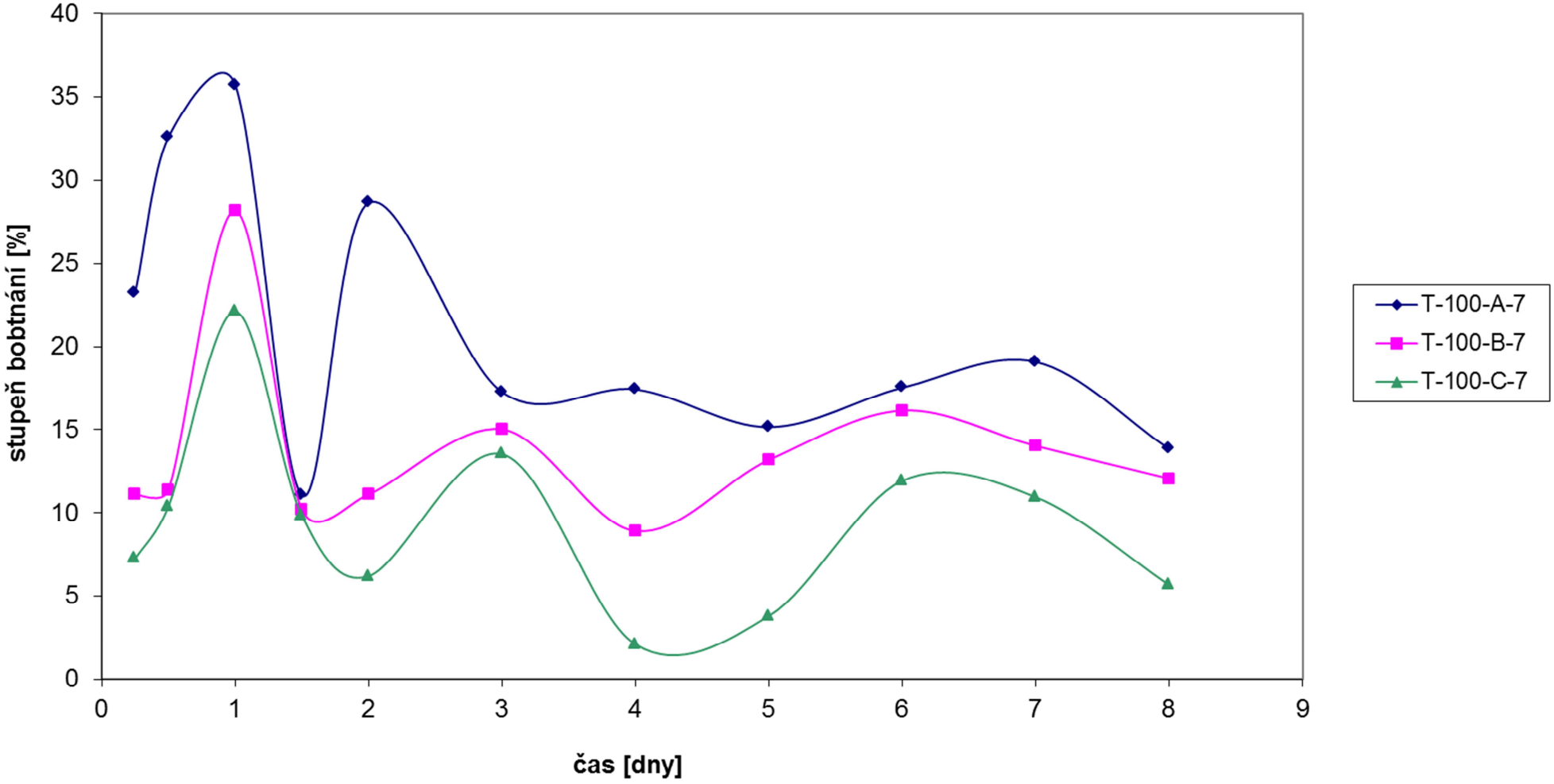
Obr. 1: Stupeň bobtnání matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)



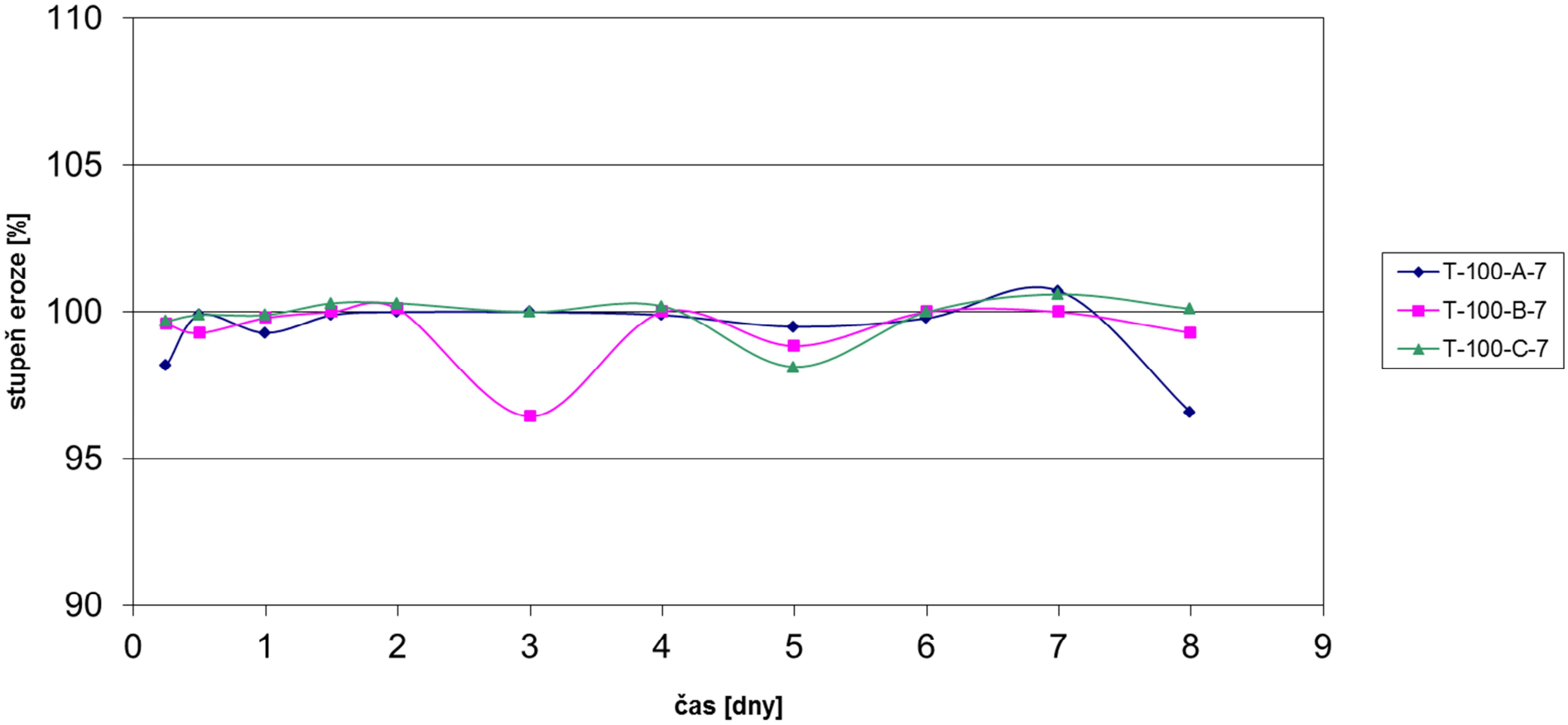
Obr. 2: Stupeň eroze matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B,C)



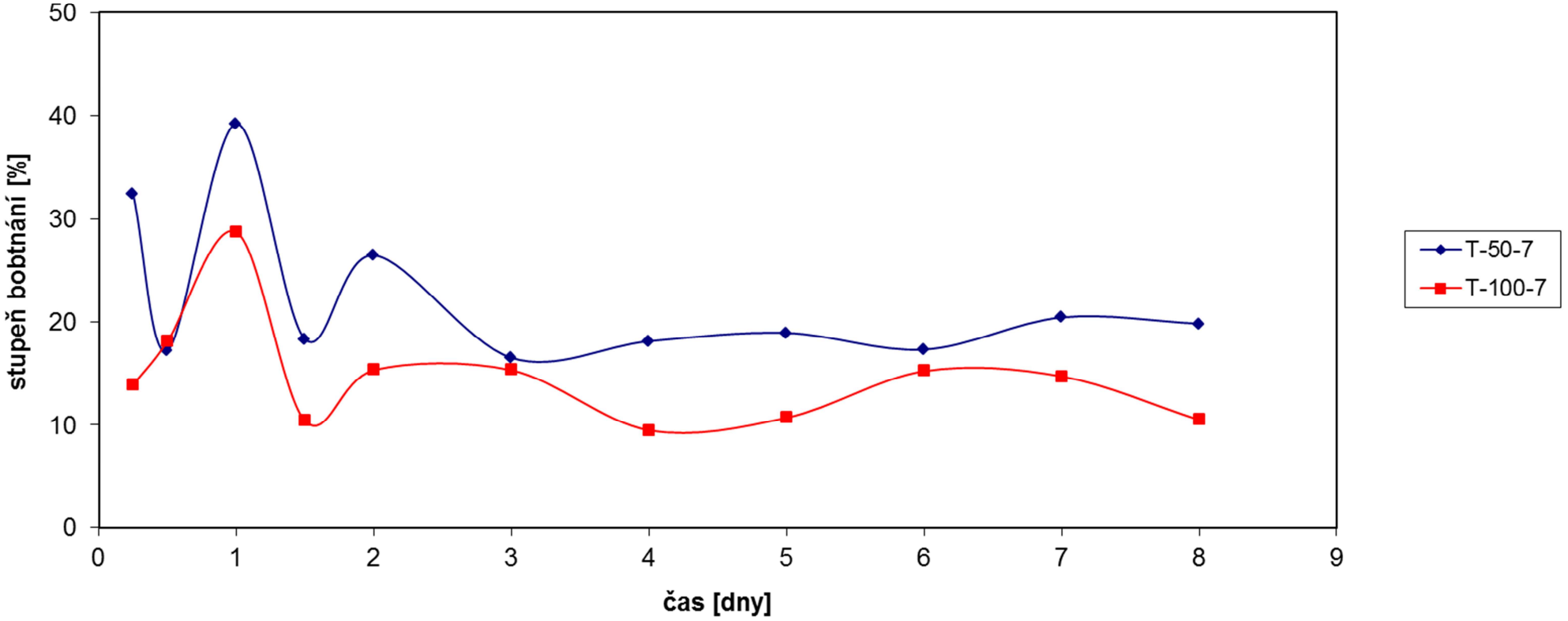
Obr. 3: Stupeň bobtnání matrice T3 (T) o hmotnosti 100 mg v prostředí čištěné vody při 7° C (vzorky A, B, C)



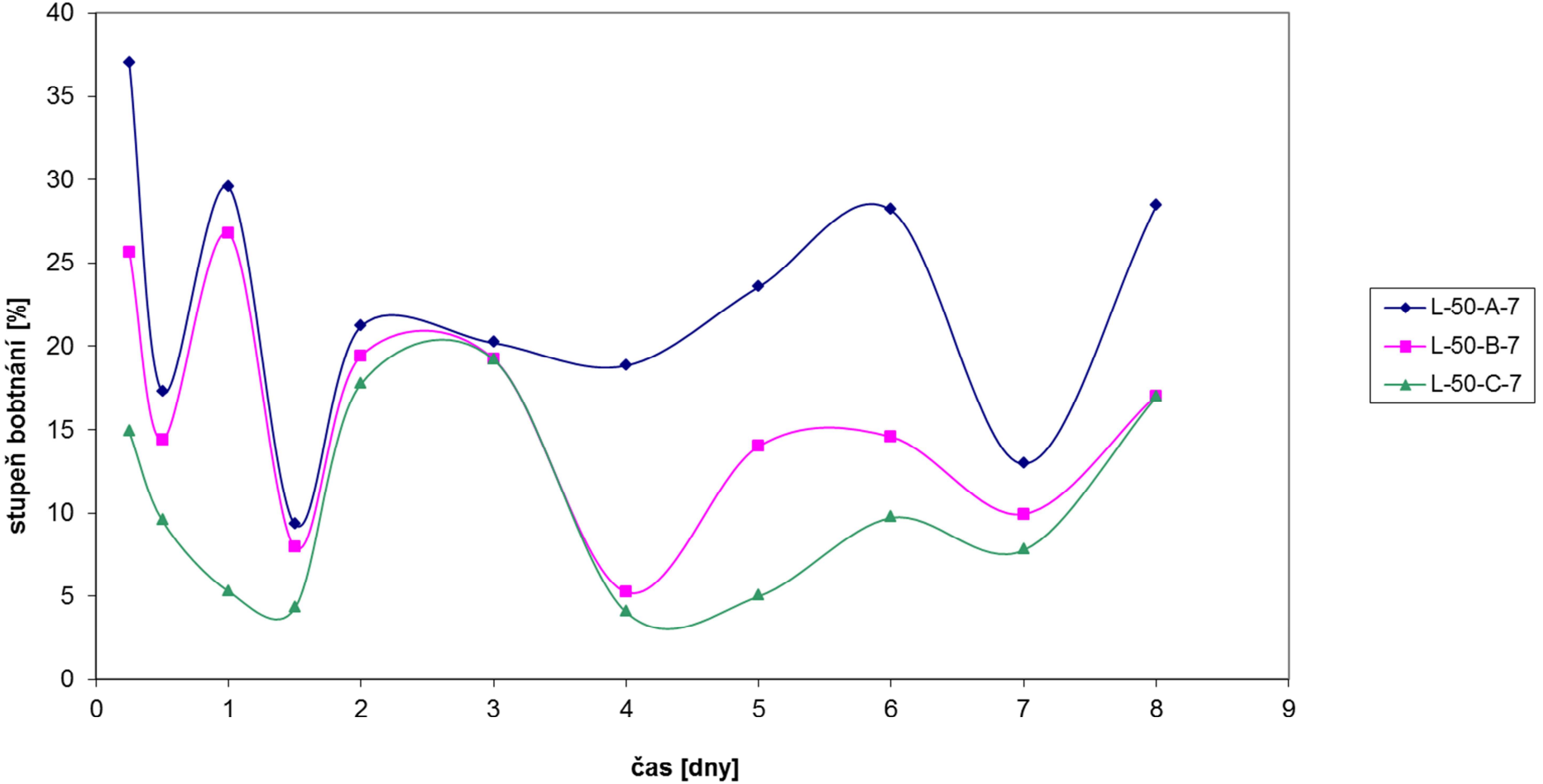
Obr. 4: Stupeň eroze matrice T3 (T) o hmotnosti 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)



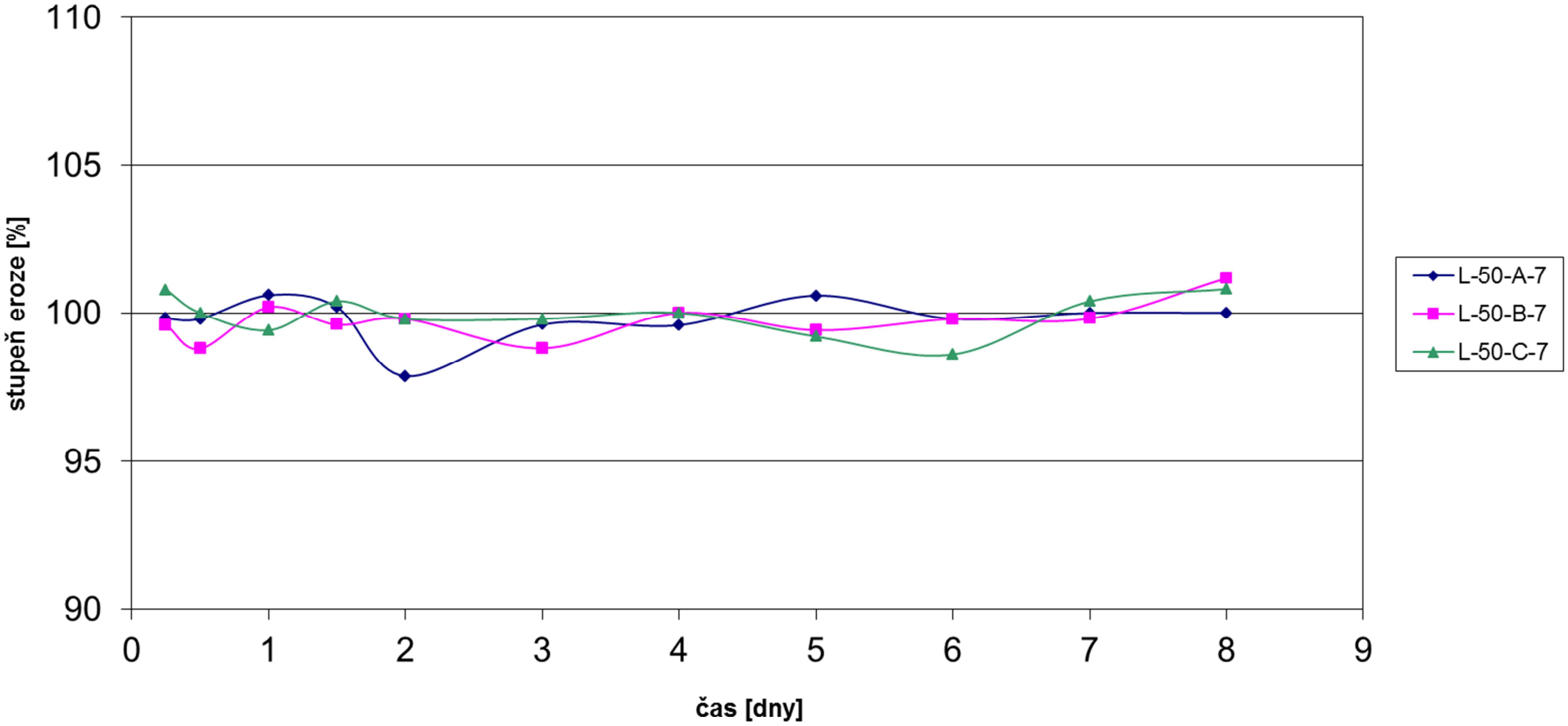
Obr. 5: Průměr stupně bobtnání matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg a 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C



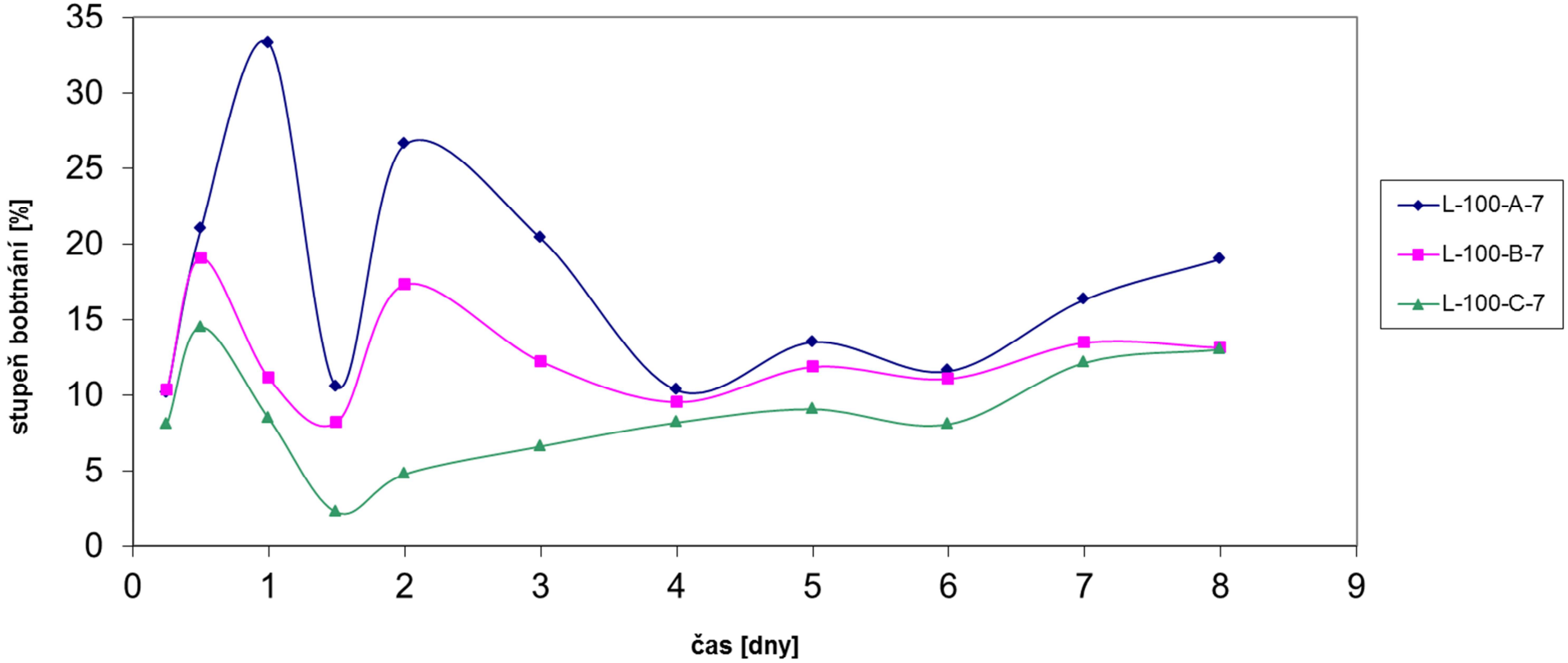
Obr. 6: Stupeň bobtnání matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 7° C (vzorky A, B, C)



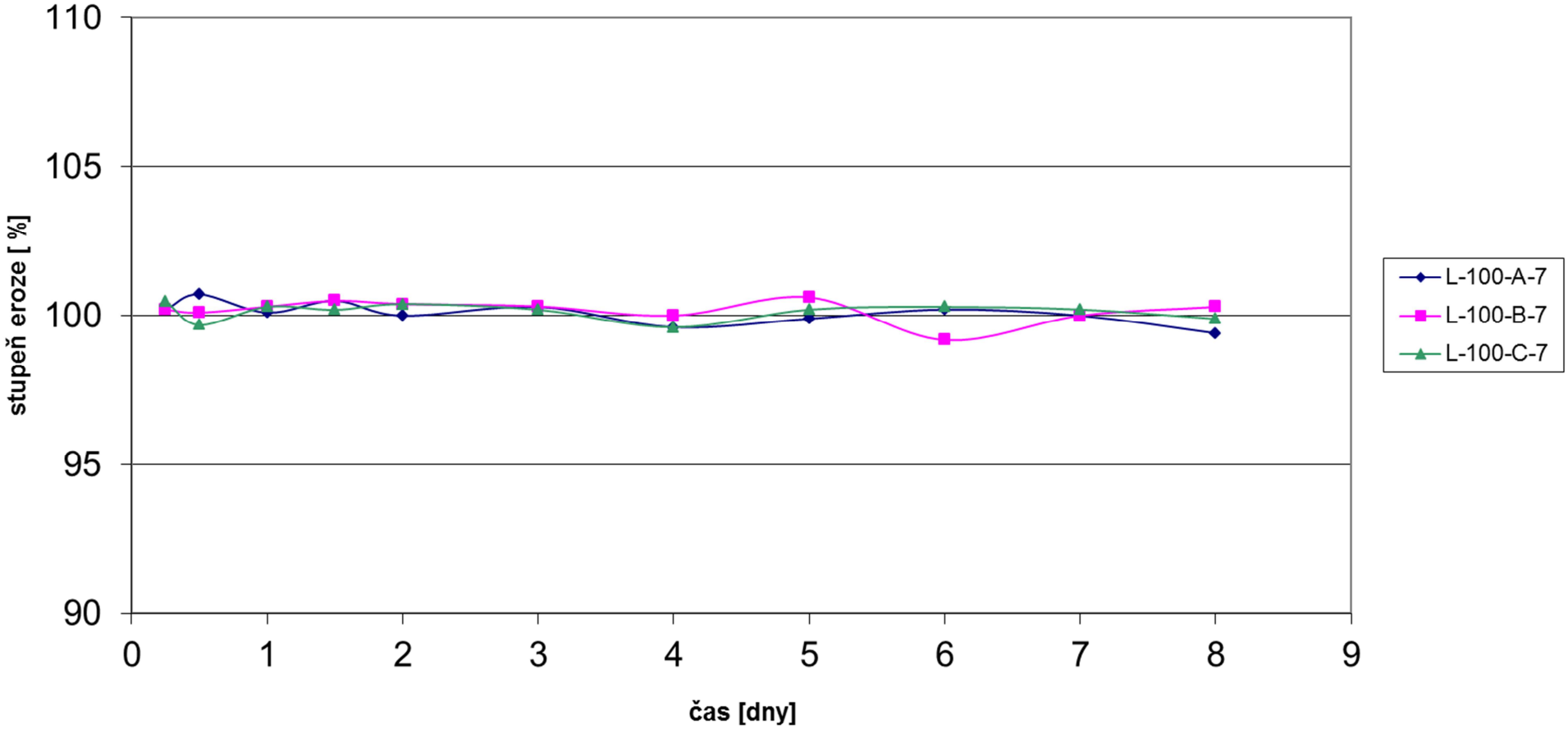
Obr. 7: Stupeň eroze matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 7° C (vzorky A, B, C)



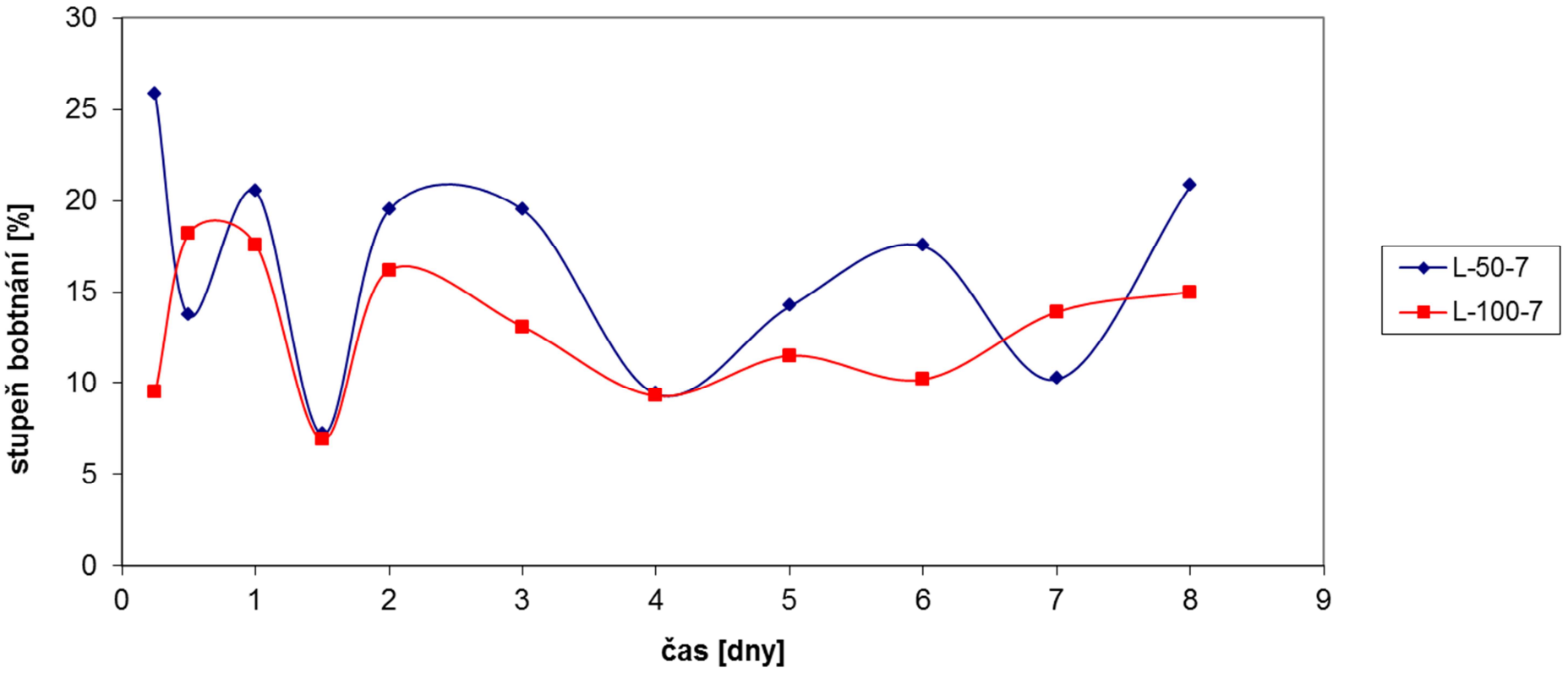
Obr. 8: Stupeň bobtnání matrice PLGA (L) o hmotnosti 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B, C)



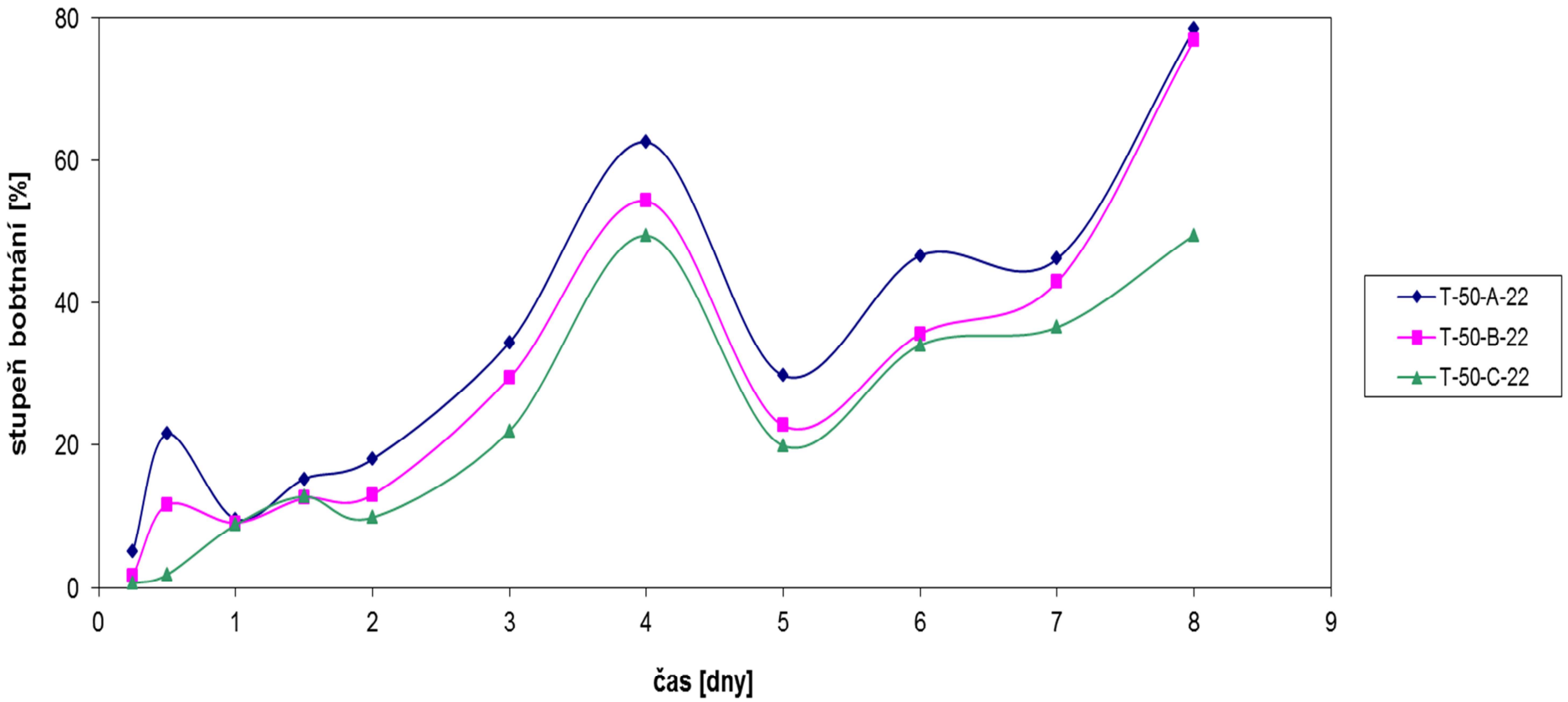
Obr. 9: Stupeň eroze matrice PLGA (L) o hmotnosti 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A,B, C)



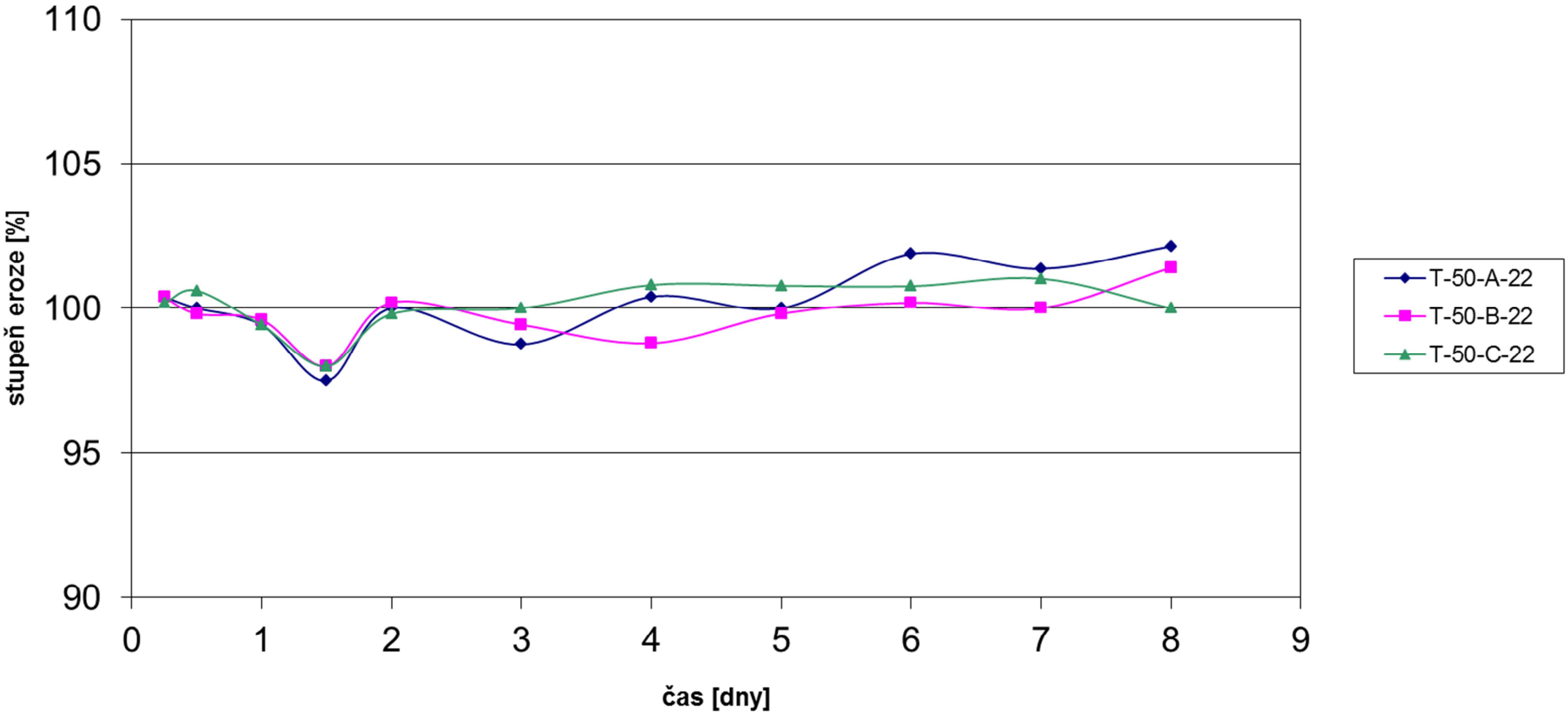
Obr. 10: Průměr stupně bobtnání matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg a 100 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C



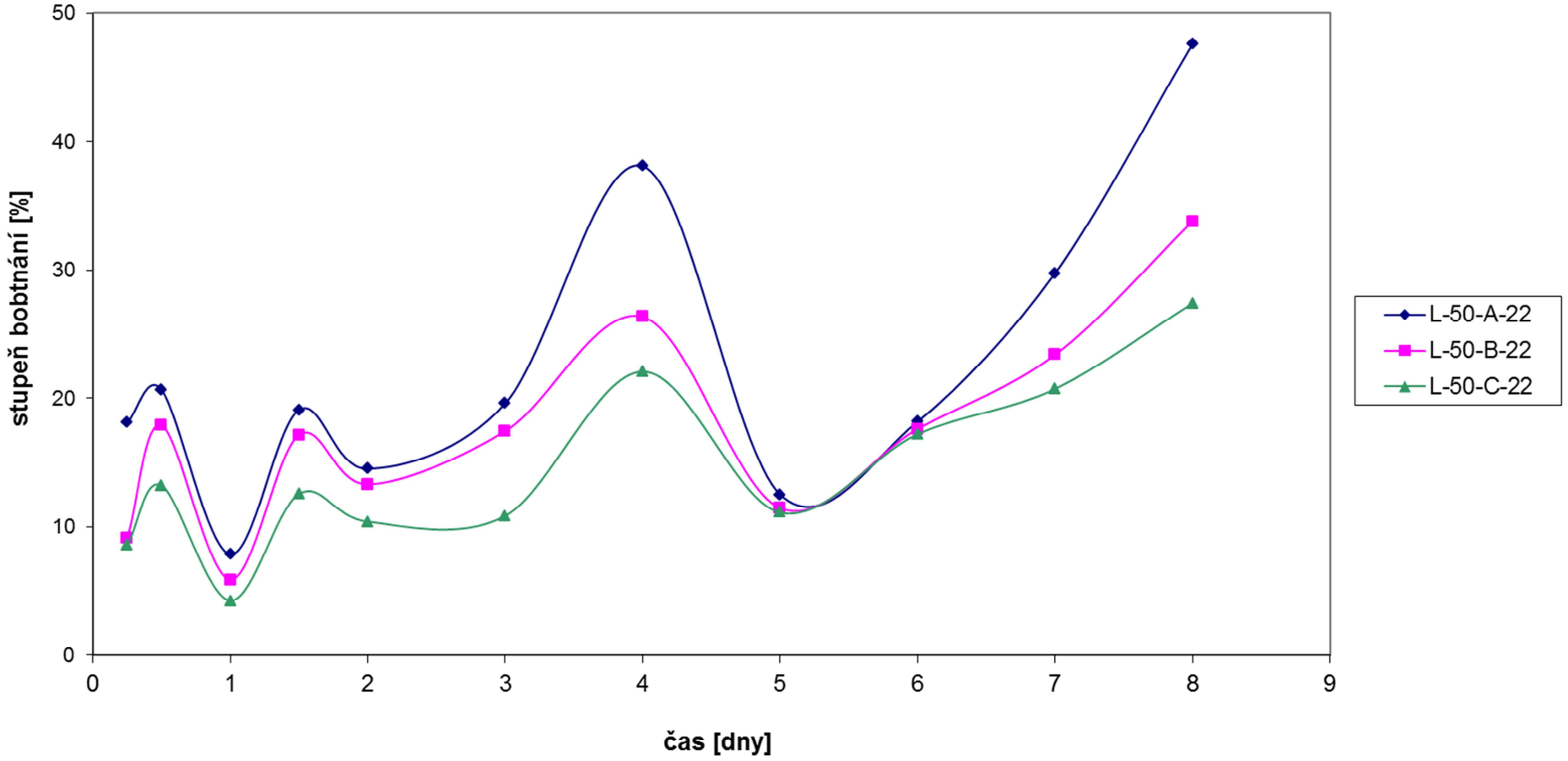
Obr. 11: Stupeň bobtnání matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C (vzorky A,B,C)



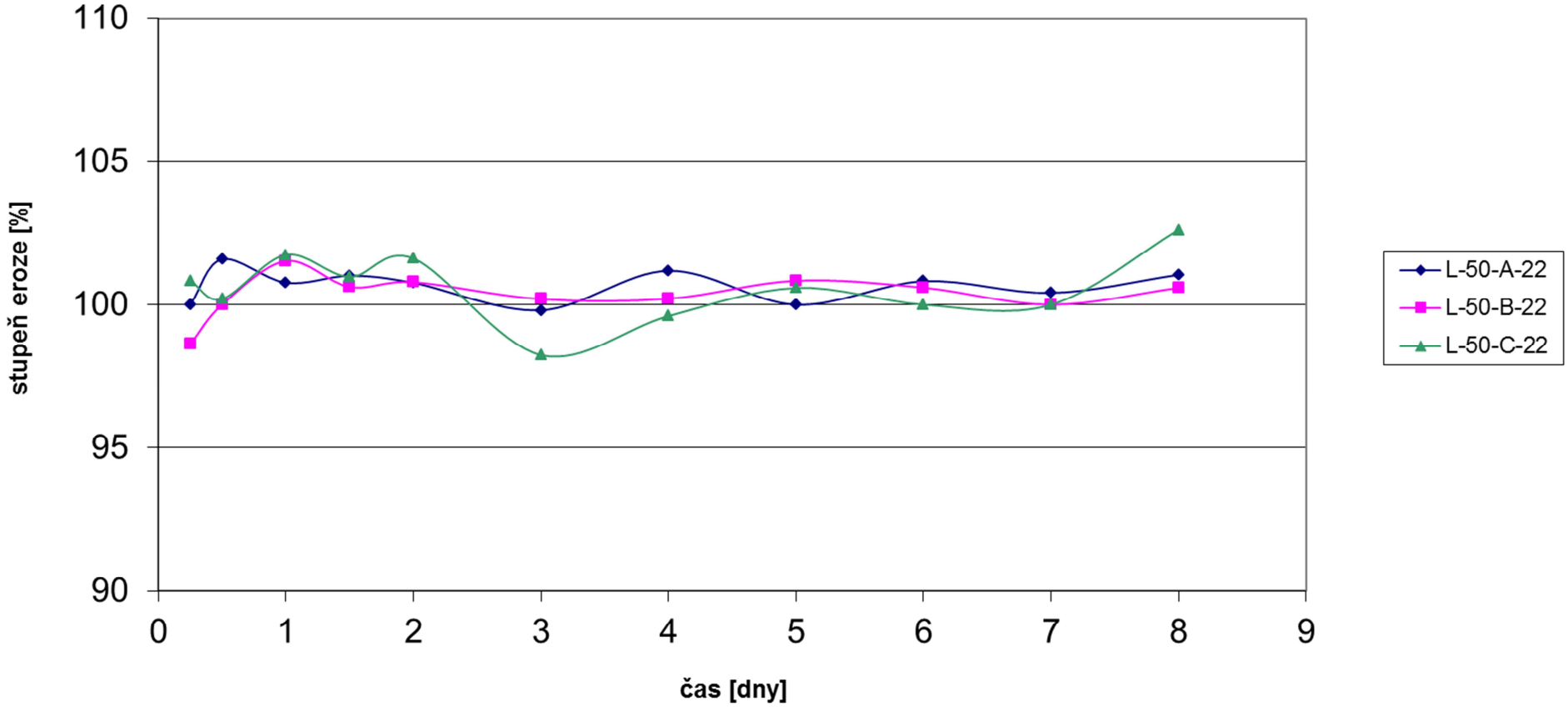
Obr. 12: Stupeň eroze matrice T3 (T) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C (vzorky A, B,C)



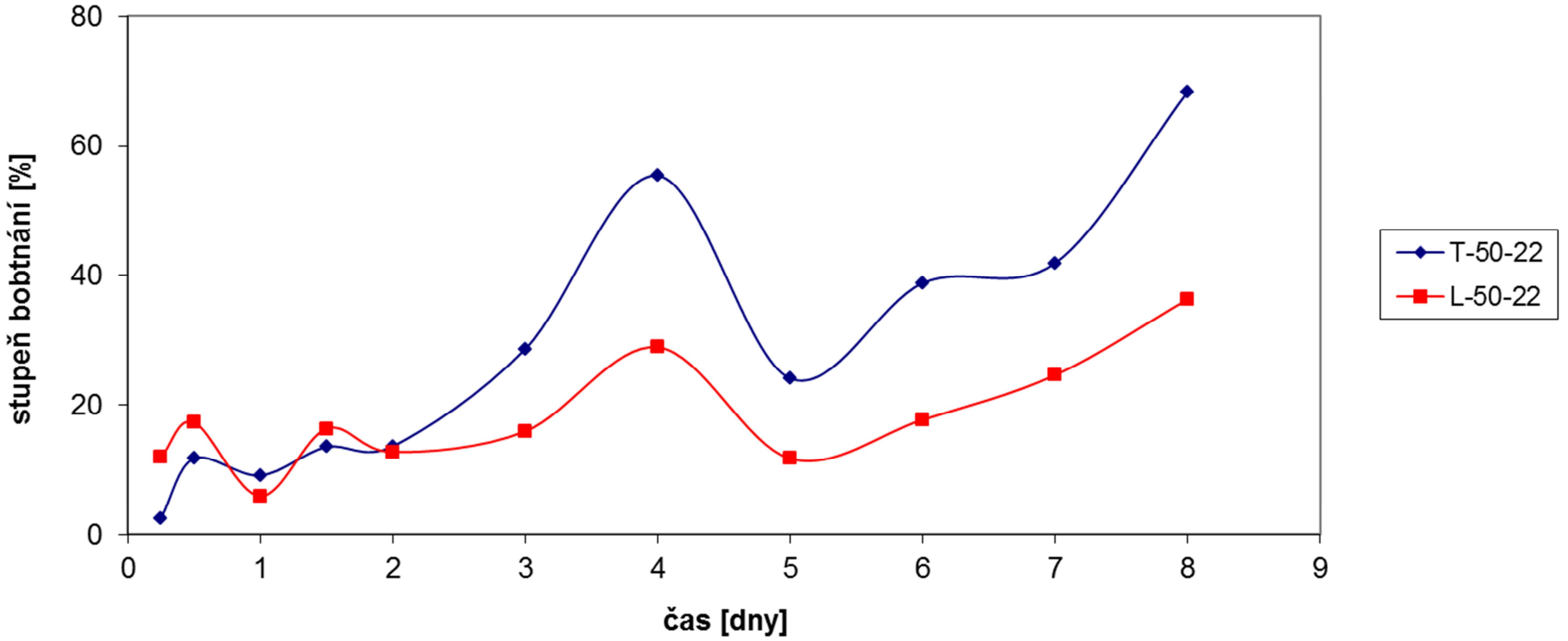
Obr. 13: Stupeň bobtnání matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C (vzorky A, B, C)



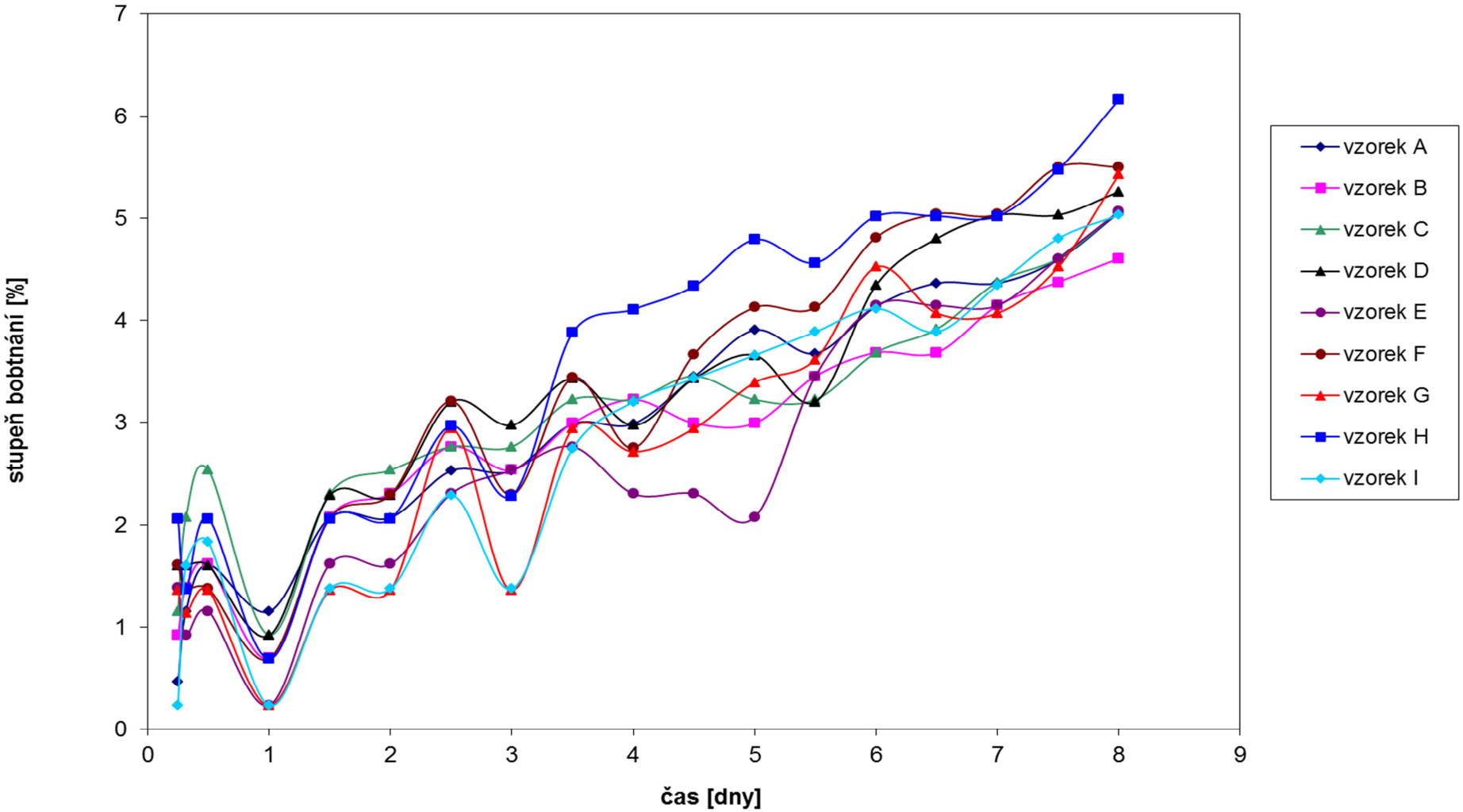
Obr. 14: Stupeň eroze matrice PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C (vzorky A,B,C)



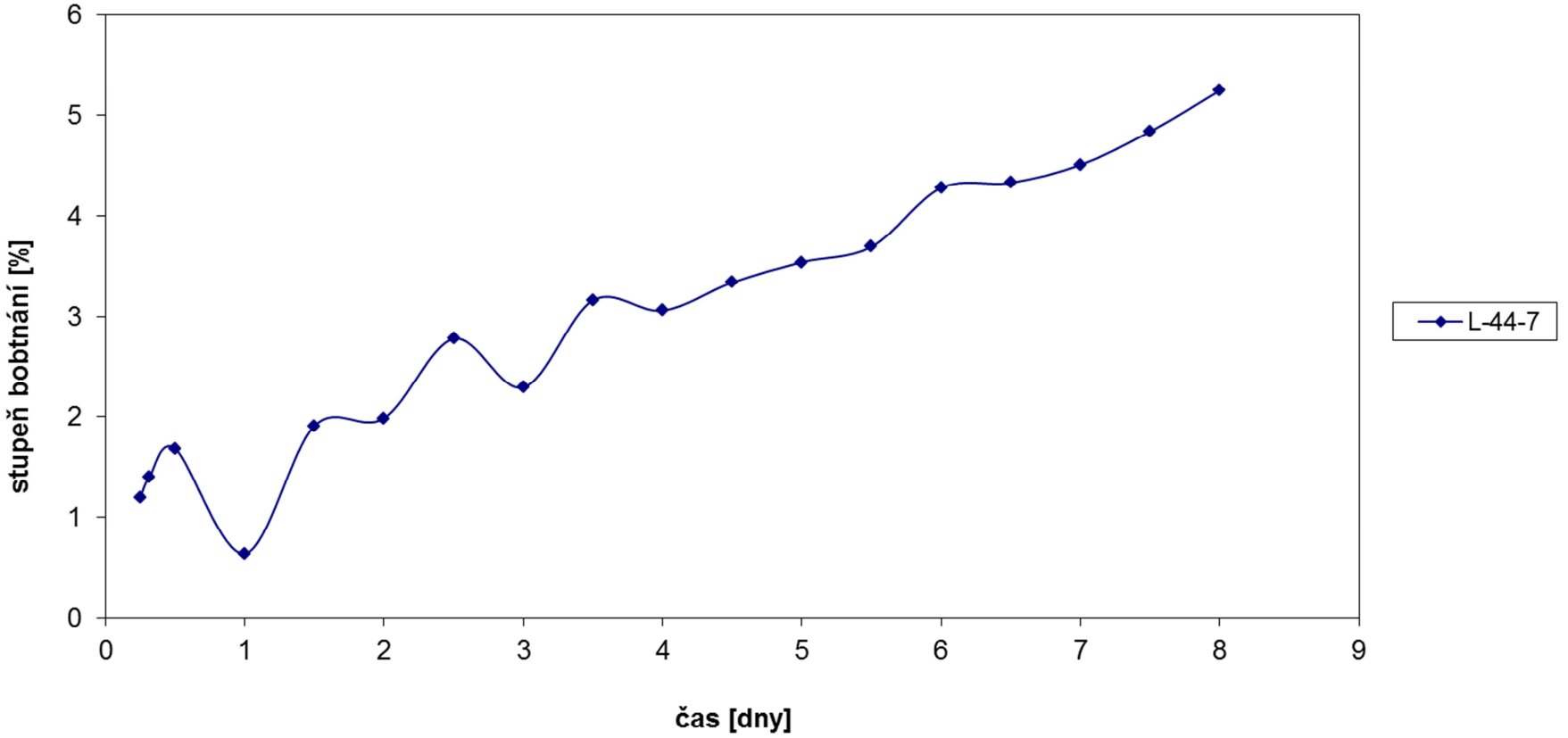
Obr. 15: Průměr stupně bobtnání matrice T3 (T) a PLGA (L) o hmotnosti 50 mg v prostředí čištěné vody při 22 °C



Obr. 16: Stupeň bobtnání matrice PLGA (L) o hmotnosti 44 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C (vzorky A, B,C, D, E, F, G, H, I)



Obr. 17: Průměr stupně bobtnání matrice PLGA (L) o hmotnosti 44 mg v prostředí čištěné vody při 7 °C



6 DISKUZE

6.1 K řešenému tématu práce

Cílem práce bylo přispět k dosavadním znalostem o chování hydrofilních matric, které hydrolyticky degradují ve vodném prostředí. Již dříve bylo prokázáno, že při simultánní erozi alifatických polyesterů a oligoesterů alifatických hydroxykyselin dochází při 37 °C k pulznímu průběhu hodnot stupně bobtnání, tzn. k jednomu nebo více cyklům bobtnání a odbobtnání.

Úkolem bylo rozšířit dosavadní znalosti o tomto ději na podmínky, při kterých eroze prakticky neprobíhá. Těmito podmínkami bylo prostředí vody a teplota 22 °C a 7 °C. Dalším sledovaným parametrem byla standardnost tvarového faktoru testovaných polyesterových tělísek připravených mechanickou abrazí fragmentů nebo formováním litím taveniny. Pro studium chování matric byly vybrány dva nosiče, lineární nízkomolekulární oligoester připravený polykondenzací ekvimolární směsi kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou a terpolymer syntetizovaný z ekvimolární směsi kyselin DL-mléčné a glykolové s 3% tripentaerytritolem s prokázanou větvenou konstitucí molekuly. V případě dokonalého větvení by tento hvězdicovitý terpolymer měl celkem 8 větví. Testovaná tělíska měla hmotnost 50 mg nebo 100 mg. Kromě stupně bobtnání byl sledován stupeň eroze testovaných tělísek. Vzorky byly odebírány celkem v 11 časových intervalech, od 2. dne každý den až do 8. dne. Zkouška vzhledem ke kontrole, že nedochází k erozi, měla destruktivní charakter. To znamená, že každý bod uvedený na obrázku se týkal jiného tělíska.

6.2 K bobtnání tělísek z větveného terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu při 7 °C

Na obr. 1 je průběh bobtnání tělísek, které měly hmotnost 50 mg při teplotě 7 °C. V počáteční fázi byl pozorován stejný průběh děje spočívající ve dvou pulzech. Potom se chování jednotlivých tělísek lišilo, patrně vlivem změny tvaru tělísek. Přesto byly prokázány v intervalu mezi 2. a 8. dnem další dva až tři pulzy, které se postupem času zpomalovaly, snižovala se také amplituda pulzů. V celém rozsahu tohoto experimentu byla naměřena nejnižší hodnota stupně bobtnání přibližně 5 % a nejvyšší hodnota přibližně 50 %. V celém rozsahu naměřených dat hodnoty stupně bobtnání oscilovaly kolem 20 %. Na obr. 2 je potvrzeno, že nedochází k erozi.

Shoda naměřených hodnot stupně bobtnání je u většího 100 mg tělíska menší než v předešlém případě (obr. 3). Přesto i v tomto případě se při bobtnání projevily 3 až 4 pulzy. Hodnoty se lišily nejen v poloze píků, ale také v hodnotách maxim a minim.

Po vypočtení průměrů ze tří opakování byly zvláště u stupně bobtnání větších tělísek získány výsledky, které poněkud zkreslují skutečné chování polyesterových matric. Jak je patrné z obr. 5, bylo takto u 50 mg tělísek prokázáno pět postupně se snižujících oscilačních cyklů, kdežto u 100 mg tělísek se po vypočtení průměrových hodnot projevily pouze tři oscilační cykly. Snižování jejich intenzity má reálný podklad, jeho kvantifikace je však ovlivněna rozptylem (posunem) hodnot charakteristiky v jednotlivých intervalech.

6.3 K bobtnání tělísek z lineárního kopolymeru kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové při 7 °C

Na obr. 6 je průběh hodnot stupně bobtnání tří paralelně odebraných a proměřených tělísek v každém ze sledovaných časových intervalů. Tělíska měla hmotnost 50 mg. Variabilita paralelně vyhodnocených dat byla značná, přesto se projevily jisté typické znaky děje. Zajímavý je souběh hodnot v jednotlivých časových úsecích. Mezi 1,5 dnem a 3. dnem byl průběh bobtnání a začátku odbobtnání stejný. Ve všech případech byly v časovém intervalu do 8. dne prokázány 4 pulzy s maximální hodnotou stupně bobtnání 35 % a minimální hodnotou 5 %. Variabilitu naměřených dat vyšší než u terpolymeru si vysvětlujeme nižší viskozitou kopolymeru PLGA, která může být příčinou tvarové variability plasticky deformovatelných tělísek.

Po zvýšení hmotnosti testovaných tělísek na 100 mg bylo prokázáno obdobné chování, byly nalezeny shodné rysy v chování tělísek v časové řadě. Hlavní odlišností bylo bobtnání v iniciální fázi do 0,5 dne. Stejné jako u terpolymeru (obr. 5) bylo u těchto rozměrnějších tělísek maximum charakteristiky v pozdějším intervalu. Vysvětlení je možno hledat v difúzní podstatě dějů, jejichž kinetika je ovlivněna parametrem vzdálenosti v souladu se zákonitostmi přenosu hmoty.

Odlišnost v chování různě velkých tělísek je zřetelně patrná v zobrazení průměrových hodnot na obr. 10. U menších tělísek se projevuje větší oscilace i v pozdějších intervalech, kdežto u větších je zřetelně patrné postupné snižování frekvence i amplitudy oscilačních cyklů.

6.4 K bobtnání tělísek hmotnosti 50 mg z jednotlivých polyesterů při 22 °C

Při teplotě 22 °C bylo chování matric z větveného terpolymeru značně odlišné od chování při teplotě 7 °C. Jak je uvedeno na obr. 12 a obr. 14, při teplotě 22 °C nedochází do 8. dne k erozi tělísek bez ohledu na jejich složení. U terpolymeru v počáteční fázi působení média se projeví nevýrazné maximum hodnot následované jejich růstem až do 4. dne, kdy bylo dosaženo až 60% bobtnání. Potom následovalo výrazné odbobtnání matric následované další fází bobtnání se slabým náznakem odbobtnání (obr. 11).

U kopolymeru PLGA bylo také prokázáno výrazné maximum naměřených hodnot v intervalu 4. dne (obr. 13). Odlišností je výraznější pulzní chování ve fázi od začátku působení média do 2. dne. Jednoznačně byly prokázány dva slabé pulzy následované intenzivním v intervalu kolem 4. dne. Poté následovalo minimum v intervalu 5. dne.

Srovnáním průměrových hodnot, týkajících se chování jednotlivých tělísek z různých nosičů, uvedených na obr. 15 je možno dojít k závěru o velmi podobných rysech bobtnání lišících se větší pulzací nížemolekulárního lineárního kopolymeru PLGA v počáteční fázi působení vodného prostředí. Výšemolekulární terpolymer měl v časovém úseku po 2. dni vyšší hodnoty stupně bobtnání. Je to skutečnost překvapivá nejen z hlediska vlivu molekulové hmotnosti, ale také z hlediska znalostí o relaxačním chování polymerů s větvenou konstitucí molekuly. Pracovní hypotézou je nízká molekulová hmotnost s nižší možností propletení řetězců.

6.5 K bobtnání tělísek tvarovaných litím taveniny o hmotnosti 44 mg z oligoesteru PLGA při 7 °C

Postup při měření bobtnání se od metody využité u výše popsaných vzorků lišil tím, že byl učiněn předpoklad, že při 7 °C neprobíhá eroze. Proto byla jednotlivá tělíska v celkovém počtu 9 kusů sledována po řadu intervalů až do 8. dne, kdy byl pokus ukončen. Z dat získaných testováním jednotlivých vzorků prezentovaných na obr. 16 je patrné, že bobtnání probíhá s jistým rozptylem hodnot. Průběh hodnot má obdobný charakter v počáteční fázi 1. dne, v další fázi je možno zodpovědně prohlásit pouze, že dochází k postupnému zvyšování hodnot stupně bobtnání. Toto zvyšování nebylo kontinuální, je doprovázeno pulzy. Protože jsou tyto pulzy časově posunuty, je průměrové vyjádření uvedené na obr. 17 ve smyslu nevýrazné pulzace v jednoznačném trendu zvyšování hodnot. Pracovním vysvětlením je odlišná struktura matrice především v povrchové vrstvě. Molekuly v povrchové vrstvě při lití taveniny do hydrofobní formy mohou vytvářet hydrofobní kompaktní povrch, který je méně

prostupný pro vodu. Dalším faktorem, i když méně pravděpodobným, může být velikost efektivního povrchu. Těleso, které se blíží tvaru koule, má menší povrch než těleso tvaru válce.

7 ZÁVĚRY

A. Bylo ověřeno, že při 7 °C matrice z lineárního a z větveného polyesteru alifatických hydroxykyselin v prostředí vody v intervalu do 8. dne neerodují, nově bylo prokázáno, že totéž platí i pro analogické situace při 22 °C.

B. Bobtnání matric z lineárního a z větveného polyesteru alifatických hydroxykyselin o hmotnosti 50 mg a 100 mg v prostředí vody má při teplotách 7 °C a 22 °C pulzní průběh.

C. Frekvence pulzů a jejich rozsah jsou ovlivněny molekulárními parametry polyesterů a velikostí matric z nich připravených.

D. Na průběh a rozsah bobtnání a odbobtnání matric má vliv postup jejich přípravy, který souvisí s jejich tvarem, povrchem a strukturou v povrchové vrstvě, podstatu odlišností bude nutno hledat pomocí dalších experimentů.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Langer, R., Tirrell, D.A.: Designing materials for biology and medicine. Nature 2004, 428, 487-492.

[2] Caldorera-Moore, M., Peppas, N.A.: Micro- and nanotechnologies for inteligent and responsive biomaterial-based medical systems. Advanced Drug Delivery Review 2009, 61, 1391-1401.

[3] Bajpai, A.K., Shukla, S K., Bhanu, S., Kankane, S.: Responsive polymers in controlled drug delivery. Progress in Polymer Science 2008, 33, 1088-1118.

[4] Peppas, N.A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J.H., Zhange, J.: Physiochemical foundation and structure design of hydrogel in medicine and biology. Annu Rev Biomed Eng 2000, 2, 9-29.

[5] Lingyun, C., Zhigang, T., Yumin, D.: Synthesis and pH sensitivity of carboxymethyl chitosan based polyampholyte hydrogel for protein carrier matrices. Biomaterials 2004, 25, 3725-32.

[6] Li Q Wang, J., Shahani, S., Sun, D.D.N., Sharma, B., Elisseeff, J.H., et al.: Biodegradable and photocrosslinkable polyphosphoester hydrogel. Biomaterials 2006, 27, 1027-34.

[7] Davis, K.A., Anseth, K.S.: Controlled release from crosslinked degradable networks. Crit Rev Ther Drug Carr Syst 2002, 19, 385-423.

[8] Chein-Chi, L., Andrew, T.M.: Hydrogels in controlled release formulation network design and mathematical modeling. Adv Drug Delivery Rev 2006, 58, 1379-408.

[9] Zhang, X.Z., Yang, Y.Y., Chung, T.S., Ma, K.X.: Fabrication and characterization of vast response poly(*N*-isopropyl acrylamide) hydrogels. Langmuir 2001, 17, 6094-9.

[10] Shiga, T., Hirose, Y., Okada, A., Kurauchi, T.: Electric field associated deformation of polyelectrolyte gel near a phase transition point. J Appl Polym Sci 1992, 46, 635-40.

[11] Yoo, M.K., Sung, Y.K., Lee, Y.M., Cho, C.S.: Effect of polyelectrolyte on the lower critical solution temperature of poly(*N*-isopropyl-acrylamide) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid) hydrogel. Polymer 2000, 41, 5713-9.

[12] Russo, M., Malin, C.L., Petti, G., Romano.: Physical behaviour of biodegradable alginate-poly(vinyl alcohol) blend films. J Polym Sci Part B: Polym 2005, 43, 1205-13.

[13] Anthony, M.L., Bretta, C., Peppas, N.A.: Investigation of interpolymer complexation in swollen polyelectrolyte networks using solid state NMR spectroscopy. J Polym Sci Part B: Polym 2000, 38, 2823-31.

[14] Shukla, S., Bajpai, A.K., Bajpai, J.: Swelling controlled delivery of antibiotic from a hydrophilic macromolecular matrix with hydrophobic moieties. Macromol Res 2003, 11, 273-82.

[15] Davidson III, G.W.R., Peppas, N.A.: Solute and penetrant diffusion in swellable polymers V. Relaxation controlled transport in p(HEMA-co-MMA) copolymers. J Control Release 1986, 3, 243-58.

[16] Anal, K.A.: Stimuli-induced pulsatile or triggered release delivery systems for bioactive compounds. Recent Patents Endocrine Metab Immune Drug Discov 2007, 1, 83-90.

[17] Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Chikawa, H.: Hydrogels in pharmaceutical formulations. Eur J Pharm Biopharm 2000, 50, 27-46.

[18] Gil, E.S., Hudson, S.M.: Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. Progr Polym Sci 2004, 29, 1173-222.

[19] Bromberg, I.: Intelligent polyelectrolytes and gels in oral drug delivery. Curr Pharm Biotechnol 2003, 4, 39-49.

[20] Bartil, T., Bounekhel, M., Cedric, C., Jerome, R.: Swelling behavior and release properties of ph-sensitive hydrogels based on metacrylic derivatives. Acta Pharm 2007, 57, 301-14.

[21] Risbud, M.K., Hardikar, A.A., Bhat, S.V., Bhonde, R.R.: pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. J Contol Release 2000, 68, 23-30.

[22] Kim, B., Peppas, N.A.: Complexation phenomena in pH-responsive copolymers network with pendent saccharides. Macromolecules 2002, 35, 9545-50.

[23] Racum, H.V., Okano, T., Kim, S.W.: Growth factor release from thermally reversible tissue culture substrates. J Control Release 1998, 55, 121-30.

[24] Hilt, J.Z., Byrne, M.E.: Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004, 56, 1599-1620.

[25] Byrne, M.E., Park, K., Peppas, N.A.: Molecular imprinting within hydrogels, Adv. Drug Deliv. Rev. 2002, 54, 149-161.

[26] Beebe, D.J., Moore, J.S., Bauer, J.M., Yu, Q., Liu, R.H., Devadoss, R.H., Jo, B.-H.: Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels 2000, 404, 588-590.

[27] Tao, S.L., Desai, T.A.: Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores, Adv. Drug Deliv. Rev. 2003, 55, 315-328.

[28] Mark, S., Karen, D., Michael, J.C., Robert, L.: Application of micro- and nano-electromechanical devices to drug delivery, Pharm. Res. 2006, V23, 847-863.

[29] Santini Jr., J.T., Richards, A.C., Scheidt, R., Cima, M.J., Langer, R.: Misrochips as controlled drug-delivery devices, Angew. Chem. Int. Edit. 2000, 39, 2396-2407.

[30] Leoni, L., Boirski, A., Desai, T.A.: Characterization of nanoporous membranes for immunoisolation: diffusion properties and tissue effects. Biomedical Microdevices 2002, 4, 131-139.

[31] Glangchai, L.C. , Caldorera-Moore, M., Shi, L., Roy, K.: Nanoimprint lithography based fabrication of shape-specific, enzymatically-triggered smart nanoparticles. J. Control. Release 2008, 125, 263-272.

[32] Vozzi, G., Flaim, C., Ahluwalia, A., Bhatia, S.: Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. Biomaterials 2003, 24, 2533-2540.

[33] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J.M: Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, Polymer Degradation and Stability 2010, 1-21.

[34] Mikos, A.G., Lyman, M.D., Freed, L.E., Langer, R.: Wetting of poly(-lactic acid) and poly(-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. Biomaterials 1994, 15, 55-58.

[35] Nuttelman, C.R., Henry, S.M., Anseth, K.S.: Syntesis and characterization of photo-crosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffold., Biomaterials 2002, 23, 3617-3626.

[36] Jugur-Grodzinski, J.: Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. Polym Adv Technol 2006, 17, 395-418.

[37] Tjong, S.C.: Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. Mater Sci Eng R 2006, 53, 73-197.

[38] Li, J., Lu, X.L., Zheng, Y.F.: Effect of surface modified hydroxyapatite on the tensile property improvent of HA/PLA composite. Apll Surf Sci 2008, 255, 494-7.

[39] Shin, H., Jo, S., Mikos, A.G.: Biomimetic materials for tissue engineering. Biomaterials 2003, 24, 4353-64.

[40] Chu, C., Lu, A., Liszkowski, M., Sipehia, R.: Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers. Biochim Biophys Acta 1999, 1472, 479-85.

[41] Lin, A.S.P, Barrows, T.H., Cartmell, S.H., Guldberg, R.E.: Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. Biomaterials 2003, 24, 481-9.

[42] Lu, L.C., Peter, S.J., Lyman, M.D., Lai, H.L., Leite, S.M., Tamada, J.A., et al.: In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactid-co-glycolic acid) foams. Biomaterials 2000, 21, 1837-45.

[43] Donlan, R.M., Costerton, J.W.: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 2002, 167-93.

[44] Freed, L.E., Novakovic, G.V., Biron, R.J., Eagles, D.B., Lesnoy, D.C., Barlow, S.K., et al.: Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Biotechnology 1994, 12, 689-93.

[45] Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R.: Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2006, 27, 3413-31.

[46] Klein, C.P.A.T., Driessen, A.A., de Groot, K., van den Hooff. A.: Biodegradation behaviour of various calcium phosphate materials in bone tissue. J Biomed Mater Res 2004, 17, 769-84.

[47] Tsuji, H., Mizuno, A., Ikada, Y.: Blends of aliphatic polyesters. III. Biodegradation of solution-cast blends from poly (L-lactide) and poly (ε-caprolactone). J. Appl. Polym. Sci 1998, 70, 2259-2268.

[48] Li, Q., Wang, J., Shahani, S., Sun, D.D.N., Sharma, B., Elisseeff, J.H.: Biodegradable and photocrosslinkable polyphosphoester hydrogel. Biomaterials 2006, 27, 1027.

[49] Belal, E.S.: Investigations on biodegradation of polyesters by isolated mesophilic microbes. Ph.D Thesis, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2003.

[50] Eggins, H.O.W., Oxley, T.A.: Biodeterioration and biodegradation. Int. Biodeter. Biodegr. 2001, 48, 12-15.

[51] Walsh, J.H., Ecological considerations of biodeterioration. Int. Biodeter. Biodegr. 2001, 48, 16-25.

[52] Kister, G., Cassanas, G., Bergounhon, M., Hoarau, D., Vert, M.: Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of D,L-lactide-co-ε-caprolactone by Raman spectroscopy. Polymer 2000, 41, 925-932.

[53] Proikasis, C.S., Mamouzelous, N.J., Tarantili, P.A., Andreapoulos, A.G.: Swelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in aqueous solution. Polym. Degrad. Stab. 2006, 91 (3), 614-619.

[54] Lucas, N., Bienaime, Ch., Belloy, Ch., Queneudec, M., Silvestre, F., Nava-Saucedo, J.-E.: Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. Chemosphere 2008, 73, 429-442.

[55] Gu, J.-D.: Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research edvences. Int. Biodeter. Biodegr. 2003, 52, 69-91.

[56] Lugauskas, A., Levinskaite, L., Peciulyte, D.: Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. Int. Biodeter. Biodegr. 2003, 52, 233-242.

[57] Wallstöm, S., Strömberg, E., Karlsson, S.: Microbiological growth testing of polymeric materials: an evaluation of new methods. Polym. Test. 2005, 24 (5), 557-563.

[58] Zanardini, E., Abbruscato, P., Ghedini, N., Realini, M., Sorlini, C.: Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. Int. Biodeter. Biodegr. 2000, 45, 35-42.

[59] Jenings, D.H., Lysek, G.: Fungal Biology: Understanding the fungal Life style. BIOS Scientic Publisher, Oxford. 1996, 63-65.

[60] Warscheid, T., Braams, J.: Biodeterioration of stone: a review. Int. Biodeter. Biodegr. 2000, 46, 343-368.

[61] Hoshino, A., Tsuji, M., Ito, M., Momochi, M., Mizutani, A., Takakuwa, K.: Biodegradable polymers and plaastics. In: Chiellini, E., Solaro, R. (Ed.), Study of the Aerobic Biodegradability of Plastics Materials Under Controlled Compost, 2003, 47, 21.

[62] Muller, R.: Biodegradability of polymers: Regulations and methods of testing. In: Steinbüchel, A., (Ed.), Biopolymers, General Aspects and Special Applications, vol. 10. Wiley Publishers, 2008, 12, 366-388.

[63] Nampoothiri, K.M., Nair, N.R., John, R.P.: An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. Bioresource Technology 2010, 101, 8493-8501.

[64] Park, K.I., Xanthos, M.A.: Study on the degradation of polylactic acid in the presence of phosphonium ionic liquids. Polym. Degrad. Stab. 2009, 94, 834-844.

[65] Auras, R., Harte, B., Selke, S.: An overview of polylactides as packaging materials. Macromol. Biosci. 2004, 4, 835-864.

[66] Ghorpade, V.M., Gennadios, A., Hanna, M.A.: Laboratory composting of extruded poly(lactic acid) sheets. Bioresour. Technol. 2001, 76, 57-61.