UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

DEGRADACE VĚTVENÝCH POLYESTERŮ VE VODNÉM PROSTŘEDÍ S RŮZNOU IONTOVOU SILOU

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2014 Veronika Nolová

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, 2014 Veronika Nolová

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Milanovi Dittrichovi, CSc. za trpělivé vedení a cenné rady při vypracovávání této diplomové práce.

ABSTRAKT

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

Kandidát:	Veronika Nolová
Školitel:	Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.
Název diplomové práce:	Degradace větvených polyesterů ve vodném prostředí s různou iontovou silou.

Teoretická část diplomové práce pojednává o fyzikálních a chemických vlastnostech kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Dále je zmíněn mechanismus jeho biodegradace a faktory tento proces ovlivňující a také biokompatibilita. Dále pojednává o implantátech, využití PLGA a jiných polymerů v in situ formujících se implantátech. Krátce je pak zmíněno využití biopolymerů v medicíně. V rámci experimentální části byl zkoumán vliv iontové síly na degradaci větvených polyesterů, konkrétně PLGA větveném na mannitolu a také na lineární PLGA. Použité polymerní matrice byly uloženy při teplotě 37°C ve fosfátovém pufru o různé koncentraci a ve vodném prostředí bez přídavku iontů. Následně byly vypočítány hodnoty stupně bobtnání a stupně eroze v intervalu 1, 3, 7, 14 a 21 dní. Výsledky bylo potvrzeno, že testovaný lineární polymer PLGA bobtná více s klesající iontovou silou, avšak v samotném vodném prostředí bobtná jen omezeně. Větvené polymery také bobtnají více v prostředí obsahujícím ionty než ve vodě, avšak v porovnání s lineárním polymerem méně.

ABSTRACT

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

Candidate:	Veronika Nolová
Supervisor:	Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.
Title of diploma thesis:	Biodegradation of branched polyesthers in the aquous medium with various ionic force

The theoretical part of the diploma thesis deals with the physical and chemical properties of the copolymer of lactid and glycolic acid (PLGA). It is also mentioned mechanism of biodegradation and factors influencing this process and biocompatibility. It also deals with the implants, the use of PLGA and other polymers in in situ forming implants. Then briefly mentioned the use of biopolymers in medicine. Within the experimental part, the influence of ionic strength on the degradation of branched polyesters, namely the PLGA branched mannitol and linear PLGA. Polymeric matrices were stored at 37 ° C in phosphate buffer at various concentrations and in an aqueous medium without addition of ions. Subsequently, the calculated value of degree of swelling and the degree of erosion during a period of 1, 3, 7, 14 and 21 days. The results confirmed that the tested linear polymer PLGA swells more with decreasing ionic strength, but in an aqueous medium swells limited. Branched polymers also swell more in an environment containing ions than in water, but less in comparison with the linear polymer.

Seznam zkratek

Teoretická část

PLGA- kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

LA- mléčná kyselina

GA- glykolová kyseliny

DLA- D-mléčná kyselina

LLA- L-mléčná kyselina

PLA- poly-mléčná kyselina

PGA- poly-glykolová kyselina

Tg- teplota skelného přechodu

SPR- povrchová plazmatická rezonance

ISFI- in situ formující se systémy

PCL- polykaprolakton

PEG- polyethylenglykol

LCST- nižší kritická teplota roztoku

PEO- polyethylenoxid

PPO- polypropylenoxid

MPEG- methoxypropylmethylcelulosa

MC- methylcelulosa

HPC- hydroxypropylcelulosa

HPMC- hydroxypropylmethylcelulosa

NMP- N-methylpyrrolidon

DMSO- dimethylsulfoxid

SAIB- isobutyrát octanu sacharozy

ISM- in situ mikročástice

PEC- polyethylenkarbonát

hexPLA- hexylem substituovaný polylaktát

PGS- polyglycerolsebakát

PAGA- poly-α- (4-aminobutyl)-L-glykolová kyselina

Praktická část

PLGA- lineární kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

3M- kopolymer kyseliny mléčné a glykolové s přídavkem mannitolu

5M- kopolymer kyseliny mléčné a glykolové s přídavkem mannitolu

m_L- hmotnost prázdné lahvičky (g)

m_0- původní hmotnost tělíska (g)

m_{Lb}- hmotnost lahvičky s nabobtnaným tělískem (g)

m_b- hmotnost nabobtnaného tělíska (g)

m_{Ls}- hmotnost lahvičky s vysušeným tělískem (g)

m_s- hmotnost vysušeného tělíska (g)

B- stupeň bobtnání (%)

E- stupeň eroze (%)

Obsah

1. Teoretická část 1

1.1 Vlastnosti PLGA 1

1.2 Degradace PLGA 3

1.2.1 Biodegradace polyesterů 3

1.2.2 Biodegradace PLGA 4

1.3 Biokompatibilita 7

1.4 Implantáty in situ 9

1.4.1 In-situ zesítěné systémy 11

1.4.2 In-situ tuhnoucí organogely 11

1.4.3 In-situ fázově separační systémy 12

1.4.4 Budoucnost vývoje ISFI 17

1.5 Aplikace alifatických polyesterů 18

2. Experimentální část 20

2.1 Postup přípravy 20

2.1.1 Příprava polymerních tělísek 20

2.1.2 Příprava pufru 20

2.1.3 Stanovení stupně bobtnání a stupně eroze 20

2.2 Použité přístroje 22

2.3 Použité chemikálie 22

2.4 Vzorce pro výpočet 23

3. Výsledky- tabulky a grafy 24

4. Diskuze 58

5. Závěry 62

6. Použitá literatura 63

Zadání práce

Cílem diplomové práce bylo připravit dostatečný počet polymerních tělísek stejné velikosti a standardního tvaru metodou formování ochlazením taveniny. Pro přípravu tělísek byly doporučeny tři nosiče, které se lišily jednak parametry molekulové hmotnosti, jednak parametrem konstituce molekuly dané stupněm větvení. Takto připravená tělíska bylo zadáno sledovat v předem stanovených intervalech z hlediska jejich objemových a hmotnostních změn reprezentovaných parametrem stupeň bobtnání a stupeň eroze. Bylo doporučeno použít pro studium časových řad parametrů řadu roztoků fosfátových pufrů o hodnotě pH 7,0 s odlišnou koncentrací pufrové složky, tedy s různou iontovou silou.

Úvod

Studium biodegradabilních polymerů má velký význam pro vývoj léčivých přípravků obsahujících léčiva s komplikovanou biologickou dostupností, např. proteiny nebo u léčivých přípravků sloužících k terapii chronických onemocnění. Polymery mají tu výhodu, že mohou léčivo uvolňovat po týdny až měsíce bez nutnosti opakovaného podání, což jednoznačně zvyšuje pacientovu kompliance k léčbě onemocnění. Pokud je nosičem léčiva biodegradabilní polymer, není nutné operabilní vyjmutí použitého implantátu, neboť se implantát postupně rozpadne na netoxické a tělu vlastní látky. Pro lepší uplatnění polymerů v terapii je třeba dále studovat vlastnosti těchto látek a hledat takové látky, které by byly netoxické, biodegradabilní a měly jasně daný profil uvolňování léčivé látky.

1. Teoretická část

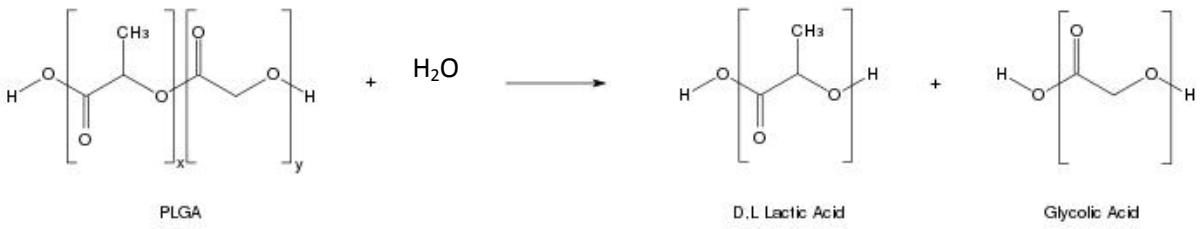
1.1 Vlastnosti PLGA

Polyester PLGA je kopolymer kyseliny mléčné (LA) a glykolové (GA). Kyselina mléčná obsahuje asymetrický alfa uhlík, díky kterému se může vyskytovat v D nebo L formě. V kyselině mléčné se D forma označuje jako D-mléčná kyselina (DLA) a L forma jako L-mléčná kyselina (LLA). PLGA je akronym pro kopolymer D, L-mléčné a glykolové kyseliny, kde jsou D a L forma kyseliny mléčné přibližně ve stejném poměru.(1)

PLGA jako biodegradabilní syntetický polymer byl poprvé použit jako chirurgické šití v šedesátých letech 20. století. Úspěšný vývoj tohoto šicího materiálu vedl k rozvoji výzkumu tohoto polymeru pro použití jako polymerní biomateriál. Od té doby byl polymer považován za nejúspěšnější a nejrozšířenější pro využití v systémech s řízeným uvolňováním a je považován za zlatý standard mezi biodegradabilními polymery používanými v systémech s řízeným uvolňováním. PLGA je používána pro uvolňování celé řady léčiv, od malých molekul, přes peptidy, proteiny, zahrnující hormony regulující plodnost, růstové hormony, steroidní hormony, přes protizánětlivé léky, cytokiny, chemoterapeutika, antibiotika, antagonisty narkotik, insulin a vakcíny. V porovnání s ostatními studovanými polymery, PLGA je snadné upravit do různých forem, jako jsou snadno injekčně podávané mikro- a nanočástice.(2)

Pro využití na systémy uvolňující léčivo je podstatné znát jeho fyzikální, chemické a biologické vlastnosti.

PLGA je rozpustná v celé řadě rozpouštědel, jako jsou tetrahydrofuran, aceton, ethylacetát a různá chlorovaná rozpouštědla. Ve vodě PLGA podléhá degradaci hydrolytickým mechanismem a rozpadá se na estery, ze kterých se skládá, jak je znázorněno na následujícím schéma. (1)



Obr.1 Hydrolýza PLGA (1)

Polymer LA je díky methylovým skupinám více hydrofobní než GA. Pokud je v PLGA více zastoupená LA, molekula je více hydrofobní a tudíž pojme méně vody, což způsobí její pomalejší degradaci.[1] Pokud tedy potřebujeme, aby byl polymer rychleji penetrován vodou, musí mít v molekule LA menší zastoupení. Naopak, pokud potřebujeme, aby byla molekula více lipofilní, z důvodu lepšího zapracování lipofilního léčiva, použijeme kopolymer s vyšším poměrem LA. [2]

Fyzikální vlastnosti PLGA závisí na různých faktorech, zahrnují počáteční molekulovou hmotnost, poměr LA a GA v molekule, tvar připraveného produktu, vystavení vlhkosti (což je ovlivněno velikostí povrchu) a skladovací teplota. Díky hydrolytické degradaci se s časem mění parametry, které u ostatních formulací zůstávají stejné po celý čas. Těmito parametry jsou především teplota skelného přechodu (Tg), obsah vlhkosti a molekulová hmotnost. Teplota tání a krystalinita je u polymerů úzce spjata s jejich molekulovou hmotností. [1]

Teplota skelného přechodu u kopolymerů PLGA se pohybuje mezi 40-60°C a je závislá na kompozici kopolymeru a molekulové hmotnosti [2]. Tg klesá se snižujícím se zastoupením PLA v molekule a také se snižující se molekulovou hmotností.[1]

Mechanická odolnost, schopnost zvětšit svůj objem, podlehnutí hydrolýze a následné biodegradaci jsou závislé na krystalinitě PLGA, což závisí na typu a molárním poměru monomerů v řetězci. Platí, že čím je v molekule větší zastoupení GA, tím je degradace rychlejší. Avšak nejrychlejší degradaci molekula podléhá, pokud je poměr LA a GA 50:50. [1]

Pokud je v molekule kopolymeru více zastoupena GA, vzniká produkt s vyšší krystalinitou. Avšak pro účely lepšího zapracování léčiva do kopolymeru, je důležité mít více amorfní produkt. Proto se k polymerizaci využívá racemická směs D-,L-LA, která ve výsledku vytváří látku s amorfní strukturou. [2]

Pro aplikaci PLGA je nezbytné sledovat degradační proces. Proto byly vyvinuty metody sledující stav rozkládajícího se materiálu, zahrnující povrchovou plazmatickou resonanci (SPR ang. Surface plasma resonance), fluorescenční resonanci, magnetickou resonanci atd. Tyto metody jsou však experimentálně náročné a často nekompatibilní s biologickým materiálem. [3]

1.2 Degradace PLGA

1.2.1 Degradace polyesterů

Polyestery se rozkládají hydrolytickým štěpením, pokud je polyester ve vodném prostředí štěpí se v esterové vazbě. Předpokládá se, že na průběh hydrolytické degradace mají vliv čtyři parametry: rychlostní konstanta, množství absorbované vody, difúzní koeficient fragmentů řetězce a rozpustnost vedlejších produktů degradační reakce ve vodném prostředí. (4)

Degradace polymerní matrix může probíhat následujícími mechanismy:

- povrchovou (heterogenní)
- objemovou (homogenní) erozí. (5)

V prvním případě, voda se absorbuje polymerem a dochází k hydrolytickému štěpení esterových vazeb na povrchu polymerní matrix. To poskytuje produkt, který je zakončen karboxylovými skupinami. Zpočátku je degradace polymeru rychlejší než pronikání vody do polymeru, což má za následek degradaci hlavně na povrchu a ne uvnitř polymerní matrix. Projevuje se to jako úbytek molekulové hmotnosti a úbytek polymerní masy. Reakce/ difúzní jev, který vyvolá rozpustnost nízkomolekulárních produktů degradace z povrchu a vnitřních částí polymeru, řídí degradaci polymeru.

Z malých polymerních tělísek může rozpustný oligomer uniknout dřív, než je prostředek úplně degradován. Naopak z velkých tělísek unikají pouze rozpustné oligomery, které jsou situovány blízko vnějšího okraje, ty co jsou ve vnitřní vrstvě, nemohou uniknout díky malému difúznímu koeficientu. (4,5)

V druhém případě homogenní eroze, polymer degraduje pomalu a difúze vody do systému je rychlejší než degradace polymeru. Ve výsledku, je celý systém hydratován rychle, a když se polymer rozpadá na oligomery, jsou štěpené celé. (6)

Je důležité zmínit, že polymery se rozkládají oběma způsoby v závislosti na podmínkách eroze, geometrii tělíska a hydrofilně/hydrofobních vlastnostech polymeru.(5,6)

1.2.2 Biodegradace PLGA

Provedením výzkumu rozsahu hydrolýzy různě velkých těles složených z PLGA, bylo dokázáno, že degradace probíhá heterogenním mechanismem. Heterogenní hydrolytická degradace se projevuje masivním odštěpováním v jádru molekuly a menším na povrchu.

U částic menších než 300 mikrometrů bylo zjištěno, že degradace probíhá homogenním mechanismem.(8)

Faktory ovlivňující chování kopolymeru kyseliny glykolové a mléčné během degradace jsou uvedeny v následujícím přehledu:

Faktory ovlivňující chování biodegradabilních polymerů během hydrolytické degradace:

- propustnost vody a rozpustnost (hydrofilita/lipofilita)
- chemické složení
- mechanismus hydrolýzy (nekatalyzovaná, autokatalyzovaná, enzymatická)
- přítomnost aditiv (kyseliny, báze, monomery, rozpouštědla, léčiva)
- morfologie (krystalická, amorfní)
- rozměr tělesa (velikost, tvar, poměr mezi povrchem a objemem)
- porozita
- teplota skelného přechodu (stav sklovitý, elastický)
- molekulová hmotnost a její distribuce
- fyzikálně-chemické faktory (pH, iontová síla, iontová výměna)
- sterilizace
- místo implantace. [7]

Kinetika degradace mikrosfér složených z kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové byla určena pokusy na potkanech. Potkanům byly podány intramuskulárně do nohy mikrosféry obsahující norethisteron nebo lypressin, mikrosféry polymeru (DL-PLGA) byly označeny radioaktivní značkou, která byla do polymeru vpravena během polymerizace jako ^{14}C-DL-laktátový monomer. Tím bylo zjištěno, že nejrychleji se rozpadá kopolymer složený z kyseliny glykolové a mléčné v poměru 50:50 a s rostoucím množstvím laktátu v molekule se degradace zpomaluje.[7]

Přísady prostřednictvím svých kyselých nebo zásaditých vlastností, stejně tak množství jejich dávky v případě terapeutických látek mohou výrazně ovlivnit degradační poměr mikrosfér. Bylo zaznamenáno zvýšení degradační rychlosti mikrosfér přidáním terciální amino sloučeniny, jíž byl thioridazin. Tento výsledek potvrdil, že nukleofilní dusík thioridazinu zásadně přispívá na degradaci esterových vazeb.

Zásadité sloučeniny tedy mohou katalyzovat rozdělení esterových vazeb a tím urychlovat degradaci polymeru. Na druhou stranu, odpovídající množství zásaditých látek může neutralizovat koncové karboxylové skupiny a tím zpomalit průběh degradace. Tento

potenciální efekt kyselých nebo bazických látek vpravených do mikrosfér se musí brát v úvahu při projektování formulace mikrosfér. [9]

Krystalinita homopolymeru nebo kopolymeru hraje významnou roli v modulaci rychlosti rozpadu. Při dlouhodobé studii PLA in vivo vědci implantovali dva různé typy implantátu subkutánně potkanům. Degradace trvala poměrně dlouhou dobu. Použitý první polymerní vzorek byl semikrystalický a měl mikropóry. Druhý vzorek, amorfní a tvarovaný vstřikováním jehlou, měl těsnou strukturu bez mezer. Studie prokázaly, že tvarování vzorku při vstřikování jehlou způsobuje úbytek molekulové hmotnosti implantovaného vzorku a rozdíly v chování během degradace mezi amorfním a krystalickým vzorkem. Pro semikrystalické látky platí, že degradace začíná v amorfních částech a později v krystalických částech. Během degradace se zvyšuje krystalinita a vzniká tak vysoce krystalický materiál, který je mnohem více odolný vůči hydrolýze než výchozí polymer. Tyto výsledky ukazují na možnost, že postupy při výrobě léčiva můžou mít vliv na účinek preparátů zhotovených s biodegradabilních polymerů.[10]

Porozita připravených částic polymeru může hrát významnou roli při zvyšování míry biodegradace, zvláště pokud rozměr pórů je tak velký, že dovoluje migraci buněk skrz póry částic. Tento efekt byl pozorován při pokusech s kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové v poměru 75:25 obsahujícím póry a protein podobný fyziologickému v kostech. Jeho degradace trvala po implantaci 3 týdny. Naproti tomu u neporézního kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové v poměru 74:26 by se očekávala degradace zhruba za 20 týdnů. [11]

Molekulová hmotnost a její distribuce může hrát velkou roli při degradačním chování. Široká distribuce molekulové hmotnosti indikuje relativně velký počet koncových karboxylů, což usnadňuje autokatalytickou degradaci polymerních řetězců. U široké distribuce molekulové hmotnosti by se dala očekávat taky urychlená degradace, zatímco u užší distribuce molekulové hmotnosti může mít méně koncových karboxylů a tím i menší možnost autokatalýzy. [7]

Faktory ovlivňující degradaci uvedené výše ukazují, že je složité navrhnout systém, který slouží k aplikaci nějaké terapeutické látky, tak aby degradace byla úzce specifikována. Nezbytné jsou proto in vivo testy k validaci chování během kontrolovaného uvolňování a rychlost uvolňování jakékoliv dané terapeutické látky, která se má uvolnit z přípravku.[7]

V sérii studií byla sledována biodegradace a odpověď tkání na injekční podání biodegradabilních mikrokapsul složených z poly-D-mléčné kyseliny a kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové. V těchto studiích byl použit světelný mikroskop, transmisní a skenovací elektronový mikroskop, a techniky za použití radioizotopu uhlíku (^{14}C) a určení molekulové hmotnosti k vyhodnocení biodegradace a odpovědi tkáně na biodegradabilní mikrokapsuly. Je nutné uvést, že mikrokapsuly obsahovaly bioaktivní látku 1% lysin-8-vasopresin v 50:50 kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové, 0,40%-1,00% lysin-8-vasopresin v poly-D-laktátu a 9% námelový alkaloid v 50:50 kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové. Značný rozdíl v biodegradační rychlosti byl pozorován mezi mikrosférami poly-D-laktátu a PLGA mikrosférami po implantaci do svalů zažívacího ústrojí potkanů. Poly-D-laktátové mikrosféry projevily rozsáhlou erozi a rozpad za 360 dnů a ve 480. dni byly nalezeny v tkáních ještě residuální zbytky. Naopak PLGA mikrosféry ukázaly rozsáhlou erozi za 56 dní a kompletní degradaci už za 63 dní. Studie ztráty molekulové hmotnosti ukázaly, že 50:50 PLGA má poločas rozpadu (50% ztráta molekulové hmotnosti) za 15 dní. Během studie bylo zjištěno, že na degradaci nemá vliv zda mikrokapsula obsahuje lysin-8-vasopresin nebo námelový alkaloid.[12,13]

Efekt molekulové hmotnosti a místo aplikace u degradace in vivo u 75:25 PLGA mikrosfér, které měly rozměr 53-75 μm byl zkoumán Kameiem a spolupracovníky. V této studii byly použity polymery o molekulové hmotnosti 10 000 a 20 000, byly použity také dvě místa aplikace: podkožní tkáň a intravenózně do plic. Výzkumníkům se podařilo dokázat, že polymer o molekulové hmotnosti 10 000 se degraduje přibližně dvakrát rychleji než polymer s molekulovou hmotností 20 000. Polymer o molekulové hmotnosti 10 000 měl poločas degradace 8 dní, naproti tomu druhý polymer o molekulové hmotnosti 20 000 měl poločas rozpadu 18 dní, toto bylo zjištěno při subkutánní aplikaci potkanům. Navíc bylo zjištěno, že se rychleji snížilo množství kyseliny glykolové v polymeru než kyseliny mléčné a poměr kyseliny mléčné ve zbývajícím polymeru se zvyšuje s úbytkem hmotnosti. Degradace v plicích byla o trošku rychlejší u polymeru s molekulovou hmotností 10 000 a poločas rozpadu byl asi 4 dny, u polymeru s molekulovou hmotností 20 000 byl poločas rozpadu 14 dní. Také poměr kyseliny mléčné v polymeru roste s úbytkem molekulové hmotnosti.[14]

K rychlosti biodegradace by se dal uvést ještě výzkum provedený Tabatou a Ikadou, kteří použili mikrosféry složené z L-mléčné kyseliny, DL-mléčné kyseliny nebo homopolymery a kopolymery různé molekulové hmotnosti a monomerní kompozice. Tito výzkumníci studovali fagocytózu mikrosfér o velikosti 2 mikrometry v myší peritoneální

kultuře fagocytárních buněk. Mikroskopické pozorování ukázalo, že fagocytované mikrosféry byly postupně degradovány ve vnitřním prostředí makrofágů. Výzkumníci použili fluorescenční barvivo vpravené do mikrosfér, které se uvolní ke konci degradace. Nejrychleji degradující systém se skládal z 50% molů glykolové kyseliny a 50% molů L-mléčné kyseliny. Během sedmi dní byla pozorována kompletní degradace tohoto polymeru. Ostatní kopolymery s vyšším nebo nižším obsahem kyseliny glykolové degradovaly pomaleji a uvnitř makrofágů byly identifikovány i po 7 dnech.[15]

1.3 Biokompatibilita

Hodnocení biokompatibility implantabilních nosičů vyžaduje porozumění zánětlivým pochodům a odpovědi hojící se tkáně na implantované materiály. Zánět, hojení rány a tělesná odpověď na cizí látky jsou považovány za složky tkáňové a buněčné odpovědi na poranění. Odpověď na poranění je iniciována procesem aplikace v případě injekčního podání implantátu rozpuštěného ve vhodném vehikulu. Humorální a buněčné mechanismy jsou nastartovány k zánětlivé a hojivé reakci a stupeň, kterým jsou tyto mechanismy rušeny a rozsah patofyziologické odpovědi a jejich rozložení jsou opatření hostitelovy reakce na způsob podání léku. Hostitelská reakce se rozděluje na tkáňově závislé, orgánově závislé a druhově závislé. [16-19]

Pořadí událostí následujících po implantaci je následující:
Poranění (injekce, implantace),
Akutní zánět (leukocyty),
Chronický zánět (monocyty, lymfocyty),
Granulace tkáně (fibroblasty, nové krevní kapiláry),
Reakce na cizí těleso (makrofágy),
Fibrosa.
Tyto procesy jsou obecně považovány za tkáňovou odpověď.

Velikost, tvar, chemické a fyzikální vlastnosti biomateriálu, protézy nebo jiného zařízení může ovlivňovat intenzitu a časový průběh zánětlivého a hojivého procesu. [17]

Kromě povrchu a objemu jsou další charakteristiky, které ovlivňují odpověď na implantát. Pokud je implantát tvořen porézním materiálem, vznik akutního zánětu má určitou prodlevu, tak jak postupuje imunitní reakce od povrchu až ke středu masy. Pokud je implantovaný materiál opatřen obalem, může trvat dny až týdny než dojde k infiltraci buněk imunitního systému od povrchu k centru. [7]

Celá tkáňová odpověď může být charakterizována ve třech fázích. První fáze trvá první dva týdny po injekci a zahrnuje akutní a chronickou zánětlivou odpověď. U biokompatibilních biodegradabilních mikrosfér je tento mechanismus stejný bez ohledu na rychlost rozpadu biodegradabilního polymeru. [7]

Druhá fáze tkáňové odpovědi je zahájena nadbytkem monocytů a makrofágů. Doba jejich přítomnosti v místě aplikace implantátu závisí na rychlosti rozpadu implantátu. Monocyty migrují do místa aplikace a diferencují se na makrofágy, které se spojují a formují se tak obří buňky. Následně se začíná tvořit vazivová tkáň. Infiltrace fibroblasty spojená se sekrecí kolagenu, základního komponentu vazivového pouzdra, obklopuje místo implantace. Začínají se také formovat nové krevní kapiláry. [7]

Třetí fáze biodegradace je charakterizována rozpadem implantátu na menší částice. Formace z částic, které jsou menší než původní implantát, zahajují tkáňovou odpověď, ve které hrají hlavní roli makrofágy, a tímto způsobem degradace probíhá rychleji. Doba trvání této fáze je závislá na typu polymeru a jeho degradační rychlosti. Rychle se rozpadající polymery vykazují v této fázi dobu rozpadu kolem jednoho až dvou týdnů, u pomaleji se rozpadajících polymerů trvá tato fáze od několika týdnů k několika měsícům. Fibrózní kapsula vytvořená během fáze dvě je ve třetí fázi obohacena o fibroblasty a nové kapiláry, což vyplňuje objem, který se ztratil z implantátu během jeho degradace. [7]

Způsob zánětlivé reakce a reakce na cizí těleso je dán různým způsobem podání, stejně tak místem implantace do tkáně nebo orgánů. Ve výzkumu Spenlehauera byly podány potkanům injekce 75:25 PLGA mikrosfér do portální žíly. Po 24 hodinách byly mikrosféry identifikovány v menších cévách jater, ale nebyl pozorován ani purulentní ani hemoragický zánět. Po třech týdnech byly mikrosféry stále neporušené a bylo pozorováno jen malé množství makrofágů, lymfocytů a obřích buněk na povrchu mikrosfér. Po čtyřech týdnech bylo pozorováno poškození tvaru mikrosfér a zvětšoval se počet obřích buněk. Po pěti týdnech mikrosféry ztratily svou integritu. A po šesti týdnech byly pozorovány jen malé zbytky PLGA. Totální resorpce byla pozorována po 12 týdnech. [20]

Přímé intravenózní podání biodegradabilních mikrokapsul do cílového orgánu může změnit zánětlivé a hojící odpovědi. Pokud je poranění v místě implantace minimální, je také zánětlivá reakce minimální a pouze lokální. Také se zjistilo, že po žilním podání nebyly pozorovány rezidua po fibróze. Tento fakt je možná způsoben tím, že v žilním systému nejsou mikrosféry pohromadě, ale jsou unášeny krví každá zvlášť. [20]

Při zvažování nad tkáňovou odpovědí na implantovaný materiál je také důležité myslet na typ léčiva, které je v implantátu zabudováno, například jestli není cytotoxické nebo protizánětlivé. Pokud použijeme cytotoxickou látku, může to mít poškozující vliv na zánětlivou reakci (fáze I.) a na reakci na cizí těleso (fáze II.). V případě, že bude léčivo protizánětlivé, dojde ke snížení počtu leukocytů v místě zánětlivé reakce na implantát. [21]

1.4 Implantáty in situ

Díky neustále narůstajícímu počtu léků založených na biotechnologiích a složek, které nemohou být podávány orálně, zaznamenal značný nárůst výzkum systémů pro parenterální podání. Parenterální systémy mohou být navrženy tak, aby poskytovaly flexibilní způsob podání. Parenterální depotní systémy mají tu výhodu, že se nemusí použít konstantní infůze nebo nemusí být často aplikovány injekce. Byly vyvinuty formulace, které uvolňují léčivo od dnů, po týdny, měsíce až léta. Parenterální depotní systémy zvyšují pacientovu kompliance díky snížení počtu aplikací léčiva. Depotní systémy také minimalizují nežádoucí vedlejší účinky způsobené kolísající hladinou léčiva v krvi. V případě, že je použit parenterální depotní systém pro lokální terapii, sníží se tím i celková toxicita pro organismus, léčivo je uvolňováno jen v místě potřeby. Typickým příkladem pro využití parenterálních depotních systémů, je léčba hormonálně sensitivní rakoviny prsu a prostaty, lokální léčba infekcí nebo lokální léčba oka.[22]

Dostupné jsou různé typy lékových forem, jako roztoky, emulze, liposomy, micely, implantáty, mikročástice, nanočástice a nanokapsuly. Avšak pro využití pro systémy s řízeným uvolňováním jsou podstatné jen implantáty a mikročástice. Předpřipravené implantáty jsou připravené vytlačováním (extruzí) taveniny a jsou podány subkutánně speciálním aplikačním zařízením nebo velkou jehlou.[23]

V případě že je použit nebiodegradabilní materiál, je nutno implantát po ukončení doby uvolňování léčiva vyjmout. Pokud je použit biodegradabilní materiál, polymer se rozkládá, uvolňuje monomery, které jsou metabolizovány a vyloučeny.

Typický subkutánní implantát je 10mm dlouhý a má cylindrický tvar o průměru 1mm. Je aplikován pomocí jehly kalibru 16 (průměr 1,65 mm). Takové velké jehly mohou vzbudit v pacientovi obavu, proto jsou připravovány systémy na bázi mikročástic, které jsou podávány menší jehlou. Mikročástice jsou podávány pomocí dvoukomorové stříkačky, která od sebe odděluje částice a disperzní prostředí, toto je prevencí proti předčasnému rozkladu.

Nevýhodou použití mikročástic je komplexní a nákladný vývoj, složitý způsob podání, u kterého hrozí nekompletní rozptýlení částic v disperzním prostředí, ucpání jehly a tím následně dojde k nekompletnímu podání léčiva. [22]

Díky nevýhodám při používání předpřipravených implantátů a mikročástic, byly vyvinuty alternativní depotní systémy s následujícími charakteristikami: rychlé, bezbolestné a snadné podání pomocí malých jehel, jednoduchá výroba a nízká cena. Jako výsledek byly připraveny biodegradabilní in situ formující se systémy (ISFI). Před aplikací ISFI představuje systém s nízkou viskozitou. Po aplikaci dojde ke změně na polotuhý nebo tuhý depot. [24]

Biodegradabilní implantáty mají z pohledu pacienta velkou výhodu, představují méně invazivní a také méně bolestivý způsob podání. Také se zvyšuje kompliance a vyhneme se použití složitých technik pro aplikaci a následné odstranění implantátu. Tyto charakteristiky proto povzbudily mnoho výzkumníků k výzkumu jejich dalšího využití. ISFI byly zkoumány pro využití v systémové i lokální terapii. Našly také využití v tkáňovém inženýrství, trojrozměrné kultivaci buněk, buněčné transplantaci nebo pro ortopedické a dentální použití. [25,26]

ISFI můžeme klasifikovat podle jejich mechanismu formace po implantaci:

- In-situ zesítěné polymerní systémy
- In-situ tuhnoucí organogely
- In-situ fázově separační systémy.[22]

1.4.1 In-situ zesítěné systémy

Tohoto systému bývá dosaženo fotoinicializací, chemicky pomocí síťovacího činidla nebo fyzikálně přidáním síťovacího monomeru. Pro využití této technologie je důležité vybrat netoxické monomery, činidla a rozpouštědla a brát v úvahu fyziologické prostředí a teplotu jako vhodné prostředí pro polymerizaci. [24]

a. Fotoinicializační systémy: Jsou to kapalné látky, které po aplikaci rychle polymerizují za fyziologických podmínek. Vyžadují použití monomeru, který má alespoň dvě volné pozice pro vytvoření radikálu, fotosensitivní iniciátor reakce (např. eosinové barvivo) a ultrafialové nebo viditelné světlo. Tyto systémy se

používají v zubním lékařství, ortopedii, buněčné transplantaci, v tkáňovém inženýrství nebo u léčiv k dosažení cíleného místa účinku. [22]

b. Fyzikálně zesíťující systémy: U těchto systémů dochází po přidání monomeru k vytvoření síťovité struktury pomocí vazeb. Vytvářejí se vodíkové vazby nebo dochází k iontovým interakcím. Využívají se systémy založené na alginátu, který vytváří gel v přítomnosti dvoumocných kationtů, jako je například vápenatý kation. Tento systém našel uplatnění v očním lékařství.[27]
c. Chemicky zesíťující systémy: U těchto systému se vytváří kovalentní vazby. K chemické modifikaci systému dochází přidáním činidla, jako jsou benzoylperoxid, dialdehydy (glyoxal, glutaraldehyd) nebo šťavelová kyselina. Toxicita těchto činidel je značná, i při použití velmi nízké koncentrace. Náhradou může být genipin, což je aglykon odvozený od glykosidu geniposidu. Ten se nachází v ovoci a je používán i jako potravinářské barvivo.[28]

1.4.2 In-situ tuhnoucí organogely

Organogely jsou polotuhé systémy složené z trojrozměrné sítě do sebe zapadajících vláken a kontinuální kapalnou organickou fází. Gel je připravován rozpouštěním gelační látky, obvykle v koncentraci 15% v zahřátém rozpouštědle. Po ochlazení se rozpustnost snižuje. Gelační látka se začne shlukovat do agregátů, které tvoří síť pomocí fyzikálních interakcí. Mezi používané gely patří například N-methyl-2-pyrrolidon, N-stearoyl-L-alaninmethylester nebo gely tvořené estery mastných kyselin s glycerolem. [29]

1.4.3 In-situ fázově separační systémy

Zcela jiná strategie pro vytvoření depa uvolňující léčivo je využití fázové separace z roztoku. Takové polymery podléhají prudkým změnám v jejich rozpustnosti na základě působení teploty prostředí, pH nebo odstraněním rozpouštědla.

a- pH-indukované gelační systémy

Změna ze solu na gel je indukována změnou pH prostředí. Tohoto lze využít u polymerů, které mají ionizovatelné funkční skupiny. [30]

b- Termoplastické pasty

Termoplastické pasty jsou polymery, které mají bod tání nebo teplotu skelného přechodu v rozmezí 25°-65°C. Před aplikací se látka zahřeje na teplotu tání nebo teplotu skelného přechodu, pak je aplikována v podobě kapaliny. V organismu pak vytvoří polotuhé depo, jak látka chladne na tělesnou teplotu. Při teplotě pro aplikaci injekcí (37-65°C) se polymer chová jako viskózní kapalina a po stlačení snadno teče. Léčivo je inkorporováno do roztaveného polymeru pouhým smícháním bez využití organických rozpouštědel.

Původně se termoplastické pasty připravovaly z polymerů, jako jsou polyanhydridy, PCL (polykaprolakton), PLA, směs PLA s PEG (polyethylenglykol) jako například triblokový kopolymer PLA-PEG-PLA. Ale tyto polymery mají vysoký bod přechodu na kapalnou látku, pro injekční aplikaci musely mít teplotu i nad 60°C. Takováto injekce byla velice bolestivá a vedla k nekróze v místě aplikace. Léčivo se z nich uvolňovalo velmi pomalu. [31]

c- Termálně-indukované gelační systémy

Termálně indukované gelační systémy podléhají přeměně ze solu na gel ve vodném prostředí při vzrůstající teplotě. Tepelně sensitivní polymery jsou atraktivní pro použití, jelikož nevyžadují organická rozpouštědla, polymerizační činidla ani externí spouštěče gelace ve fyziologickém prostředí. Na základě toho, tepelně indukovaný fázový přechod je závislý pouze na teplotě, během jejíž změny dochází k molekulárním interakcím, jako jsou například tvorba vodíkových můstků nebo hydrofobní efekt. Při nižší kritické teplotě roztoku (LCST) vodíkové vazby mezi molekulami vody a polymeru začínají být nevýhodné a dochází k interakcím pouze mezi molekulami polymeru. Solvatované makromolekuly ztrácejí vodu a narůstají interakce mezi molekulami polymeru. Polymer se shlukuje do síťovité struktury, což je provázeno prudkou změnou ve viskozitě. V ideálním případě polymer za pokojové teploty volně teče a stává se gelem při tělesné teplotě. Tvar gelového depa a profil uvolňování léčiva jsou závislé na kinetice přeměny solu v gel. Teplotou kontrolované gelační chování vykazují jak syntetické, tak přírodní materiály.[26]

Nejvíce studované jsou polymery polyethylenoxidu (PEO) a polypropylenoxidu (PPO), známé jako poloxamery. Tyto systémy však mají omezené využití, protože nejsou biodegradabilní. Jediný používaný zástupce je Poloxamer 188, avšak rychle se rozpadá a vhodný je pouze pro krátkodobou terapii. [26]

Blokové kopolymery z PEG a kopolymeru laktidu a glykolidu (PLGA) jsou považovány za alternativy a jsou biodegradabilní. Při teplotě kolem 15°C PEG-PLGA-PEG a PLGA-PEG-PLGA kopolymery mají micelární strukturu ve vodném prostředí, kde PLGA vytváří vnitřní hydrofobní jádro. Gelace za tělesné teploty probíhá mechanismem shlukování micel. Pro vytvoření gelu je nutná koncentrace polymeru mezi 10-30%. Vlastnosti micel a LCST závisí na délce a složení bloků polymerů. Hydrofobní léčiva inkorporovaná do polymeru silně ovlivňují následný proces jejich uvolňování.[32] Na příkladu studie s ketoprofenem a spironolaktonem bylo dokázáno, že uvolňování hydrofilního ketoprofenu trvalo asi 2 týdny, u hydrofobního spironolaktonu trvalo uvolnění léčiva 2 měsíce. [33]

Gely tvořené triblokovými kopolymery PEG a PLGA jsou komerčně prodávány pod značkou ReGel®.[33]

Blokové kopolymery byly intensivně studovány pro solubilizaci a stabilizaci ve vodném prostředí u nestabilních léčiv jakou jsou paklitaxel, cyklosporin a u polypeptidů a proteinů (zahrnující zink-inzulín a vepřový růstový hormon).

Výsledný přípravek obsahující paklitaxel uvolňoval účinnou látku přes padesát dní v laboratorních podmínkách. Přípravek využívaný in vivo s ReGelem® se po injekčním podání kompletně resorboval po 4-6 týdnech. Tento přípravek pod názvem OncoGel® je používán pro léčbu rakoviny prsu u lidí. Přímá aplikace gelu do místa výskytu nádoru umožňuje jen malou clearance léčiva z místa aplikace a poskytuje minimální distribuci paklitaxelu do jiných orgánů a tím méně nežádoucích účinků. OncoGel® se momentálně nachází ve druhé fázi klinického testování pro léčbu rakoviny jícnu a mozku. [26]

Také diblokové polymery PEG-PLGA tvoří ve vodě micely a podléhají přeměně ze solu na gel při 30°C. K tomu, aby se polymer rozpouštěl ve vodě, se využívají polymery složené z delších bloků PEG a kratších bloků PLGA. In vitro se PEG-PLGA kopolymery rozpadnou během jednoho týdne. Avšak více odolná gelová depa se vytvářela in vivo. Změnou v kompozici kopolymeru se dokázalo, že gel může zůstat v místě aplikace týden ale i dva měsíce. PLA a PLGA degradují na své monomerní kyseliny, což vyúsťuje v okyselení okolního prostředí. [34] Pro tato omezení byl připraven diblokový kopolymer methoxypolyethylenglykolu (MPEG) s PCL, ten přechází ze solu na gel během několika sekund za fyziologických podmínek. Jeho degradace nezpůsobuje okyselení okolního prostředí. In vivo si zachovává svojí integritu déle než 30 dní. Následné studie ukázaly výbornou in vivo účinnost systémů MPEG-PCL obsahující paclitaxel a doxorubicin po

injekční aplikaci do místa výskytu tumoru. Avšak oba systémy vykazují lepší účinnost v inhibici růstu podkožních nádorů než injekce čistého léčiva a také menší vedlejší účinky na organismus. [35]

Jak bylo zmíněno výše, tepelně sensitivní gely bývají připraveny z přírodně se vyskytujících polymerů. Samotná celuloza není ve vodě rozpustná. Navázáním hydrofilních skupin se deriváty celulozy stávají ve vodě rozpustnější. Pokud má derivát celulozy vyrovnaný poměr hydrofilních a hydrofobních skupin, geluje při zvýšené teplotě ve vodném prostředí. Typickými zástupci jsou methylceluloza (MC), hydroxypropylceluloza (HPC) a hydroxypropylmethylceluloza (HPMC). Nižší kritická teplota roztoku (LCST) závisí na substituci hydroxylových skupin, například MC fázově přechází v teplotním rozmezí 40-50°C, HPMC mezi 75-90°C a HPC asi při 55°C. Teplota fázového přechodu se dá upravit různými substitucemi na molekule celulozy nebo přidáním soli. Například přidáním chloridu sodného dojde ke snížení LCST na 32-34°C. Avšak tepelně gelační systémy derivátů celulozy nejsou dostačující pro rychlé injekční podání. [36]

Dále byly zkoumány gely MC s hyaluronanem, který poskytoval rychle-gelující materiál pro injekční podání. Fázový přechod vykazoval při teplotě těla. Avšak při testování na potkanech se zjistilo, že není biodegradabilní a tím je jeho využití limitováno. [37]

Dalším typem byl neutrální roztok založený na chitosanu se solí polyolu. Bez jakýchkoliv příměsí je chitosan rozpustný v kyselém prostředí a fázově se odděluje nad pH 6. Přidáním glycerolfosfátu do roztoku chitosanu je možné zvýšit pH do neutrální oblasti bez fázové separace. Tento systém je tepelně sensitivní a vytváří hydrogel při teplotě kolem 37°C. [38]

d- Systémy založené na fázové separaci pomocí změny rozpouštědla

U těchto systémů platí, že před injekčním podáním je léčivo ve formě roztoku nebo disperze. Po podání pod kůži se organické rozpouštědlo rozptýlí v okolní tkáni a vodné tělesné tekutiny prostupují do implantátu. Toto vede k fázové separaci a precipitaci polymeru, formuje se depot. Léčivá látka je uzavřena ve vytvořené matrix a následně se postupně uvolňuje procesem difúze nebo tak jak implantát podléhá biodegradaci. Tyto systémy se používají ve velkém množství přípravků s různými typy molekul léčiv, od malých (lidokain), přes peptidy až po proteiny. Jako polymery se přednostně používají PLA, PLGA a PCL, protože jsou schválené FDA.

Polymer je rozpuštěn v organických rozpouštědlech, které jsou velmi dobře mísitelné s vodou. Mezi tyto rozpouštědla patří například N-methylpyrrolidon (NMP), dimethylsulfoxid (DMSO), propylenglykol, aceton, tetrahydrofuran, 2-pyrrolidon, ethylacetát nebo nízkomolekulární PEG. Přičemž NMP je používaný nejvíce. Koncentrace polymeru v preparátu bývá mezi 10 až 80%. Koncentrace polymeru a jeho molekulová hmotnost ovlivňuje viskozitu roztoku před implantací. Dynamika fázové inverze je velmi složitý proces a je přímo závislý na vlastnostech rozpouštědla. Po kontaktu s vodným prostředím záleží na mísitelnosti rozpouštědla s vodou, pokud je velmi dobrá, proces fázové inverze probíhá rychle. Obecně, ztuhnutí těchto systémů se odehrává v řádu sekund až po několik minut. Rychlá fázová inverze polymerního roztoku a vysoká afinita rozpouštědla k precipitátu vyúsťuje v tvorbu implantátu s velkými póry, což je spjato s rychlým uvolňováním léčiva v iniciální fázi. Ztuhnutí polymeru při pomalé fázové inverzi trvá od několika hodin po dny. Morfologie těchto depot je víceméně jednotná s malými póry. Avšak viskozita těchto roztoků je vysoká, což znesnadňuje injekční podání a vyžaduje předchozí zahřátí na 37°C. [39]

Implantáty mohou být taktéž vyrobeny z biodegradabilních nepolymerních látek, např. isobutyrát octanu sacharózy (SAIB). SAIB je ve vodě nerozpustná, vysoce viskózní látka, která se používá jako stabilizátor emulzí u potravin. Zředěná malým množstvím organického rozpouštědla, jako je např. etanol, triacetin nebo NMP, může být podána jako nízkoviskózní přípravek. Po injekční aplikaci se rozpouštědlo rozděluje difúzí a zůstává viskózní adhezivní matrix složená ze SAIB s inkorporovaným léčivem. Testována s tímto systémem byla různá léčiva, např. lidský růstový hormon a risperidon. Tento systém má patentovaný firma DURECT pod obchodním názvem SABER™. Ve fázi klinického zkoušení mají přípravek SABER™-bupivakain (POSIDUR™). Ten se používá po chirurgických zákrocích. Jeho kontinuální uvolňování bupivakainu poskytuje nepřetržitou třídenní lokální anestézii. [40]

Hlavní záležitostí k řešení u in situ precipitačních systémů založených na odstranění rozpouštědla je potenciální nežádoucí lokální podráždění díky použití větších množství organických rozpouštědel a také velká prodleva od injekčního podání roztoku do vytvoření pevného implantátu. Studie biokompatibility NMP/PLGA a DMSO/PLGA roztoků na druhu makakus rhesus neukázaly žádnou akutní toxicitu nebo reakci tkáně podobnou jako u ostatních biodegradabilních polymerů. Naproti tomu studie myotoxicity ukázaly velký potenciál svalové toxicity. [41]

Další záležitost k řešení je stabilita polymerů, hlavně PLGA, a léčiva obsaženého v in situ systému. Pozorována byla rychlejší degradace PLGA se stoupající teplotou skladování a také pokud přípravek obsahoval vodu. Z těchto důvodů se musí polymerní roztoky skladovat při 4°C a léčivo musí být přidáno jako suchý prášek do roztoku těsně před podáním injekce. Navíc citlivá léčiva jako jsou proteiny, mohou být denaturována v přítomnosti organických rozpouštědel. Pro překlenutí těchto omezení byl vymyšlen systém, kde se léčivo obsahující polymer dispergovalo do fáze složené z oleje pro injekční podání. Kapénky polymerního roztoku ztuhly po kontaktu s vodným prostředím a vytvořily in situ mikročástice (ISM). V porovnání k ISFI, ISM může být připraveno z vyšší koncentrace polymeru a může být použito méně organického rozpouštědla, což umožňuje lepší injekční podání. ISM systém má redukované počáteční uvolnění léčiva a nemá myotoxicitu. [42]

Komerčně používané polymerní systémy, které precipitují po odstranění rozpouštědla, jsou následující přípravky:

Název přípravku	Léčivá látka	Výrobce	Indikace
Eligard®	Leuprolid acetát	Sanofi-Aventis	karcinom prostaty
Atridox®	Doxycyklin	TOLMAR	parodontitis
Posidur™	Bupivacain	DURECT	postoperační bolest
Relday™	Risperidon	DURECT	schizofrenie a bipolární porucha (prozatím v preklinickém zkoušení)[22]

1.4.4 Budoucnost vývoje ISFI

Hlavní překážky při vývoji ISFI jsou: variabilita tvaru vzniklého implantátu, potlačení rychlého počátečního uvolnění léčiva a toxicita materiálů, z nichž je matrix složena a použitých rozpouštědel.

Ideální implantát by měl splňovat tyto požadavky:

- nízká viskozita roztoku pro snadnou injekční aplikaci
- umožňuje jednoduchou inkorporaci léčiva
- složený je pouze s biodegradabilních a biokompatibilních součástí

- poskytuje dobrou stabilitu systému
- vykazuje nízkou variabilitu v procesu uvolňování léčiva a má nízké počáteční uvolnění léčiva.

Žádný ze současných systémů toto plně nesplňuje. [22]

Jak bylo zmíněno výše, hlavní výzvou je vytvoření spolehlivé formulace implantátu se zachováním respektu k velikosti, tvaru a struktury. Na to mají vliv různé parametry, které pocházejí z různých zdrojů.

Vliv: -prostředí: teplota, ionty, povrchové napětí, pH, přítomnost proteinů

-způsobu podání: rychlost injekčního podání, pohyb jehly, typ jehly

-formulace: složení, viskozita, povrchové napětí, rozpouštěcí kapacita.

Například PLGA-NMP systém se může zformovat do tvaru tyčky, pokud je podán rychle. Sférické implantáty se vytvářejí při pomalém podání. Kinetika při výměně rozpouštědla a s tím spojené uvolňování léčiva silně ovlivňují výsledný vzhled povrchu implantátu. Kromě silného vlivu na uvolňování léčiva řízeného difúzí, degradace implantátu bude také postižena autokatalytickým efektem v případě většího implantátu. Hlavní překážka v používání ISFI pro řízené uvolňování léčiva, zvláště pak nízkomolekulárních léčiv, je nízká reprodukovatelnost vytváření určitého tvaru implantátu v podmínkách in vivo u různých lidí po podání implantátu. Řešením by mohlo být použití multičásticových systémů, jako jsou in situ formující se mikročástice. Na druhou stranu však schopnost ISFI vyplnit nepravidelné defekty činí tyto systémy velmi atraktivní pro využití v tkáňovém inženýrství.

Další zajímavostí je vývoj hybridních implantátů, ve kterých se kombinují různé matrice, jako jsou SAIB s PLA nebo PLGA nebo inkorporace tuhých lipidů (glycerolmonostearát) do implantátu založeném na PLGA. Další látkou, která se nově testuje je polyethylenkarbonát (PEC). Ten vykazuje pravidelné uvolňování léčiva na rozdíl od nelineárního uvolňování zvláště v iniciální fázi u polymerů založených na PLGA. Pro opravdovou kontrolu nad rychlostí uvolňování léčiva je třeba znát nejen uvolňované množství, ale důležitější je znát dynamiku procesu, při kterém dochází k fázové separaci jak v in vitro podmínkách, tak in vivo za fyziologických podmínek. [43]

Další bod zájmu je studium bezpečnosti ISFI s ohledem na toxicitu jejich složek a stabilitu přípravku. Toxicita molekulových zesíťovadel a radikálových skupin je hlavní

překážkou použití těchto systemů v běžné praxi. Ale i toxicita organických rozpouštědel u in situ precipitačních systémů není zanedbatelná. Dlouhodobá stabilita PLGA zatím ještě nebyla dořešena. Zkoumají se různé přístupy pro snížení toxicity a zajištění stability. Jednou z možností je vyvinutí nového rozpouštědla nebo objevení nového degradabilního materiálu, který nepotřebuje žádné organické rozpouštědlo. Řešením by mohl být alkylem substituovaný polylaktát. Jako nejlepší varianta byl připraven hexylem substituovaný polylaktát (hexPLA), který vykazuje unikátní fyzikálněchemické vlastnosti. Je polotuhý, lipofilní a snadno aplikovatelný injekčně úplně bez nebo s malým množstvím NMP. Může být sterilizován suchým teplem a během degradace nezpůsobuje okyselení okolní tkáně. [44]

1.5 Aplikace alifatických polyesterů

Mimo použití alifatických polymerů jako nosičů léčivých látek se dále používají v následujících aplikacích:

1. Dodání proteinů

V posledních dvaceti letech se nestudoval žádny alifatický polyester k využití pro terapeutické dodání proteinů. Ani se přesně neví, jestli jsou tyto systémy právě pro proteiny použitelné. Studie provedené na kopolymeru laktátu a hydroxymethylglykolátu, z něhož byly připraveny mikrosféry obsahující lysozym, ukázaly, že lysozym se uvolňoval z mikrosfér stále stejným způsobem. Z mikrosfér vytvořených z PLGA se lysozym také uvolňoval stále stejně, pouze vykázal vetší uvolnění látky zpočátku. Důležité ovšem bylo, že uvolněný lysozym měl plně funkční enzymovou aktivitu a zachoval si svou strukturální integritu. Avšak, nerozpuštěné zbytky oligomerů z kyseliny mléčné vytvoří shluky, které pak způsobí, že uvolnění lysozymu není kompletní.

Náhradou L-laktátu, za D,L-laktát v kopolymeru se předchází vytvoření nerozpustných zbytků, což dokazuje, že i složení polymeru má vliv na uvolňování léčiva.

2. Tkáňové inženýrství

Degradabilní polymery jsou v tkáňovém inženýrství často používané. Používají se jak obyčejné polyestery, ale pro svou hydrofobicitu a nedostatek funkčních skupin důležitých pro adhezi k tkáni nejsou pro tvorbu polymerních skafoldů úplně vhodné. Další nevýhodou je jejich pomalý rozpad. Proto byly vyvinuty nové typy polymerů, tzv. elastomery, např. polyglycerolsebakát (PGS), který vykázal in vitro a in vivo biokompatibilitu. Další

zkoumanou látkou je kopolymer (1,8-oktandiolu) s kyselinou citronovou, který má potenciál v použití v kardiovaskulárním tkáňovém inženýrství.

3. Dodání genů

V posledních letech se stala genová terapie velmi důležitou zvlášť u pacientů se získanými nebo dědičnými genetickými nemocemi. Používání virů jako přenašečů genetické informace je sice efektivní, ale přináší sebou i nežádoucí vedlejší účinky. Proto byl použit ve vodě rozpustný polyester jako vektor pro přenesení a intracelulární uvolnění plastidové DNA. Příkladem může být poly-α-(4-aminobutyl)-L-glykolová kyselina (PAGA). PAGA vytváří s DNA tzv. polyplex, který je pro přenos DNA velmi efektivní a v nízkých koncentracích je pro buňky netoxický. [45]

2. Experimentální část

2.1 Postup přípravy

2.1.1 Příprava polymerních tělísek

Pro stanovení byla použita tělíska z polymeru o hmotnosti 0,150g ±5%. Polymer byl nejdříve zahřát na olejové lázni a následně pomocí injekční stříkačky natažen do silikonové hadičky. Po ztuhnutí polymeru byla silikonová hadička rozříznuta nožem, a tudíž byl k dispozici polymer ve formě tyček, ze kterých se dále pomocí skalpelu odřezávaly kousky cca 4mm dlouhé. Tyto kousky polymeru byly pak pomocí smirkového papíru upraveny na požadovanou hmotnost.

2.1.2 Příprava pufru

Fosfátový pufr se připraví smísením roztoků hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného. Aby bylo docíleno požadovaného pH 7.0, musí být roztoky smíseny v poměru 40 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného a 60 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného pro přípravu 100 ml pufru. Navážka dihydrogenfosforečnanu pro přípravu jeho roztoku je 10,4 g pro 1000 ml roztoku. Navážka hydrogenfosforečnanu sodného pro přípravu 1000 ml roztoku je 23,9g. Aby byl roztok izotonický, je třeba přidat 0,46g chloridu sodného na 100ml pufru. Takto připravený izotonický fosfátový pufr byl označen za koncentraci c=1. Část tohoto pufru byla naředěna destilovanou vodou v poměru 1:1 a připraven hypotonický pufr, ten byl označen jako koncentrace c=0,5. Dalším ředěním byly připraveny hypotonické pufry s koncentrací c=0,375, c=0,25, c=0,125. Ověření hodnoty pH pufru bylo provedeno pomocí pHmetru. Hodnota pH připraveného pufru byla 7,03.

2.1.3 Stanovení stupně bobtnání a stupně eroze

Polymerní tělíska byla zvážena na analytických vahách a umístěna do vytárovaných scintilačních lahviček. Lahvičky byly označeny štítky určující den/ označení paralelního stanovení A nebo B/ koncentrací pufru. Tělíska byla zalita pufrem. Takto připravené vzorky byly umístěny do biologického termostatu, který byl nastaven na teplotu 37°C. Odebírání vzorků probíhalo v intervalu 1, 3, 7, 14 a 21 dní. Výjimka nastala u odebírání vzorků PLGA u pufru s koncentrací c=0,5. Zde byl vzorek odebrán 15. den místo 14. dne.

Při odebírání vzorků, tak aby mohla být zjištěna hmotnost nabobtnaného tělíska, se vylil pufr a tělísko bylo osušeno pomocí vatového smotku a také pomocí vlasového

vysoušeče, ale pouze tak, abych byla odstraněna kapalina z lahvičky, nikoliv aby došlo k vysušení polymeru. Lahvička s polymerem byla zvážena na analytických vahách. Následně byly lahvičky umístěny do vakuové sušárny, kde se vzorky sušily cca 1 týden. Poté byly lahvičky s vysušeným tělískem zváženy na analytických vahách. Pomocí zjištěných hmotností byly vypočítány stupně bobtnání a stupně eroze.

Současně se stanovením bobtnání v pufru bylo provedeno stanovení stupně bobtnání a stupně eroze v čisté vodě. Postup je totožný se stanovením bobtnání v pufru. Lahvičky byly označeny koncentrací c=0.

U polymerů 3M a 5M byl postup stanovení totožný, avšak byly použity pouze pufry o koncentraci c=0,5; c=0,25; c=0,125 a voda.

2.2 Použité přístroje

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

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

Vakuová sušárna, Binder

Horkovzdušná sušárna, Memmert

Biologický termostat, BT 1200 Laboratorní přístroje Praha

pH metr, HI 221 Microprocessor pH Meter

Elektromagnetická míchačka, Hidolph MR 3001

2.3 Použité chemikálie

Polymerní nosiče, FAF UK, Katedra farmaceutické technologie, (charakteristiky jsou uvedené v následující tabulce)

Čištěná voda, FAF UK, připravená reverzní osmózou

Hydrogenfosforečnan sodný, Lachema a.s., Neratovice

Dihydrogenfosforečnan sodný, Lach-Ner s.r.o., Neratovice

Chlorid sodný, Lach-Ner s.r.o., Neratovice

Tab. 1: Parametry použitých polymerních nosičů

označení	složení	M_n	M_w	M_w/ M_w	T_g (°C)	g‘
	GA/LA/M					
PLGA	50/50/0	4600	7100	1,54	38,0	1,56
M3	48,5/48,5/3	2600	3800	1,50	23,7	1,08
M5	47,5/47,5/5	1600	2200	1,40	21,0	1,36

Vysvětlivky:
GA - kyselina glykolová
LA – kyselina DL-mléčná
M – mannitol
M_n, M_w, M_w- střední molární hmotnosti a jejich polydisperzita
T_g (°C) – teplota skelného přechodu
g‘ - stupeň větvení

2.4 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 tělíska (g)

m_s- hmotnost vysušeného tělíska (g)

3. 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.

Tab. 1: Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 1 a 2).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0	13,8410	0,1552	14,0052	0,1642	13,9980	0,1570	4,5859	101,1598
3/A/0	13,8284	0,1516	14,0122	0,1838	13,9817	0,1533	19,8956	101,1214
7/A/0	13,7413	0,1470	13,9704	0,2291	13,8836	0,1423	60,9979	96,8027
14/A/0	14,9247	0,1568	15,0233	0,0986	14,9992	0,0745	32,3489	47,5128
21/A/0	13,7443	0,1525	13,7686	0,0243	13,7640	0,0197	23,3503	12,9180

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0	14,0758	0,1565	14,2402	0,1644	14,2339	0,1581	3,9848	101,0224
3/B/0	15,4467	0,1537	15,6461	0,1994	15,6026	0,1559	27,9025	101,4314
7/B/0	14,6584	0,1521	14,8739	0,2155	14,8060	0,1476	46,0027	97,0414
14/B/0	13,7415	0,1561	13,8270	0,0855	13,8134	0,0719	18,9152	46,0602
21/B/0	13,7890	0,1486	13,8116	0,0226	13,8106	0,0216	4,6296	14,5357

Tab. 2: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 1 a 2).

dny	B-0	E-0
1	4,2854	101,0911
3	23,8991	101,2764
7	53,5003	96,9221
14	25,6321	46,7865
21	13,9899	13,7269

Tab. 3: Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=1 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 3 a 4).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/1	13,9221	0,1541	14,0986	0,1765	14,0774	0,1553	13,6510	100,7787
3/A/1	14,8673	0,1537	15,0680	0,2007	15,0233	0,1560	28,6538	101,4964
7/A/1	13,6972	0,1572	14,0836	0,3864	13,8278	0,1306	195,8652	83,0789
14/A/1	14,8668	0,1534	14,9370	0,0702	14,8999	0,0331	112,0846	21,5776
21/A/1	13,5164	0,1557	13,5463	0,0299	13,5353	0,0189	58,2011	12,1387

Dny/označní vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/1	13,6844	0,1530	13,8567	0,1723	13,8378	0,1534	12,3207	100,2614
3/B/1	13,6732	0,1547	13,8760	0,2028	13,8296	0,1564	29,6675	101,0989
7/B/1	15,4064	0,1570	15,8062	0,3998	15,5360	0,1296	208,4877	82,5477
14/B/1	13,7594	0,1510	13,8273	0,0679	13,7940	0,0346	96,2427	22,9139
21/B/1	13,8473	0,1534	13,8806	0,0333	13,8702	0,0229	45,4148	14,9283

Tab. 4: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=1 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 3 a 4).

dny	B-1	E-1
1	12,9858	100,5201
3	29,1606	101,2977
7	202,1764	82,8133
14	104,1637	22,2457
21	51,8079	13,5335

Tab. 5: Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 5 a 6).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,5	13,7041	0,1542	13,8882	0,1841	13,8585	0,1544	19,2357	100,1297
3/A/0,5	15,5237	0,1553	15,7328	0,2091	15,6791	0,1554	34,5559	100,0644
7/A/0,5	13,7253	0,1554	14,2082	0,4829	13,8593	0,1340	260,3731	86,2290
15/A/0,5	14,3544	0,1572	14,4129	0,0585	14,3835	0,0291	101,0309	18,5114
21/A/0,5	14,1716	0,1547	14,1742	0,0026	14,1729	0,0013	100,0000	0,8403

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,5	13,7171	0,1529	13,8869	0,1698	13,8711	0,154	10,2597	100,7194
3/B/0,5	15,4926	0,1559	15,7444	0,2518	15,6493	0,1567	60,6892	100,5131
7/B/0,5	15,5182	0,1549	15,9828	0,4646	15,6519	0,1337	247,4944	86,3137
15/B/0,5	13,564	0,1555	13,6229	0,0589	13,5888	0,0248	137,5000	15,9485
21/B/0,5	15,6299	0,1556	15,6318	0,0019	15,6308	0,0009	111,1111	0,5784

Tab. 6: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 5 a 6).

dny	B-0,5	E-0,5
1	14,7477	100,4246
3	47,6226	100,2888
7	253,9338	86,2714
15	119,2655	17,2300
21	105,5556	0,7093

Tab. 7: Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,375 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 7 a 8).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,375	13,4848	0,1525	13,6749	0,1901	13,6377	0,1529	24,3296	100,2623
3/A/0,375	14,7364	0,1522	15,0450	0,3086	14,8896	0,1532	101,4360	100,6570
7/A/0,375	14,7271	0,1508	15,1495	0,4224	14,8442	0,1171	260,7173	77,6525
14/A/0,375	13,7595	0,1542	13,8904	0,1309	13,8157	0,0562	132,9181	36,4461
21/A/0,375	15,5775	0,1570	15,6201	0,0426	15,5971	0,0196	117,3469	12,4840

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,375	13,8527	0,1557	14,067	0,2144	14,0092	0,1565	36,9968	100,5138
3/B/0,375	13,3800	0,1549	13,7102	0,3302	13,5353	0,1553	112,6207	100,2582
7/B/0,375	13,7071	0,1427	14,0858	0,3787	13,8084	0,1013	273,8401	70,9880
14/B/0,375	13,7024	0,1554	13,8390	0,1366	13,7562	0,0538	153,9033	34,6203
21/B/0,375	13,7097	0,1548	13,7640	0,0543	13,7324	0,0227	139,2070	14,6640

Tab. 8: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,375 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 7 a 8).

dny	B-0,375	E-0,375
1	30,6632	100,3881
3	107,0284	100,4576
7	267,2787	74,3203
14	143,4107	35,5332
21	128,2770	13,5741

Tab. 9: Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 9 a 10).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,25	13,5797	0,1559	13,7647	0,1850	13,7365	0,1568	17,9846	100,5773
3/A/0,25	13,7554	0,1567	14,1184	0,3630	13,9109	0,1555	133,4405	99,2342
7/A/0,25	13,8663	0,1493	14,4285	0,5622	13,9967	0,1304	331,1350	87,3409
14/A/0,25	14,5739	0,1559	14,6381	0,0642	14,6220	0,0481	33,4719	30,8531
21/A/0,25	14,7504	0,1562	14,7608	0,0104	14,7561	0,0057	82,4561	3,6491

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,25	15,4510	0,1528	15,6350	0,1840	15,6043	0,1533	20,0260	100,3272
3/B/0,25	14,6152	0,1566	14,9645	0,3493	14,7708	0,1556	124,4859	99,3614
7/B/0,25	13,5389	0,1568	14,0404	0,5015	13,6710	0,1321	279,6366	84,2474
14/B/0,25	14,9060	0,1546	14,9892	0,0832	14,9585	0,0525	58,4761	33,9586
21/B/0,25	15,3685	0,1555	15,3866	0,0181	15,3781	0,0096	88,5416	6,1736

Tab. 10: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 9 a 10).

dny	B-0,25	E-0,25
1	19,0053	100,4523
3	128,9632	99,2978
7	305,3858	85,7941
14	45,9740	32,4058
21	85,4989	4,9114

Tab. 11: Stupeň bobtnání a eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 11 a 12).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,125	13,7471	0,1547	13,9990	0,2519	13,9023	0,1552	62,3067	100,3232
3/A/0,125	13,3629	0,1568	13,9051	0,5422	13,5195	0,1566	246,2324	99,8724
7/A/0,125	13,2835	0,1528	13,8905	0,6070	13,4260	0,1425	325,9649	93,2591
14/A/0,125	14,5381	0,1531	14,7400	0,2019	14,6118	0,0737	173,9484	48,1384
21/A/0,125	13,7057	0,1554	13,7623	0,0566	13,7326	0,0269	110,4089	17,3101

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,125	15,3606	0,1529	15,577	0,2164	15,5136	0,1530	41,4379	100,0654
3/ B/0,125	13,4949	0,1504	14,0250	0,5301	13,6447	0,1498	253,8718	99,6010
7/ B/0,125	13,7445	0,1541	14,3386	0,5941	13,8880	0,1435	314,0070	93,1213
14/ B/0,125	14,1884	0,1552	14,3890	0,2006	14,2665	0,0781	156,8502	50,3221
21/ B/0,125	15,0173	0,1572	15,0557	0,0384	15,0382	0,0209	83,7320	13,2951

Tab. 12: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků PLGA o hmotnosti 150 mg vzorků A, B v prostředí fosfátového pufru o koncentraci c=0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 11 a 12).

dny	B-0,125	E-0,125
1	51,8723	100,1943
3	250,0521	99,7367
7	319,9859	93,1902
14	165,3993	49,2303
21	97,0704	15,3026

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

Tab. 13: Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve vodném prostředí při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 15 a 16).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0	13,7051	0,1425	13,8716	0,1665	13,8483	0,1432	16,2709	100,4912
3/A/0	13,3948	0,1565	13,6047	0,2099	13,5459	0,1511	38,9146	96,5495
7/A/0	13,6830	0,1524	13,8189	0,1359	13,7965	0,1135	19,7357	74,4751
14/A/0	14,2968	0,1524	14,3492	0,0524	14,3454	0,0486	7,8189	31,8898
21/A/0	13,4995	0,1560	13,5273	0,0278	13,5260	0,0265	4,9057	16,9872

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0	13,2397	0,1445	13,4056	0,1659	13,3842	0,1445	14,8097	100,0000
3/B/0	13,2165	0,1513	13,4044	0,1879	13,3593	0,1428	31,5826	94,3820
7/B/0	14,0563	0,1452	14,1810	0,1247	14,1635	0,1072	16,3246	73,8292
14/B/0	13,3115	0,1568	13,3768	0,0653	13,3694	0,0579	12,7807	36,9260
21/B/0	13,7868	0,1521	13,8329	0,0461	13,8282	0,0414	11,3527	27,2189

Tab. 14: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve vodném prostředí při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 15 a 16).

dny	B-0	E-0
1	15,5403	100,2456
3	35,2486	95,4658
7	18,0302	74,1521
14	10,2998	34,4079
21	8,1292	22,1031

Tab. 15: Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 17 a 18).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,5	13,7321	0,1558	13,8691	0,1370	13,8370	0,1049	30,6006	67,3299
3/A/0,5	15,4905	0,1442	15,6675	0,1770	15,5851	0,0946	87,1036	65,6033
7/A/0,5	14,8210	0,1512	15,0011	0,1801	14,9030	0,0820	119,6341	54,2328
14/A/0,5	14,2899	0,1490	14,3770	0,0871	14,3624	0,0725	20,1379	48,6577
21/A/0,5	14,7334	0,1559	14,7664	0,0330	14,7610	0,0276	19,5652	17,7037

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,5	14,9791	0,1481	15,1083	0,1292	15,0801	0,1010	27,9208	68,1972
3/B/0,5	14,2379	0,1456	14,4236	0,1857	14,3311	0,0932	99,2489	64,0110
7/B/0,5	14,5307	0,1459	14,7520	0,2213	14,6339	0,1032	114,4380	70,7334
14/B/0,5	13,5196	0,1545	13,6084	0,0888	13,5833	0,0637	39,4035	41,2298
21/B/0,5	13,2740	0,1496	13,3004	0,0264	13,2998	0,0258	2,3256	17,2460

Tab. 16: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 17 a 18).

dny	B-0,5	E-0,5
1	29,2606	67,7635
3	93,1762	64,8071
7	117,0361	62,4830
14	29,7706	44,9437
21	10,9454	17,4748

Tab. 17: Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 19 a 20).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,25	13,5559	0,1536	13,7583	0,2024	13,6905	0,1346	50,3714	87,6302
3/A/0,25	13,3143	0,1453	13,5670	0,2527	13,4341	0,1198	110,9349	82,4501
7/A/0,25	13,3769	0,1566	13,5457	0,1688	13,4903	0,1134	48,8536	72,4137
14/A/0,25	13,6014	0,1505	13,6807	0,0793	13,6614	0,0600	32,1667	39,8671
21/A/0,25	14,8402	0,1543	14,8892	0,0490	14,8753	0,0351	39,6011	22,7478

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,25	15,3522	0,1467	15,5292	0,1770	15,4815	0,1293	36,8910	88,1391
3/B/0,25	15,0413	0,1533	15,3025	0,2612	15,1751	0,1338	95,2167	87,2798
7/B/0,25	13,6041	0,1443	13,7603	0,1562	13,7051	0,1010	54,6535	69,9931
14/B/0,25	13,6897	0,1558	13,7650	0,0753	13,7414	0,0517	45,6480	33,1836
21/B/0,25	13,9409	0,1568	13,9833	0,0424	13,9735	0,0326	30,0613	20,7908

Tab. 18: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 19 a 20).

dny	B-0,25	E-0,25
1	43,6312	87,8846
3	103,0758	84,8650
7	51,7535	71,2034
14	38,9073	36,5253
21	34,8312	21,7694

Tab. 19: Stupeň bobtnání a eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 21 a 22).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,125	14,9938	0,1528	15,2307	0,2369	15,1443	0,1505	57,4086	98,4948
3/A/0,125	13,8519	0,1544	14,1432	0,2913	13,9990	0,1471	98,0286	95,2720
7/A/0,125	15,5833	0,1558	15,7420	0,1587	15,6979	0,1146	38,4817	73,5558
14/A/0,125	15,2698	0,1523	15,3340	0,0642	15,3260	0,0562	14,2349	36,9009
21/A/0,125	15,3007	0,1546	15,3511	0,0504	15,3451	0,0444	13,5135	28,7193

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	B	E
1/B/0,125	13,7870	0,1494	14,0114	0,2244	13,9286	0,1416	58,4746	94,7791
3/B/0,125	14,8237	0,1548	15,1239	0,3002	14,9702	0,1465	104,9147	94,6382
7/B/0,125	13,7593	0,1495	13,9018	0,1425	13,8681	0,1088	30,9743	72,7759
14/B/0,125	13,7623	0,1550	13,8301	0,0678	13,8232	0,0609	11,3300	39,2903
21/B/0,125	13,7220	0,1563	13,7674	0,0454	13,7629	0,0409	11,0024	26,1676

Tab. 20: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 3M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 21 a 22).

dny	B-0,125	E-0,125
1	57,9416	96,6369
3	101,4716	94,9551
7	34,7279	73,1659
14	12,7824	38,0956
21	12,2580	27,4435

3) Chování 5M tělísek o hmotnosti 150 mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. - 21. dne- tabulky.

Tab. 21: Stupeň bobtnání a eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve vodném prostředí při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 25 a 26).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0	13,5640	0,1444	13,7318	0,1678	13,7070	0,1430	14,7795	99,0305
3/A/0	13,2906	0,1512	13,4866	0,1960	13,4270	0,1364	30,4082	90,2116
7/A/0	14,6269	0,1509	14,7647	0,1378	14,7433	0,1164	15,5298	77,1372
14/A/0	15,4197	0,1439	15,5025	0,0828	15,4907	0,0710	14,2512	49,3398
21/A/0	14,2651	0,1571	14,3163	0,0512	14,3059	0,0408	20,3125	25,9707

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0	13,2738	0,1536	13,4453	0,1715	13,4245	0,1507	13,8023	98,1120
3/B/0	13,6898	0,1529	13,8769	0,1871	13,8276	0,1378	35,7765	90,1243
7/B/0	13,8046	0,1549	13,9421	0,1375	13,9254	0,1208	13,8245	77,9858
14/B/0	13,6513	0,1556	13,7302	0,0789	13,7216	0,0703	12,2333	45,1799
21/B/0	15,7655	0,1532	15,8265	0,0610	15,8207	0,0552	10,5072	36,0313

Tab. 22: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 5M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve vodném prostředí při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (25 a 26).

dny	B-0	E-0
1	14,2909	98,5712
3	33,0923	90,1680
7	14,6771	77,5615
14	13,2422	47,2599
21	15,4099	31,0010

Tab. 23: Stupeň bobtnání a eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 27 a 28).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,5	13,7130	0,1492	13,8856	0,1726	13,8535	0,1405	22,8470	94,1689
3/A/0,5	14,8176	0,1499	15,0302	0,2126	14,9504	0,1328	60,0904	88,5924
7/A/0,5	13,7251	0,1546	13,8991	0,1740	13,8360	0,1109	56,8981	71,7335
14/A/0,5	13,7164	0,1438	13,8270	0,1106	13,7974	0,0810	36,5432	56,3282
21/A/0,5	14,9150	0,1569	15,0011	0,0861	14,9895	0,0745	15,5705	47,4825

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,5	13,8410	0,1488	14,0341	0,1931	13,9901	0,1491	29,5104	100,2016
3/B/0,5	13,2311	0,1519	13,4562	0,2251	13,3706	0,1395	61,3620	91,8367
7/B/0,5	13,6362	0,1492	13,8001	0,1639	13,7418	0,1056	55,2083	70,7775
14/B/0,5	13,5692	0,1527	13,6666	0,0974	13,6543	0,0851	14,4536	55,7302
21/B/0,5	13,8940	0,1564	13,9821	0,0881	13,9715	0,0775	13,6774	49,5524

Tab. 24: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 5M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 27 a 28).

dny	B-0,5	E-0,5
1	26,1787	97,1853
3	60,7262	90,2146
7	56,0532	71,2555
14	25,4984	56,0292
21	14,6239	48,5175

Tab. 25: Stupeň bobtnání a eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 29 a 30).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,25	13,6505	0,1452	13,8323	0,1818	13,7909	0,1404	29,4872	96,6942
3/A/0,25	15,4060	0,1453	15,6534	0,2474	15,5332	0,1272	94,4969	87,5430
7/A/0,25	15,7400	0,1541	15,8890	0,1490	15,8531	0,1131	31,7418	73,3939
14/A/0,25	13,9921	0,1516	14,0800	0,0879	14,0704	0,0783	12,2605	51,6491
21/A/0,25	15,8835	0,1508	15,9575	0,0740	15,9410	0,0575	28,6957	38,1300

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,25	15,0477	0,1497	15,2282	0,1805	15,1944	0,1467	23,0402	97,9960
3/B/0,25	13,3037	0,1459	13,5366	0,2329	13,4351	0,1314	77,2451	90,0617
7/B/0,25	13,6835	0,1534	13,8398	0,1563	13,7981	0,1146	36,3874	74,7066
14/B/0,25	14,4766	0,1557	14,5618	0,0852	14,5539	0,0773	10,2199	49,6468
21/B/0,25	15,1290	0,1528	15,1971	0,0681	15,1862	0,0572	19,0559	37,4346

Tab. 26: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 5M o hmotnosti 50 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 29 a 30).

dny	B-0,25	E-0,25
1	26,2637	97,3451
3	85,8710	88,8024
7	34,0646	74,0503
14	11,2402	50,6479
21	23,8758	37,7823

Tab. 27: Stupeň bobtnání a eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 31 a 32).

dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/A/0,125	13,7525	0,1530	13,9259	0,1734	13,8940	0,1415	22,5442	92,4837
3/A/0,125	14,5444	0,1501	14,7437	0,1993	14,6811	0,1367	45,7937	91,0726
7/A/0,125	11,0665	0,1476	11,2032	0,1367	11,1771	0,1106	23,5986	74,9322
14/A/0,125	15,4468	0,1562	15,5327	0,0859	15,5260	0,0792	8,4596	50,7042
21/A/0,125	14,3025	0,1550	14,3658	0,0633	14,3580	0,0555	14,0541	35,8065

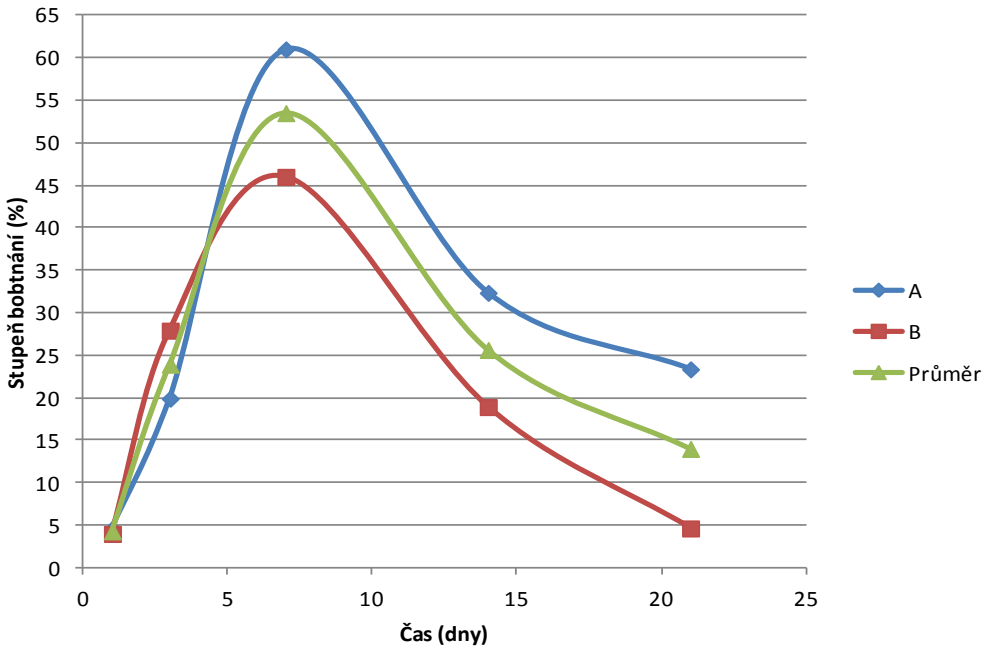
dny/označení vzorků	m_L	m_0	m_{Lb}	m_b	m_{Ls}	m_s	**B**	**E**
1/B/0,125	13,8400	0,1563	14,0245	0,1845	13,9936	0,1536	20,1172	98,2726
3/B/0,125	14,5138	0,1442	14,7112	0,1974	14,6460	0,1322	49,3192	91,6782
7/B/0,125	13,7283	0,1539	13,8638	0,1355	13,8432	0,1149	17,9286	74,6589
14/B/0,125	13,6807	0,1496	13,7628	0,0821	13,7532	0,0725	13,2414	48,4626
21/B/0,125	14,8167	0,1516	14,8730	0,0563	14,8633	0,0466	20,8155	30,7388

Tab. 28: Průměrné hodnoty stupně bobtnání a eroze u vzorků 5M o hmotnosti 150 mg vzorků A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (obr. 31 a 32).

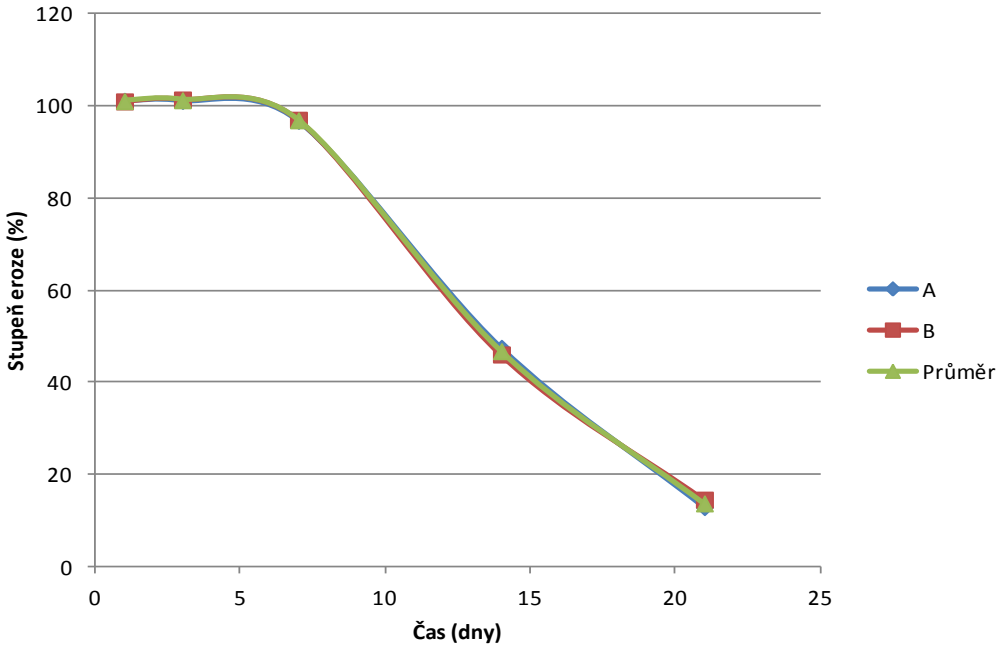
dny	B-0,125	E-0,125
1	21,3307	95,3781
3	47,5565	91,3754
7	20,7636	74,7956
14	10,8505	49,5834
21	17,4348	33,2726

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

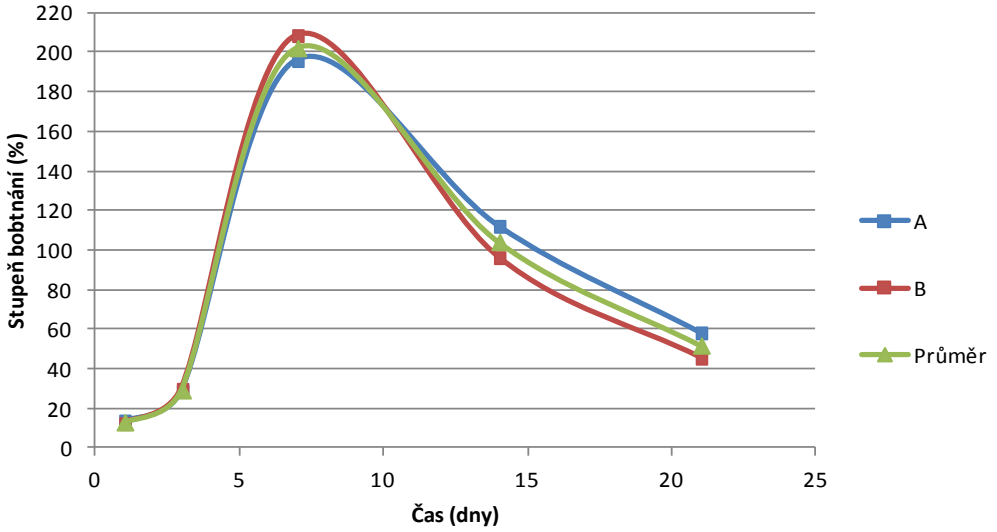
Obr. 1: Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 1 a 2).



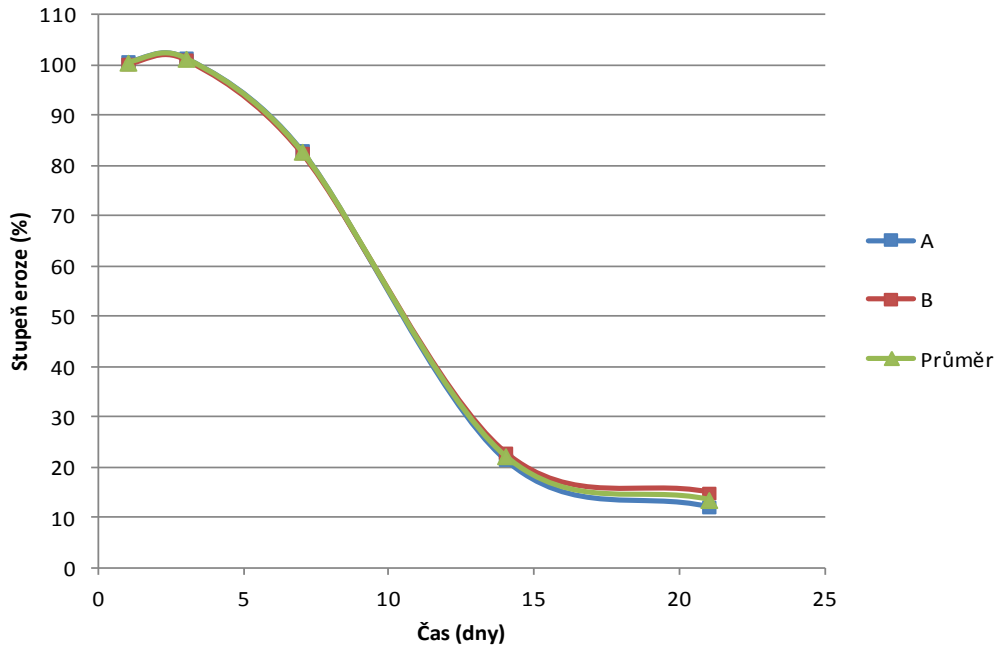
Obr. 2: Stupeň eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 1 a 2).



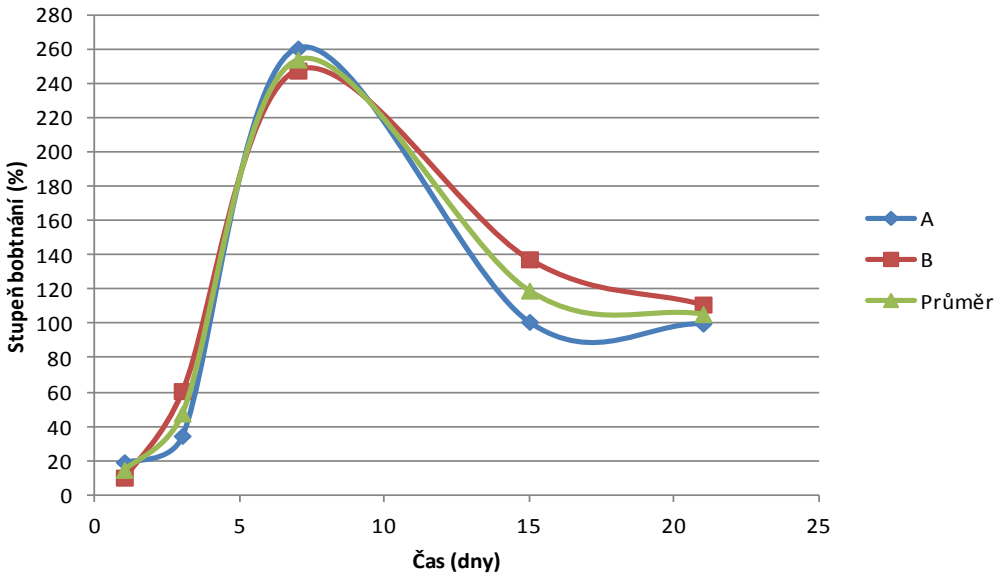
Obr. 3: Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 1 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 3 a 4).



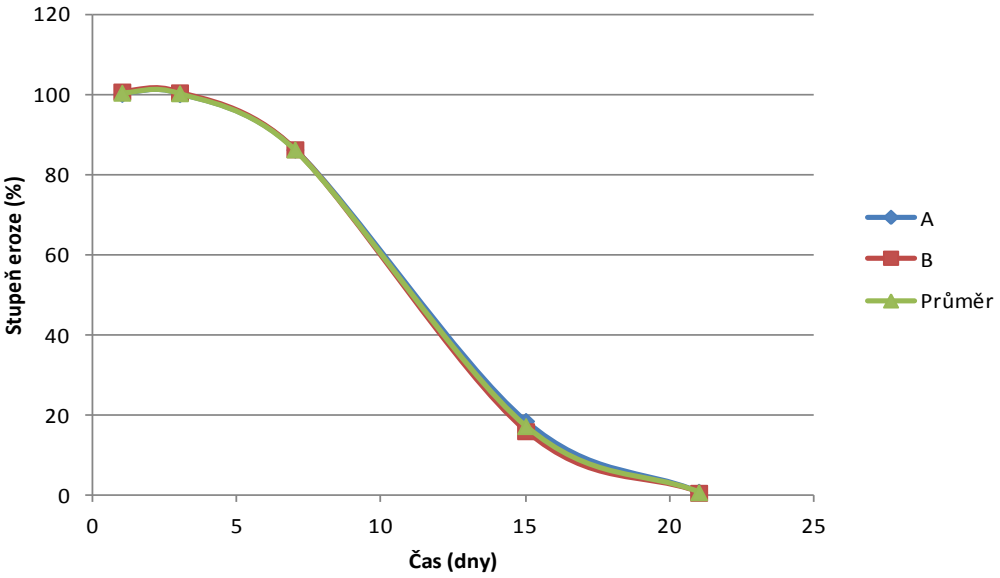
Obr. 4: Stupeň eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 1 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 3 a 4).



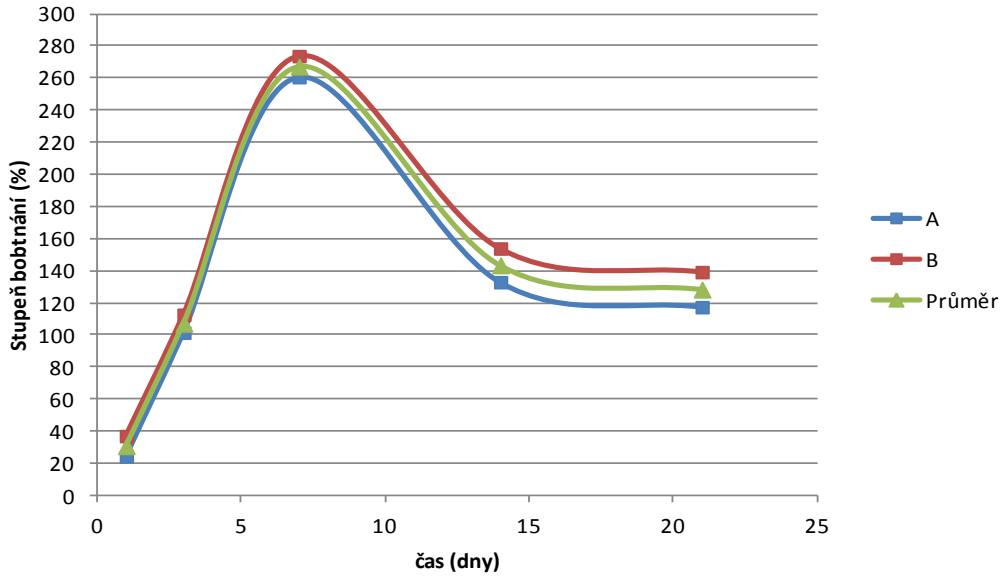
Obr. 5: Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 5 a 6).



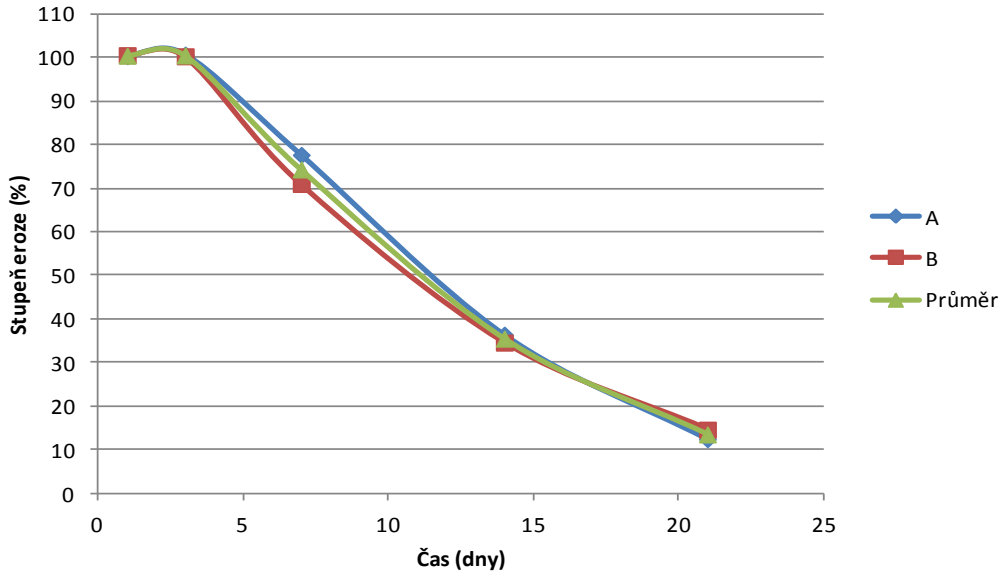
Obr. 6: Stupeň eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 5 a 6).



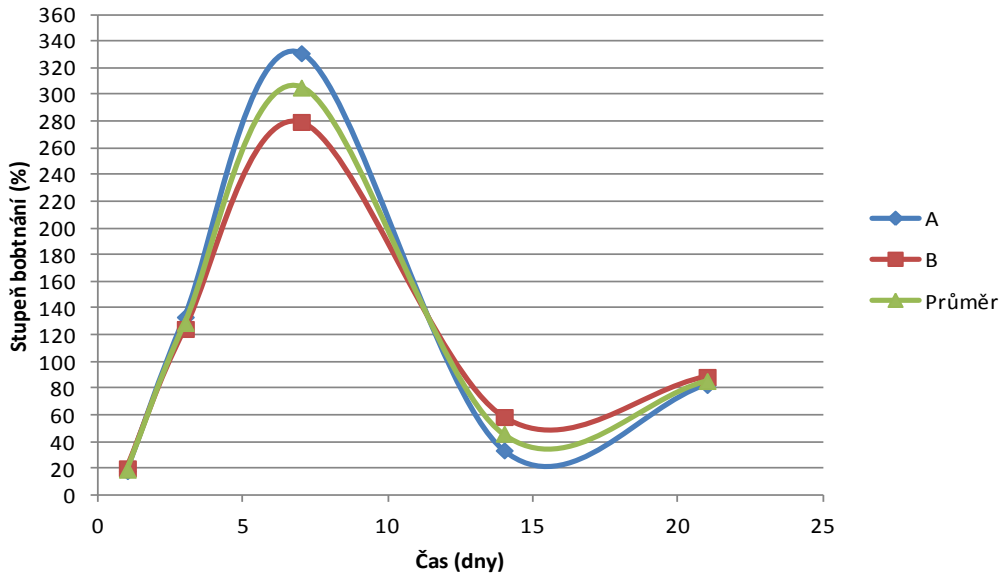
Obr. 7: Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,375 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 7 a 8).



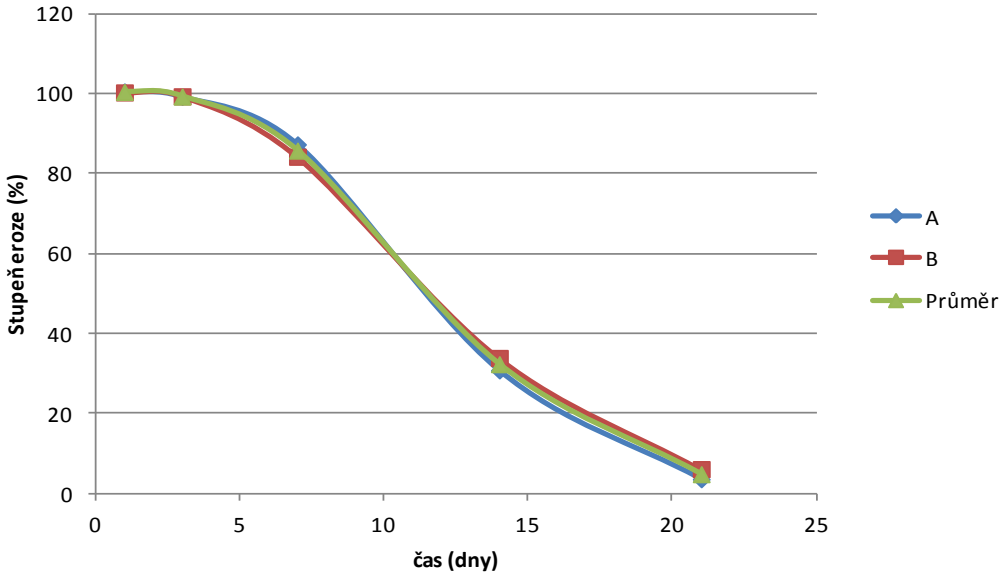
Obr. 8: Stupeň eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,375 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 7 a 8).



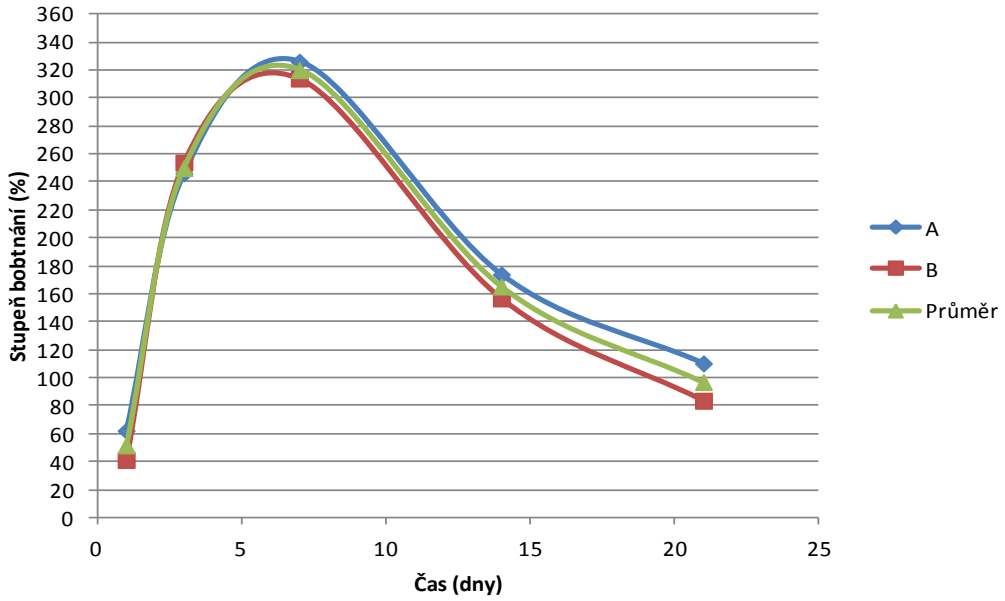
Obr. 9: Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 9 a 10).



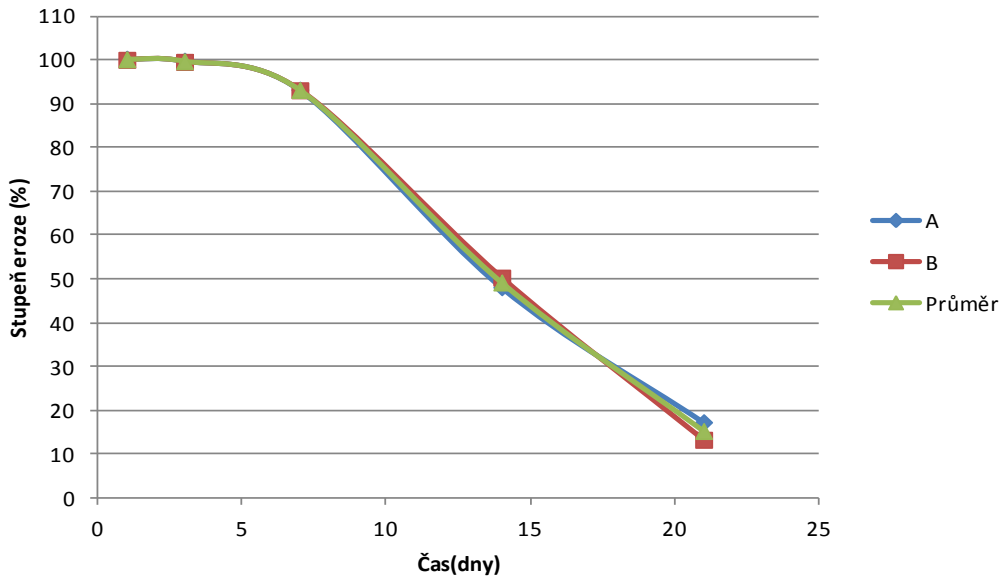
Obr. 10: Stupeň eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 9 a 10).



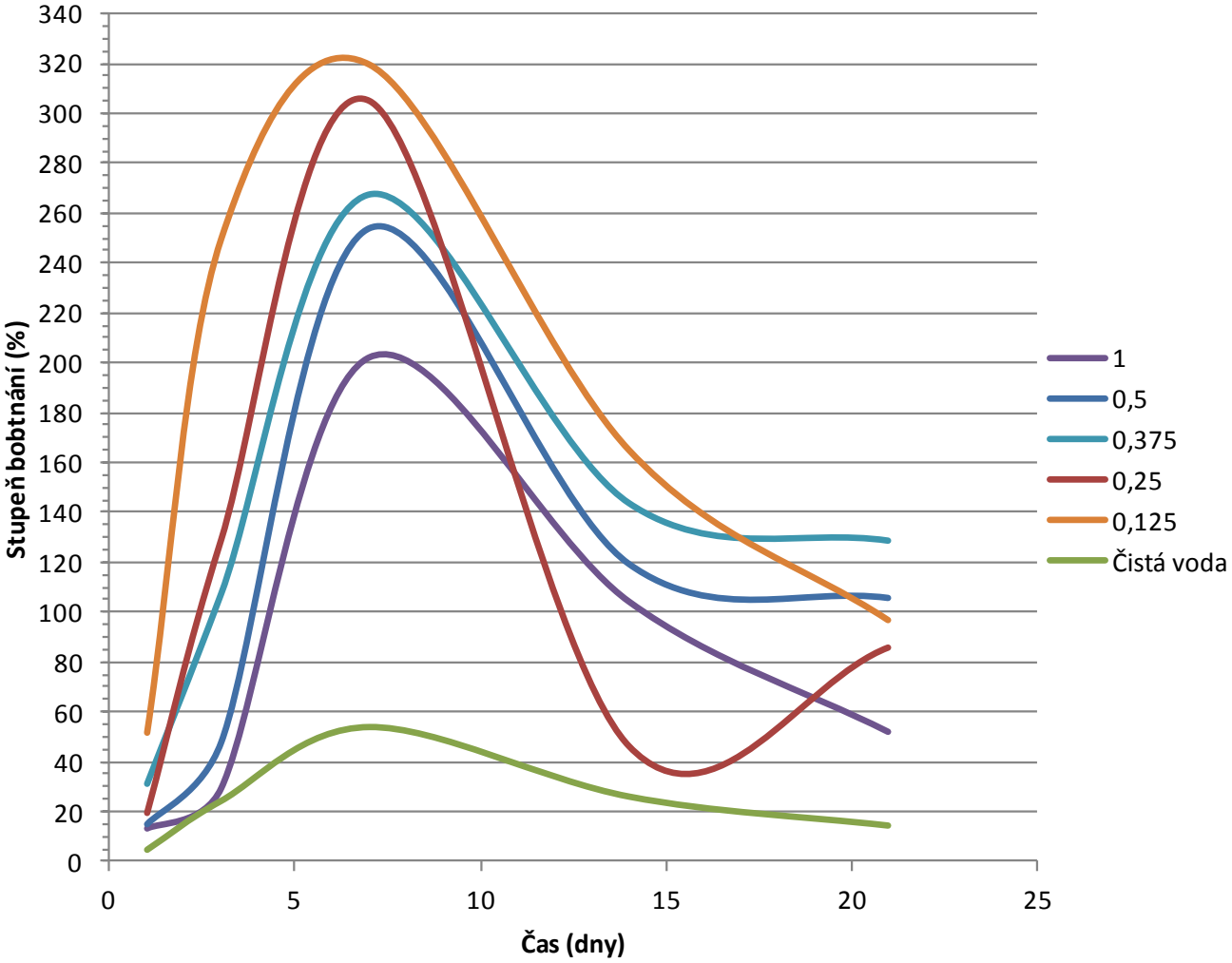
Obr. 11: Stupeň bobtnání PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 11 a 12).



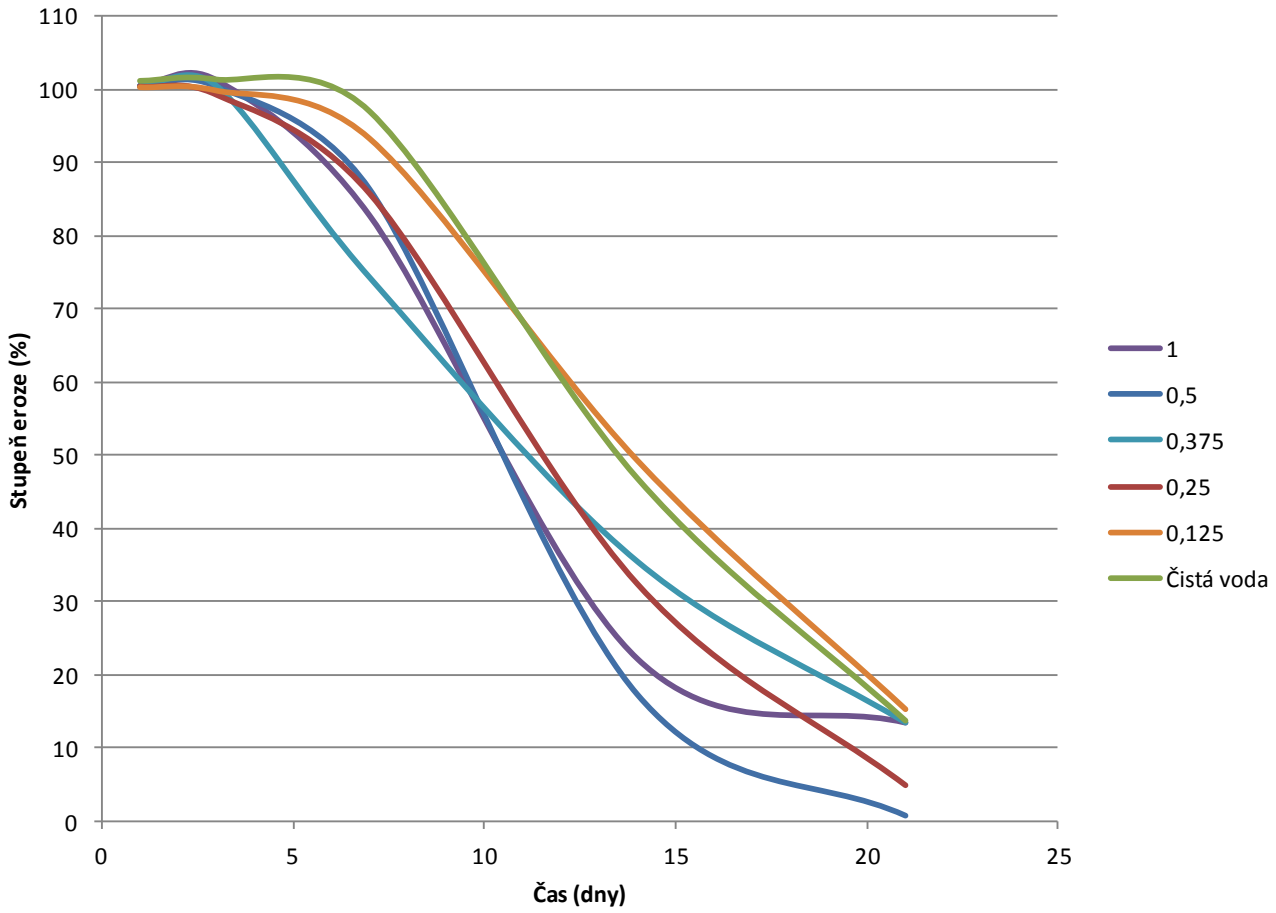
Obr. 12: Stupeň eroze PLGA o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 11 a 12).



Obr. 13: Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání PLGA v různých koncentracích fosfátového pufru a ve vodném prostředí (tab. 2, 4, 6, 8, 10, 12).

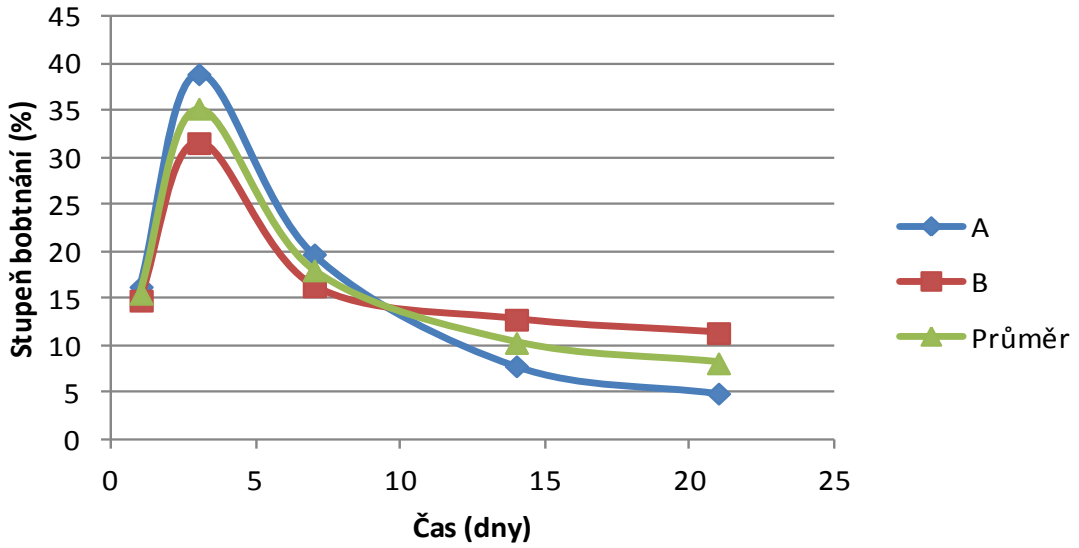


Obr. 14: Porovnání průměrných hodnot stupně eroze PLGA v různých koncentracích fosfátového pufru a ve vodném prostředí (tab. 2, 4, 6, 8, 10, 12).

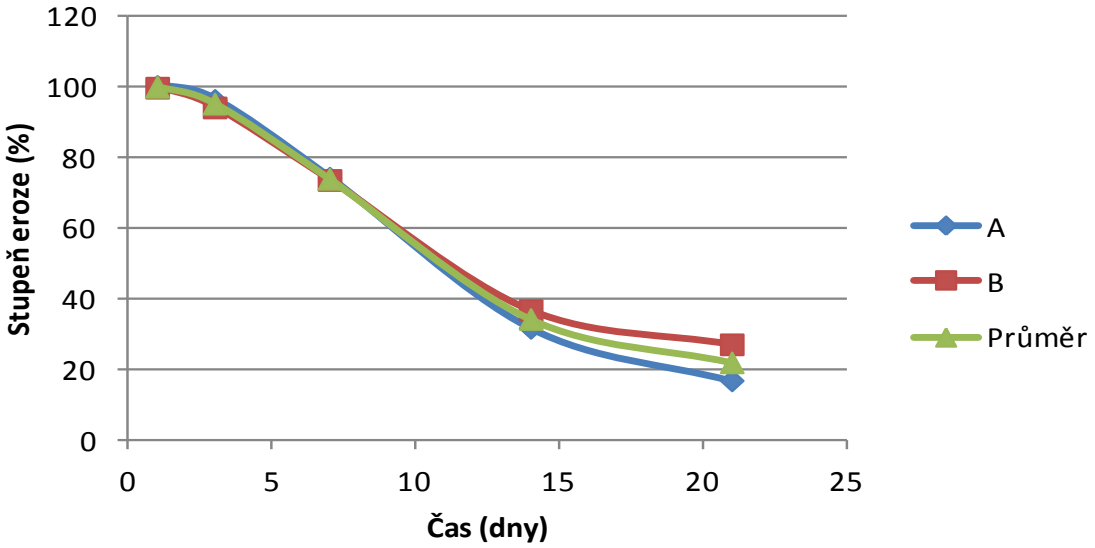


2) **Chování 3M tělísek o hmotnosti 150 mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne – obrázky.**

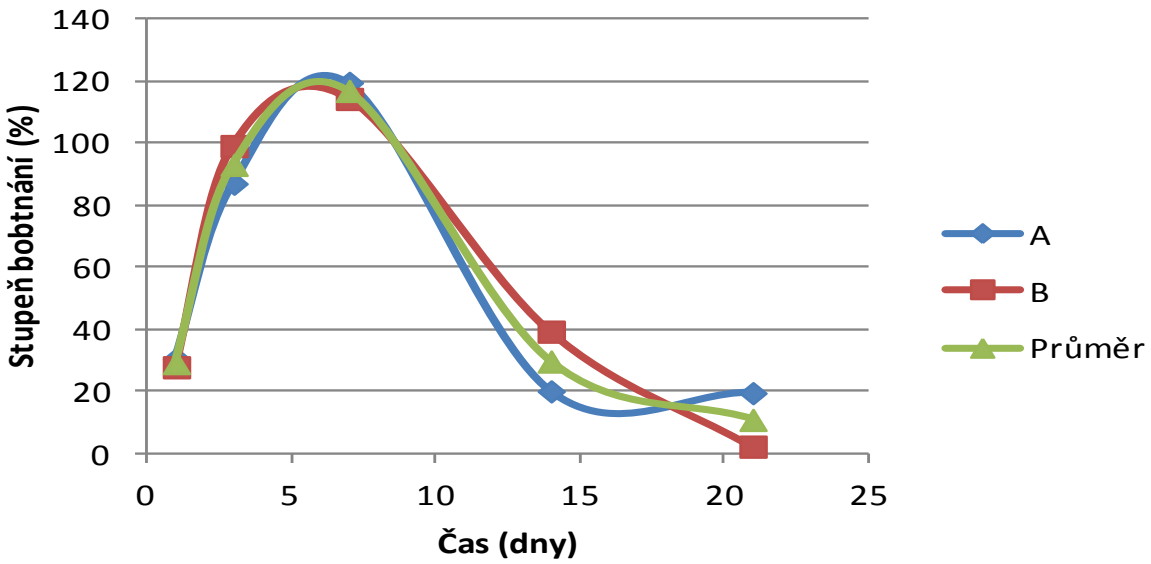
Obr. 15: Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 13 a 14).



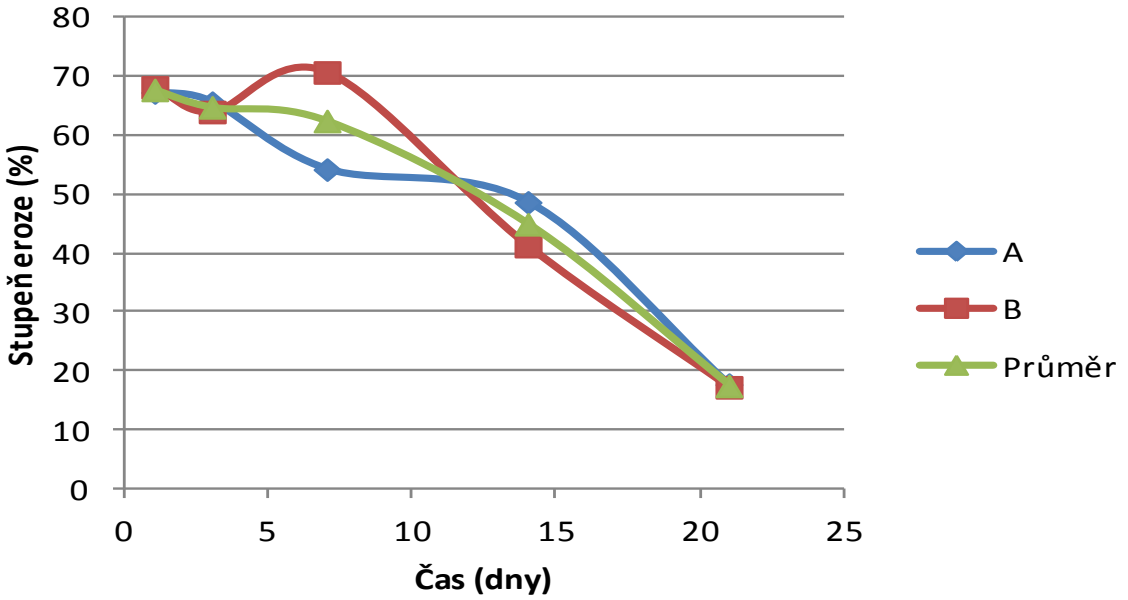
Obr. 16: Stupeň eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 13 a 14).



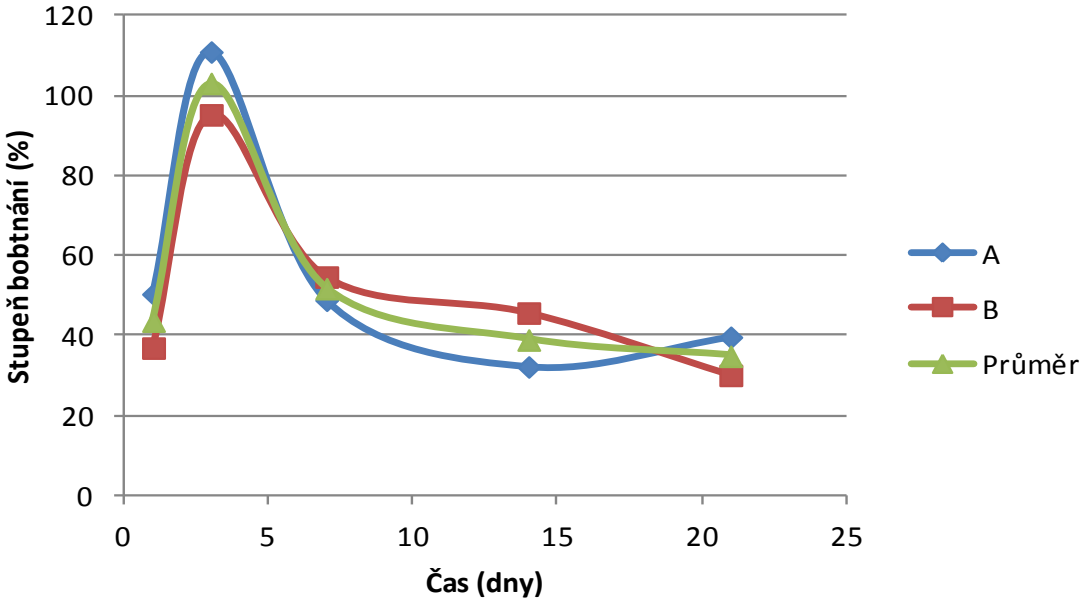
Obr. 17: Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 15 a 16).



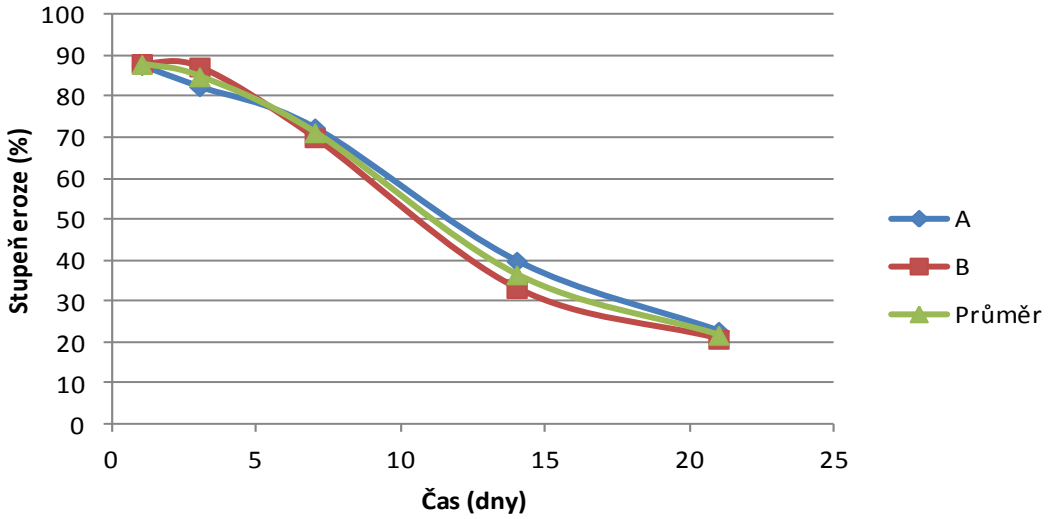
Obr. 18: : Stupeň eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 15 a 16).



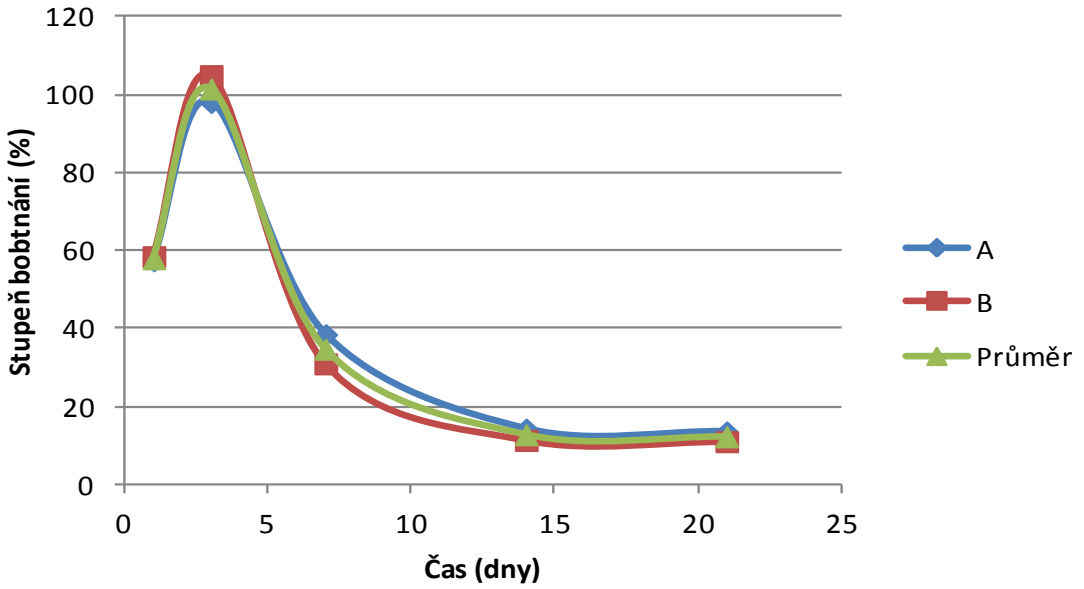
Obr. 19: Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 17 a 18).



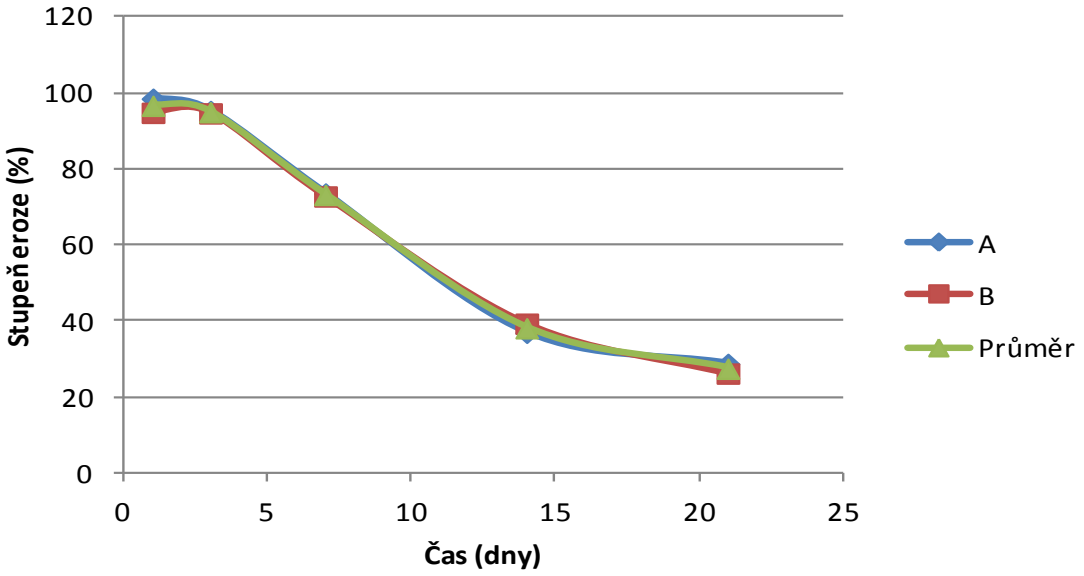
Obr. 20: Stupeň eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 17 a 18).



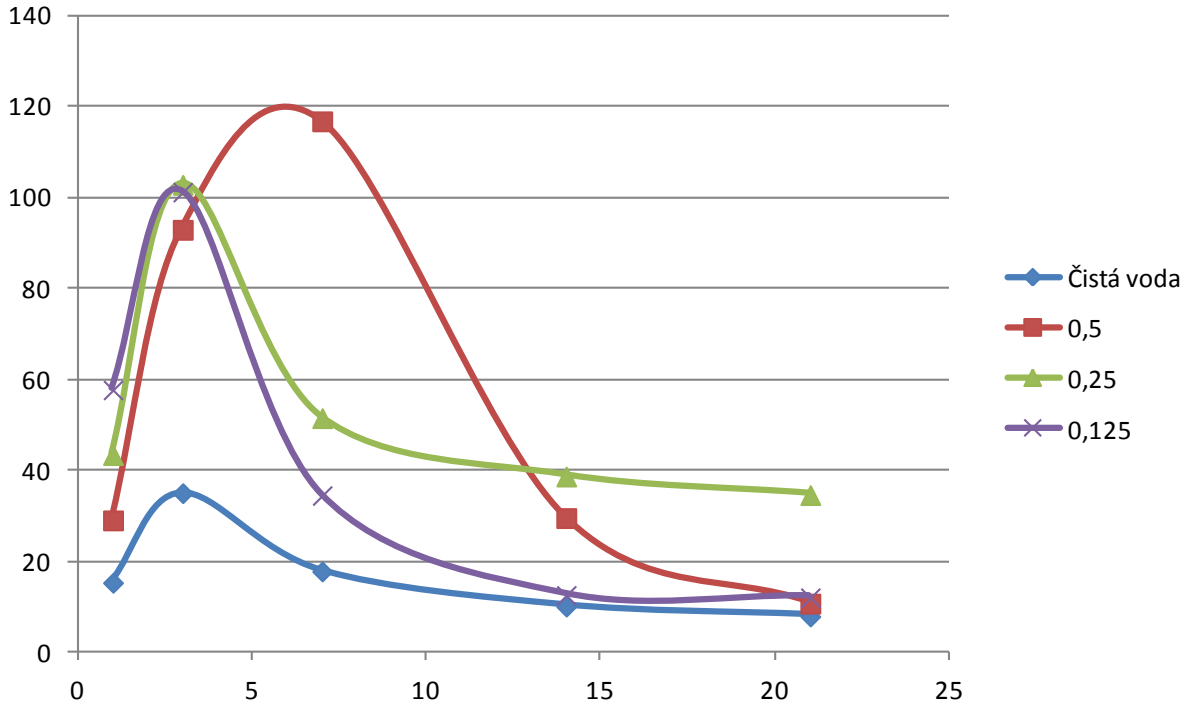
Obr. 21: Stupeň bobtnání 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 19 a 20).



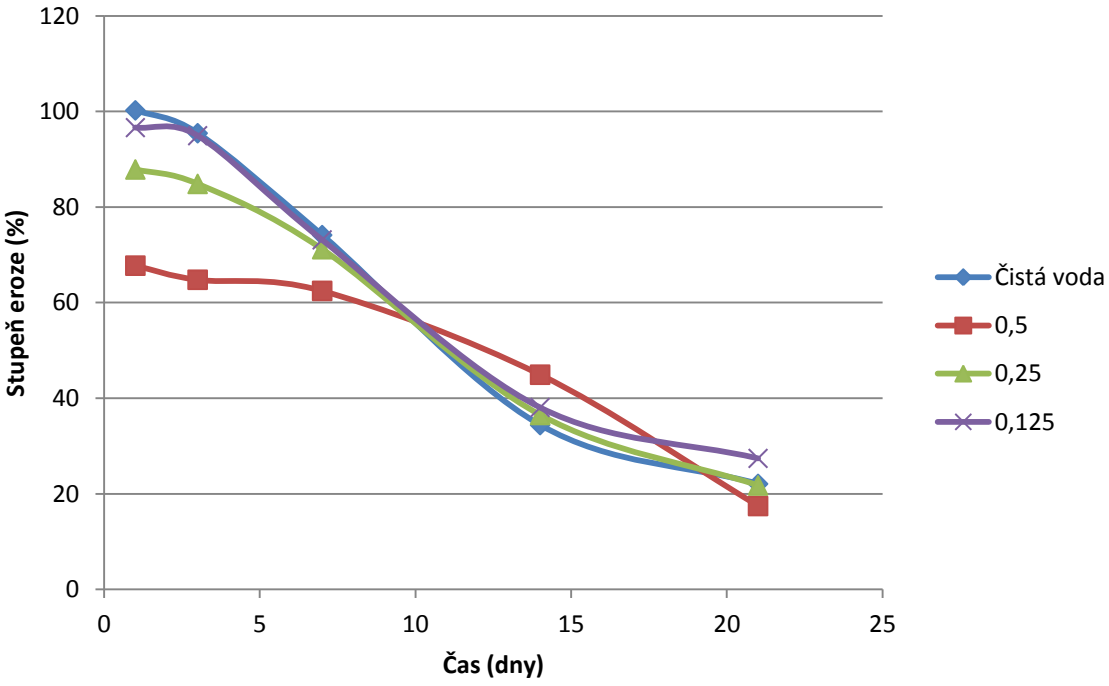
Obr. 22: Stupeň eroze 3M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 19 a 20).



Obr. 23: Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání 3M v různých koncentracích fosfátového pufru a ve vodném prostředí (tab. 14, 16, 18 a 20).

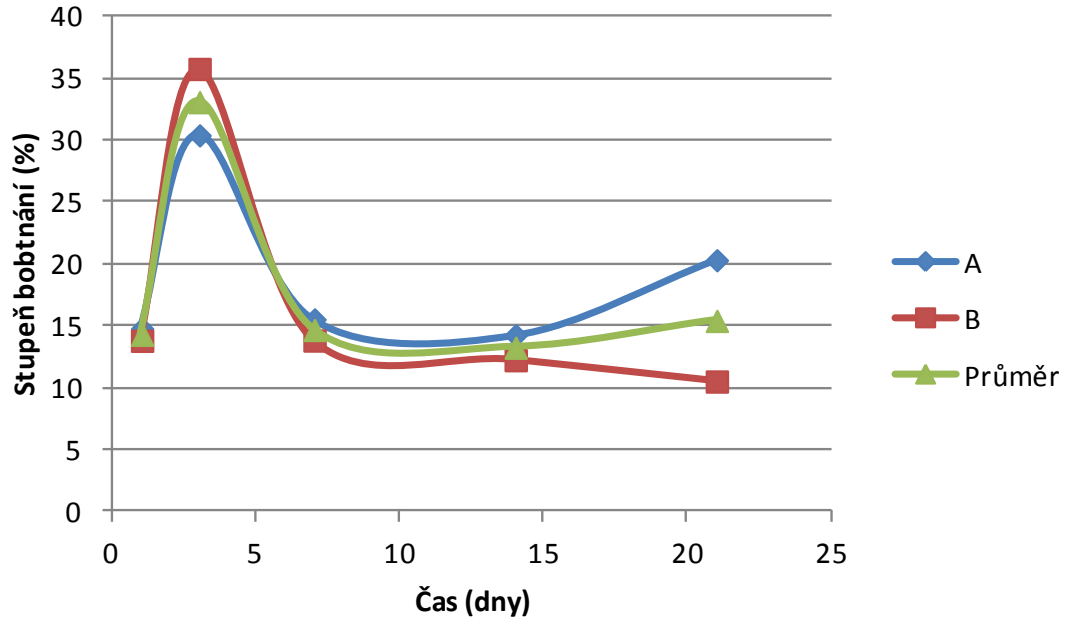


Obr. 24: Porovnání průměrných hodnot stupně eroze 3M v různých koncentracích fosfátového pufru a ve vodném prostředí (tab. 14, 16, 18 a 20).

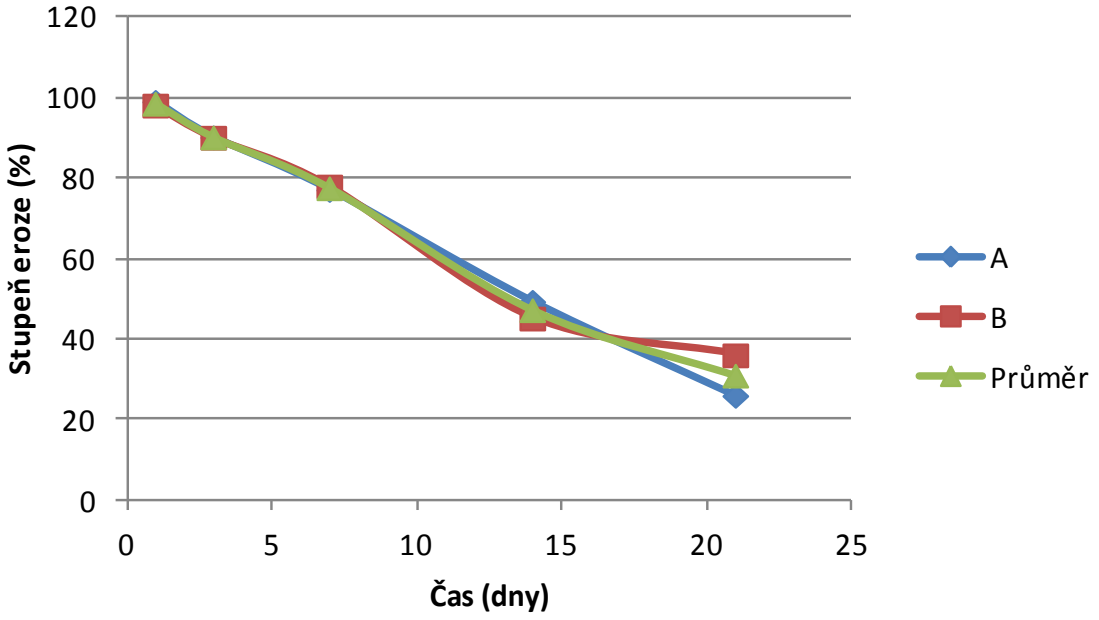


3) Chování 5M tělísek o hmotnosti 150 mg ve vodném prostředí při teplotě 37°C v průběhu 1. – 21. dne – obrázky.

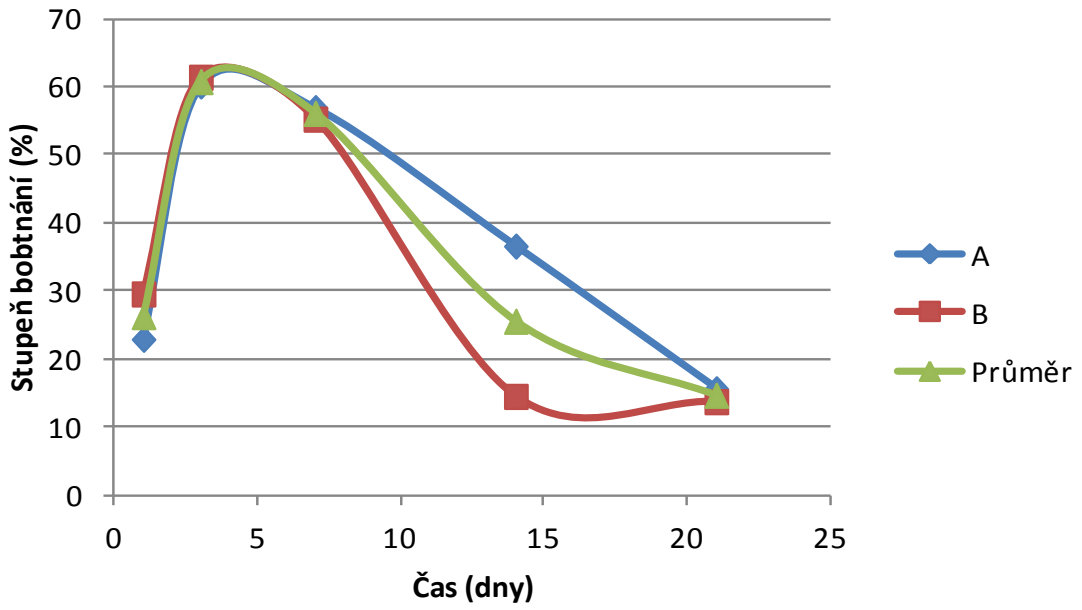
Obr. 25: Stupeň bobtnání 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 21 a 22).



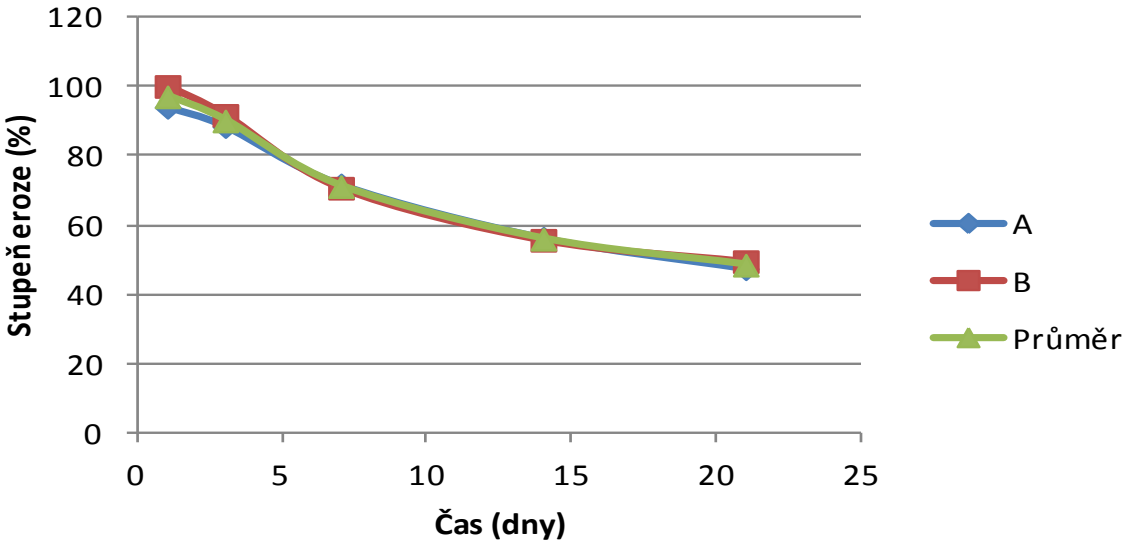
Obr. 26: Stupeň eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B v prostředí vody při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 21 a 22).



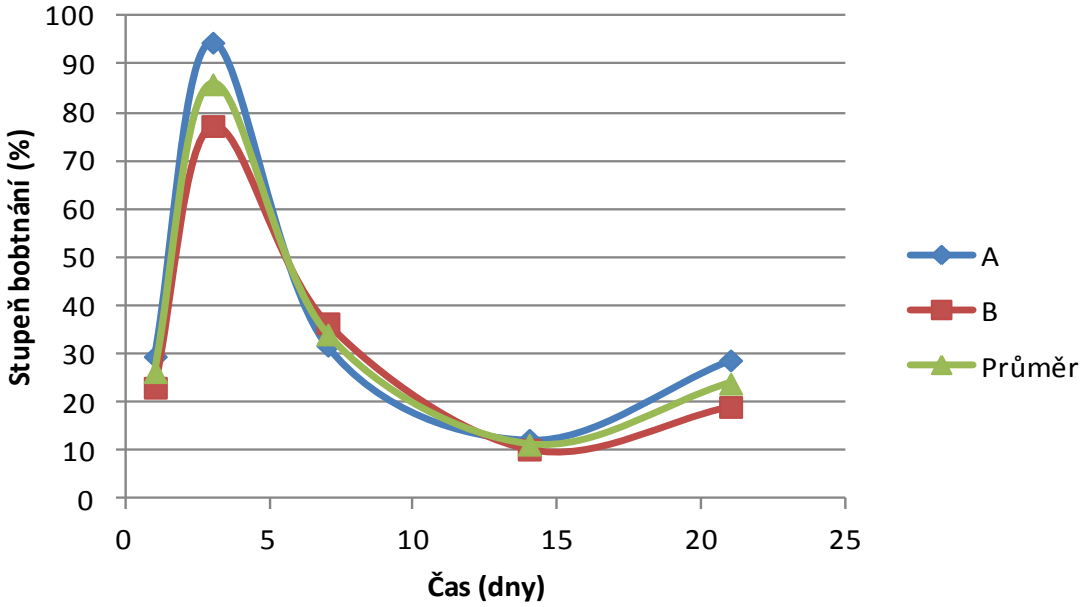
Obr. 27: Stupeň bobtnání 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 23 a 24).



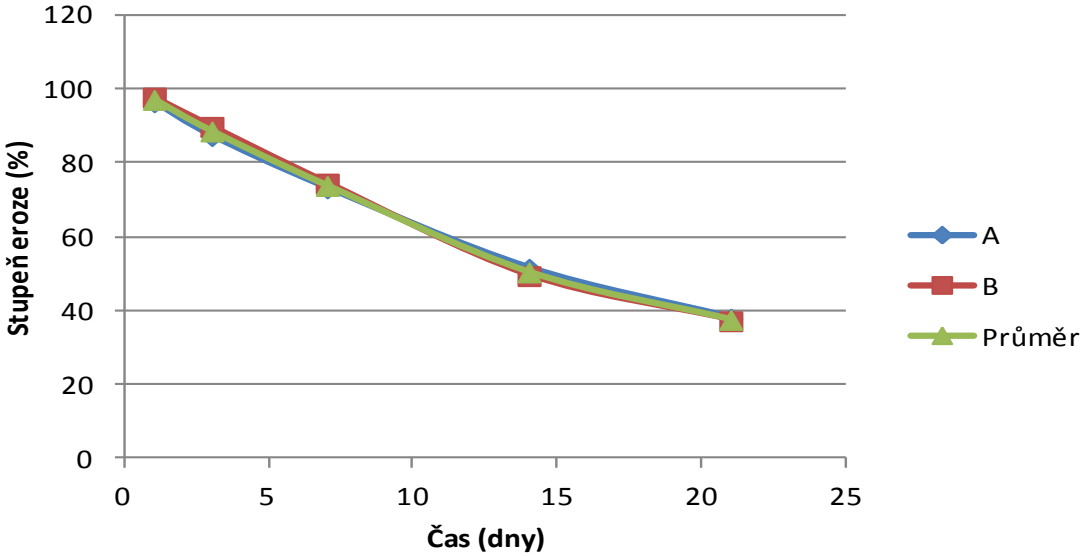
Obr. 28: : Stupeň eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,5 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 23 a 24).



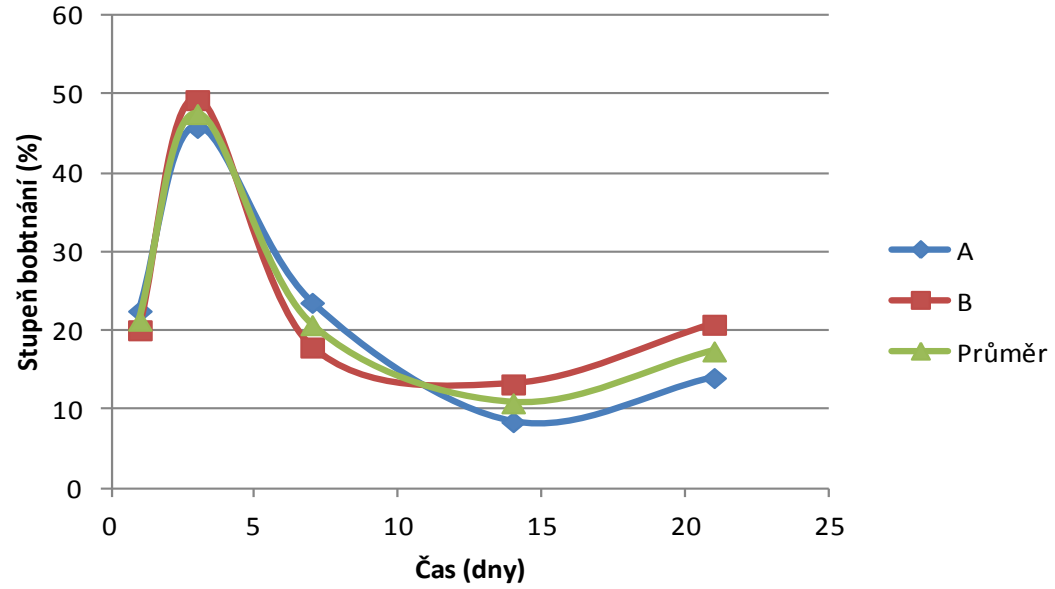
Obr. 29: Stupeň bobtnání 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 25 a 26).



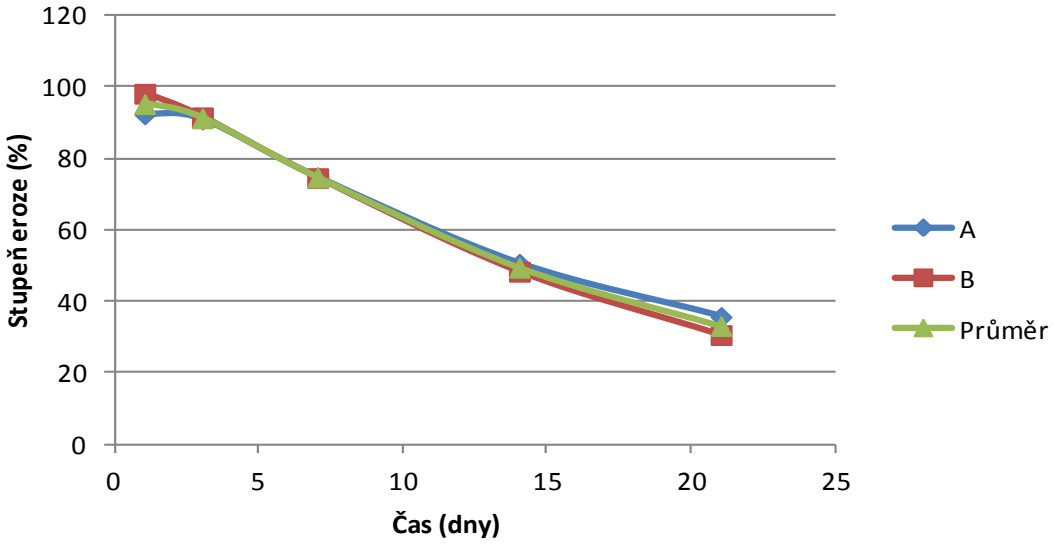
Obr. 30: Stupeň eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,25 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 25 a 26).



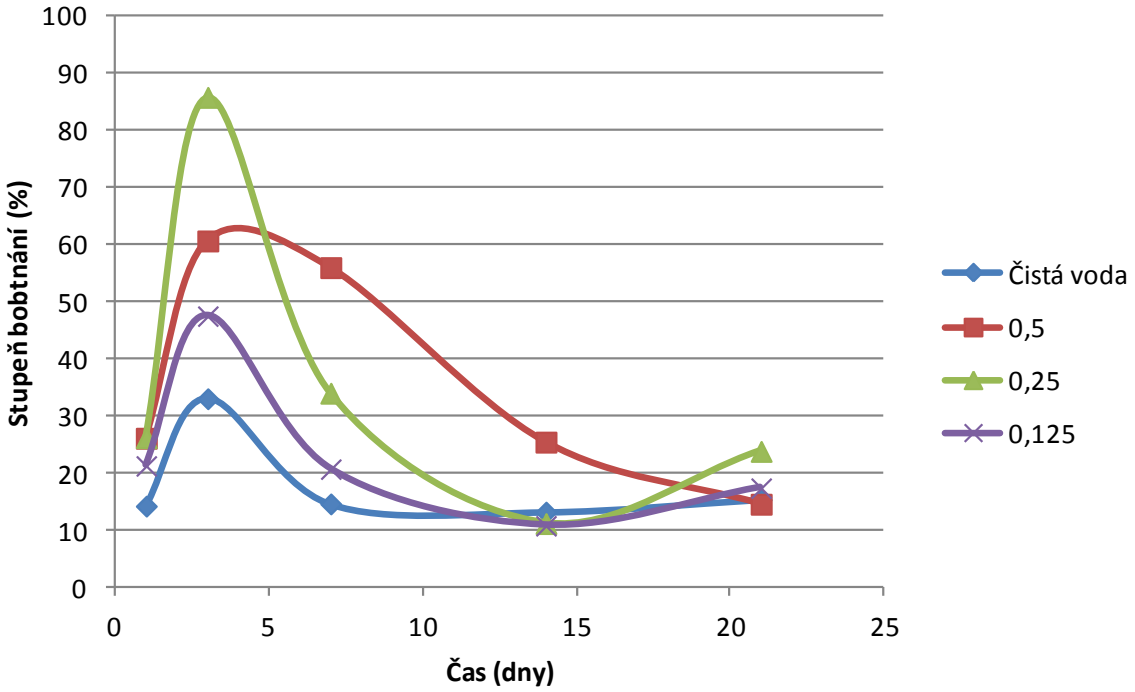
Obr. 31: Stupeň bobtnání 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 27 a 28).



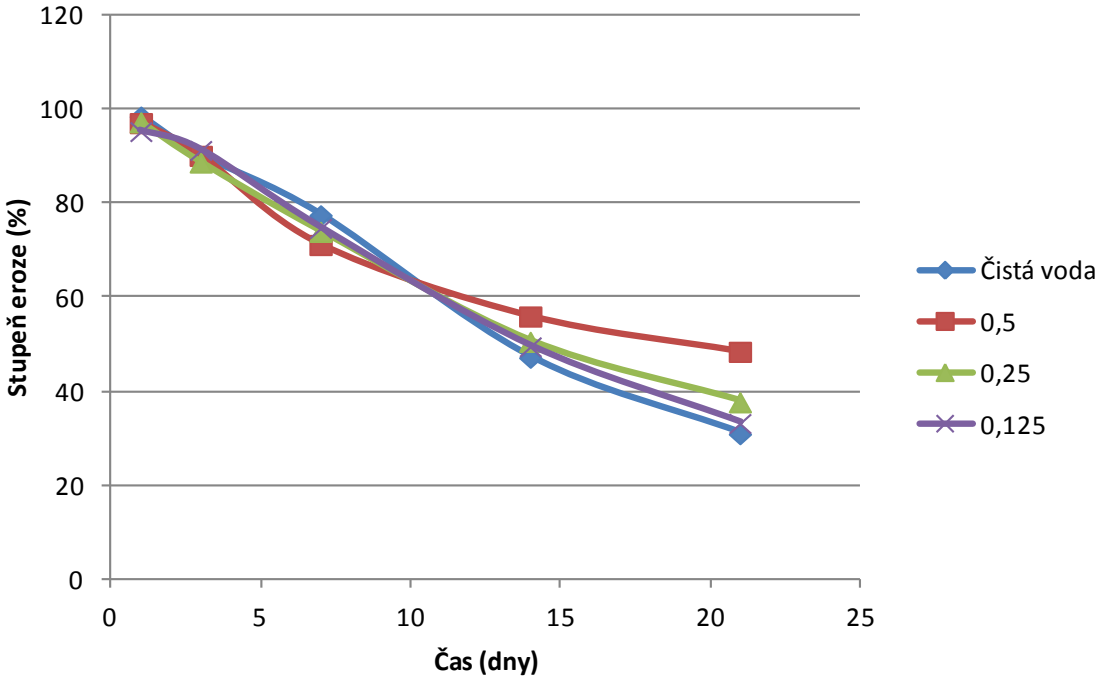
Obr. 32: Stupeň eroze 5M o hmotnosti 150 mg vzorku A, B ve fosfátovém pufru o koncentraci c= 0,125 při 37°C v průběhu 1. – 21. dne (tab. 27 a 28).



Obr. 33: Porovnání průměrných hodnot stupně bobtnání 5M v různých koncentracích fosfátového pufru a ve vodném prostředí (tab. 22, 24, 26 a 28).



Obr. 34: Porovnání průměrných hodnot stupně eroze 5M v různých koncentracích fosfátového pufru a ve vodném prostředí (tab. 22, 24, 26 a 28).



4. Diskuze

4.1 K řešenému tématu

Téma práce bylo formulováno v návaznosti na výsledky studia degradace polyesterů alifatických hydroxykyselin ve vodném prostředí dosažené na pracovišti školitele v dřívějších letech. Jednalo se především o jev pulzního bobtnání, které bylo pozorováno také na jiném pracovišti bez vysvětlení jeho podstaty. Mechanismus spontánního bobtnání a odbobtnání má svoji podstatu ve vzrůstu osmotického tlaku v polyesterových tělískách způsobených vznikem nových molekul při degradačním procesu. Postupným bobtnáním se zvětšuje objem tělísek a zároveň se snižují stérické obstrukční jevy pro difúzi malých molekul vzniklých hydrolýzou. Snížením koncentrace těchto malých ve vodě rozpustných molekul dochází ke kolapsu struktury tělísek, tedy ke smrštění struktury.

Již dříve byl pozorován při různých teplotách vodného média výrazný vliv aktuální acidity vodného média na stupeň bobtnání alifatických polyesterů. Značný vliv iontové síly na proces bobtnání a odbobtnání byl dokumentován pouze v malém počtu vzorků. Proto byl zájem tento vliv potvrdit, upřesnit a sledovat u většího počtu polymerních nosičů daného typu. Jednotlivé polyesterové nosiče se lišily jednak molekulovou hmotností, jednak konstitucí molekuly z hlediska jejího tvaru. Větvené nosiče měly nižší molekulovou hmotnost a také nižší hodnoty teploty skelného přechodu, jak je dokumentováno v tabulce 1 (Experimentální část). Práce byla zaměřena na použití řady fosfátového pufru o hodnotě pH 7,0 při teplotě 37°C. Jako srovnávací médium byla použita čištěná voda s nulovou pufrovací kapacitou.

4.2 Degradační jevy v kopolymeru PLGA

Na obr. 1 je průběh hodnot stupně bobtnání kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové v období tří týdnů. Maximum stupně bobtnání bylo v blízkosti intervalu 7 dní. Děj probíhal v jednotlivých opakovaných vzorcích odlišně, což může mít příčinu v odlišném tvaru tělísek. Průběh eroze je na dalším obrázku. Úbytek suché hmotnosti materiálu začal až za 7 dní působení média. Od tohoto intervalu také začíná odlišný průběh bobtnání.

V prostředí isotonického pufru (obr. 3) se značně liší průběh bobtnání od průběhu ve vodě. Byla docílena značná reprodukovatelnost procesu při několikanásobném maximu charakteristiky, které bylo v přibližně stejném časovém pásmu. Také eroze (obr. 4) byla velice reprodukovatelná.

V roztoku fosfátového pufru s poloviční koncentrací oproti isotonické probíhal děj v první fázi standardně, po 15. dni došlo k výraznému zpomalení poklesu stupně bobtnání (obr. 5). Na časovém průběhu eroze se tato změna neprojevila (obr. 6). Odlišnost byla v úplnosti děje, což vysvětluje nezvyklé chování z hlediska charakteristiky bobtnání nedostatečnou citlivostí měření malých nedegradovaných zbytků nosiče. Obdobné jevy jsou také prezentovány graficky na obr. 7 a 8, které se týkají zředění roztoků pufrů na zhruba třetinovou koncentraci vzhledem k isotonické.

Po dalším zředění na čtvrtinu isotonické koncentrace se projevil nový jev, který je logickým pokračováním předešlé situace. Jedná se o třetí fázi objemových změn tělísek, kterou je opětovné bobtnání (obr. 9). Takto se chovají poslední velmi malé zbytky neerodovaného materiálu (obr. 10). Zajímavé je, že tento jev se při dalším zředění pufru na jeho osminovou koncentraci neprojevil (obr. 11). Také eroze byla pomalejší (obr. 12).

Na obr. 13. jsou uvedeny průměrové křivky stupně bobtnání v médiích s různou iontovou silou. Významná je blízkost maxima bobtnání tělísek v různých prostředích okolní kapaliny. Značně výrazný je rozdíl v hodnotách charakteristiky dosažením v prostředí vody a pufrů. Již dříve popsaná je tendence k růstu stupně bobtnání se zředěním pufrů. Tuto skutečnost pokládáme za důkaz osmotického mechanismu stupně bobtnání. Rozdíl mezi maximem bobtnání ve vodě a v roztoku pufru s největším zředěním je důkazem silného vlivu ionisace karboxylových skupin na jev.

Silný vliv velmi malé koncentrace elektrolytu na bobtnání tělísek má překvapivě prakticky nulovou souvislost s průběhem eroze. Mezi erozí v prostředí vody a nejvíce zředěného pufru byla prokázána překvapivě těsná korelace (obr. 14). Eroze v roztocích nejvyšší koncentrace fosfátového pufru pH 7,0 byla nejrychlejší. Ve finální fázi převládla rychlejší eroze v případě použití roztoku s poloviční koncentraci, oproti isotonické. Je možno to vysvětlit společnými vlivy (interakcí) mezi vlivem nižší iontové síly na větší bobtnání a menšími obstrukčními efekty a větší rozpustností nízkomolekulárních degradačních produktů v matrici v médiu.

4.3 Degradační jevy v terpolymeru 3M

Terpolymer 3M obsahoval 3 % mannitolu jako větvící složky. Od kopolymeru PLGA se lišil větvením a také nižší molekulovou hmotností a značně nižší teplotou skelného přechodu (tab. 1 Experimentální část). Nízká molekulová hmotnost a větvení jsou faktory, které vedou k nízkému stupni bobtnání v prostředí čištěné vody (obr. 15). Zajímavá je krátká, asi týdenní, doba fáze intenzívního bobtnání a odbobtnání. Pomalá eroze (obr. 16) je také ovlivněna větvením a malým bobtnáním.

V prostředí roztoku pufru v koncentraci poloviční oproti isotonické probíhala fáze bobtnání podstatně delší dobu. Maximum stupně bobtnání bylo přibližně trojnásobné (obr. 17). Eroze probíhala nestandardně, v počáteční fázi byla pomalejší než v prostředí vody (obr. 18). V prostředí pufru s větším zředěním byl průběh bobtnání z hlediska polohy a šířky píku podobný jako v prostředí vody. Odlišná byla několikanásobná výška píku (obr. 19). Podobný byl průběh eroze (obr. 20 a obr. 16), totéž platí i pro nejvíce zředěný roztok pufru s osminovou koncentrací oproti isotonické (obr. 21 a 22).

Na obr. 23 jsou porovnány časové profily stupně bobtnání v médiu lišícím se iontovou silou fosfátového pufru. Hlavním rozdílem je ve srovnání s kopolymerem PLGA opačný vliv iontové síly na stupeň bobtnání (obr. 23). Další odlišností je rozšíření píku a posun jeho maxima do delšího intervalu. Příčinu tohoto překvapivého výsledku v této fázi neznáme.

Také z hlediska eroze byl pozorován rozdíl v počáteční fázi. Při vyšších koncentracích pufrů byl zaznamenán rychlejší úbytek polyesteru (obr. 24).

4.4 Degradační jevy v terpolymeru 5M

Terpolymer označený symbolem 5M obsahoval 5% mannitolu, tedy velmi vysokou koncentraci větvící složky. Tato skutečnost se projevila jednak velmi nízkou molekulovou hmotností, jednak nízkou hodnotou teploty skelného přechodu (tab. 1 Experimentální část). Stupeň větvení byl překvapivě nižší než u polyesteru 3M. Bobtnání ve vodném médiu probíhalo velmi podobně jako u analogického polyesteru 3M (obr. 25 a 15). Eroze byla pomalejší a probíhala s vysokou korelací s kinetikou podle nultého řádu (obr. 26).

O průběhu bobtnání v pufru s poloviční koncentrací fosfátů oproti isotonické lze při nedostatečné reprodukovatelnosti obou měření pouze konstatovat širší pík (obr. 27). Jako

zajímavou je možno hodnotit velmi pomalou erozi v tomto pufru (obr. 28). Po zředění pufru na čtvrtinovou koncentraci došlo k zúžení píku a ke zvýšení hodnoty jeho maxima. Také se projevil náběh na opakované bobtnání při pomalé erozi (obr. 29 a 30). Po dalším zředění pufru na osminu isotonické koncentrace došlo ke snížení píku a mírnému zrychlení eroze (obr. 31 a 32). Vliv iontové síly média na bobtnání je na obr. 34. Je zde patrná odlišnost ve srovnání s terpolymerem 3M (obr. 33 a 23). Místo monotónního poklesu stupně bobtnání bylo zaznamenáno maximu v poloze píku u pufru se čtvrtinovým zředěním. Koncentrovanější roztok pufru měl překvapivě nižší pík. Zajímavé je zjištění širšího píku u tohoto nejvíce koncentrovaného roztoku. Není však vyloučen neodhalený pík v intervalu mezi 3. a 7. dnem. Proti tomuto předpokladu může být pomalejší eroze v nejvíce koncentrovaném roztoku pufru ve druhé fázi po 10. dnu působení média (obr. 34).

5. Závěry

V diplomové práci byly získány nové poznatky o hmotnostních a objemových změnách tělísek z polyesterů alifatických hydroxykyselin v průběhu jejich degradace v prostředí pufrů s různou iontovou silou. Bylo prokázáno, změny v iontové síle kapalného okolí degradujících tělísek se projeví v různé míře u polyesterů lišících se konstitucí molekuly a molekulovou hmotností. Velmi malé změny v těchto parametrech mohou vést k velkým rozdílům v degradačních projevech jakými je bobtnání a eroze.

6. Použitá literatura

1. Makadia H. K., Siegel S. J., Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Polymers (2011), 3 (3), s. 1377-1397, převzato z databáze PubMed [cit. 27. 2. 2014].
2. Hines D. J., Kaplan D. L., Poly (lactic-co-glycolic) acid controlled release systems: experimental and modeling insight, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., (2013); 30 (3), s. 257-276, převzato z databáze PubMed [cit. 6. 3. 2014].
3. Sun, L.-G., Xie, Z. -Y., Zhao, Y.-J., Wei H. -M., Gu Z. -Z., Optical monitoring the degradation of PLGA inverse opal film, Chin. Chem. Let. (2013) 24, s. 9-12.
4. Schliecker, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Kissel, T., Characterization of Homologous Series of D, L-lactic Acid Oligomers a Mechanistic Study on the Degradation Kinetics in vitro, Biomaterials (2003), 24 (11), s. 3835-3844.
5. Proikakis, C. S., Mamouzelos, N. J., Tarantili, P. A., Andreopoulos, A. G., Swelling and Hydrolytic Degradation of Poly (D,L-lactic acid) in Aqueous Solutions, Polym. Degrad. Stabil. (2006), 91 (3), s. 614-619.
6. Xu, X. -J., Sy, J. C., Shastri, V.P., Towards Developing Surface Eroding Poly (α-hydroxy acids), Biomaterials (2006), 27 (15), s. 3021-3030.
7. Anderson J. S., Shive M. S., Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, Adv. Drug Deliv. Rev. 64 (2012), s. 72-82.
8. Vert, M., Mauduit, J., Li, S., Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing komplexity, Biomaterials (1994)15, s. 1209-1213.
9. Maulding, H. V., Tice, D. R., Cowsar, J. W., Pearson, J. E., Nazareno, J. P., Biodegradable microcapsules: acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of basic medicament, J. Control. Release (1986) 3, s. 103-117.
10. Pistner, H., Bendix, D. R., Muhling, J., Reuther, J. F., Poly (L-lactide): long-term degradation study in vivo Part III. Analytical characterization, Biomaterials (1993) 14, s. 291-304.
11. Isobe, M., Yamazaki, Y., Oida, S. -I., Ishihara, N., Nakabayashi, N., Amagasa, T., Bone morphogenetic protein encapsulated with a biodegradable and biocompatible polymer, J. Biomed. Mater. Res. (1996) 32, s. 433-438.
12. Visscher, G. E., Robison, R. L., Maulding, H. V., Fong, J. W., Pearson, J. E., Argentieri, G. J., Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules, J. Biomed. Mater. Res. (1985) 19, s. 349-365.

13. Visscher, G. E., Robinson, R. L., Maulding, H. V., Fong, J. W., Pearson, J. E., Argentieri, G. J., Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly (DL-lactide) microcapsules, J. Biomed. Mater. Res. (1986) 20, s. 667-676.
14. Kamei S., Inoue Y., Okada H., Yamada M., Ogawa Y., Toguchi H., New method for analysis of biodegradable polyesters by high-performance liquid chromatography after alkali hydrolysis, Biomaterials 13 (1992), s. 953-958.
15. Tabata Y., Ikada Y., Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers, J. Biomed. Mater. Res. 22 (1988) s. 837-858.
16. Anderson, J. M., In vivo biocompatibility of implanted delivery systems and biomaterials, Eur.J.Pharm.Biopharm. (1994) 40, s.1-8.
17. Anderson, J. M., Mechanism of inflammation and infection with implanted device, Cardiovasc. Pathol. 2 (3, Suppl.) (1993), s. 33-41.
18. Anderson, J. M., Perspectives on the in vivo responses of biodegradable polymers, in: Hollinger, J. O. (Ed.), Biomedical Application of Synhtetic Biodegradable Polymers, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995, s. 223-233.
19. Anderson, J. M., Inflammation and the foreign body response, Probl. Gen. Surg. (1994) 11, s. 147-160.
20. Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J. P., Boddaert, A., In vitro and in vivo degradation of poly (DL-lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method, Biomaterials (1989) 10, s. 557-563.
21. Yamaguchi, K., Anderson, J. M., Biocompatibility studies of naltrexone sustained release formulations, J. Control. Release, (1992) 19, s. 299-314.
22. Kempe S., Mäder K., In situ forming implants - an attractive formulation principle for parenteral depot formulations, J. Control. Release (2012) 161, s. 668-679.
23. Rhee, Y. S., Park, C. M., DeLuca, P. P., Monsour, H. M., Sustained-release injectable drug delivery systems, Pharm. Tech (Nov1 2010), s. 6-13.
24. Hatefi, A., Amsden, B., Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, J. Control. Release (2002) 80, s. 9-28.
25. Gutowska, A., Jeong, B., Jasionowski, M., Injectable gels for tissue engineering, Anat. Rec., (2001) 263, s. 342-349.
26. Joo, M. K., Park, B. G., Choi, B. G., Jeong, B., Reverse thermogelling biodegradable polymer aqueous solutions, J. Mater. Chem., (2009) 19, s. 5891-5905.

27. Packhauser, C. B., Schnieders, J., Oster, C. G., Kissel, T., In situ forming parenteral drug delivery systems, Eur. Pharm. Biopharm. (2004) 58, s. 445-455.
28. Nickerson, M. T., Patel, J., Heyd, D. V., Rousseau, D., Paulson, A. T., Kinetic and mechanatictic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelation, Int. Biol. Macromol. (2006) 39, s. 298-302.
29. Vintiloui, A., Leroux, J. C., Organogels and their use in drug delivery- a review, J. Control. Release (2008) 125, s. 179-192.
30. Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Sashiva, H., Domb,A. J., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, Chem. Rev (2004) 104, s. 6017-6084.
31. Alonso, P. E., Perula, L. A., Rioja, L. F., Pain-temperature relation in the application of local anesthesia, Br. J. Plast. Surg (1993) 46, s. 76-78.
32. Jeong, B., Kim, S. W., Bae, Y. H., Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, Adv. Drug. Deliv. Rev (2002) 54, s. 37-51.
33. Zentner, G. M., Rathi, R., Shih, J. C., McRea, J. C., Seo, M. H., Oh, H., Rhee, J., Mestecky, Z., Moldoveana, M., Weiman, S., Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water insoluble drugs, J. Control. Release (2001) 72, s. 203-215.
34. Chung, Y. M., Simmons, K. L., Gutowska, A., Jeong, B., Sol-gel transition temperature of PLGA-g-PEG aqueous solutions, Biomacromolecules (2002) 3, s. 511-516.
35. Hyun, H., Kim, Y. H., Song, I. B., Lee, J. W., Kim, M. S., Khang, G., Park, K., Lee, H. B., In vitro and in vivo release of albumin using a biodegradable MPEG-PCL diblock copolymer as an in situ gel-forming, Biomacromolecules (2007) 8, s. 1093-1100.
36. Kobayashi, K., Huang, C., Lodge, T. P., Thermoreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions, Macromolecules (1999) 32, s. 7070-7077.
37. Gupta, D., Tator, C. H., Schoichet, M. S., Fast–gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord, Biomaterials (2006) 27, s. 2370-2379.
38. Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., Leroux, J. C., Atkinson, B. L., Binette, F., Selmani, A., Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, Biomaterials (2000) 21, s. 2155-2161.

39. Graham, P. D., Brodbeck, K. J., McHugh, A. J., Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery, J. Control. Release (1999) 58, s. 233-245.
40. Lu,Y.,Yu, Y., Tang, X., Sucrose acetate isobutyrate as an in situ forming system for sustained risperidone release, J. Pharm. Sci. (2007) 96, s. 3252-3262.
41. Royals, M. A., Fujita, S. M., Yewey, G. L., Rodriguez, J., Schultheiss, P. C., Dunn, R. L., Biocompatibility of a biodegradable in situ forming implant systems in rhesus monkeys, J. Biomed. Mater. Res, (1999) 45, s. 231-239.
42. Kranz, H., Bodmeier, R., A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery, Int. J. Pharm, (2007) 332, s. 107-114.
43. Liu, Y., Kemmer, A., Curdy, C., Petersen, H., Kissel, T., Poly (ethylen carbonate) as a surface-eroding biomaterial for in situ forming parenteral drug delivery systems: a feasibility study, Eur. J. Pharm. Biopharm (2010) 76, s. 222-229.
44. Trimaille, T., Gurny, R., Möller, M., Poly (hexylsubstituted lactides): novel injectable hydrophobic drug delivery systems, J. Biomed. Mater. Res. A (2007) 80A, s. 55-65.
45. Seyenejad H., Ghassemi A. H., van Nostrum C. F., Vermonden T., Hennink W. E., Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications, J. Control. Release (2011) 152, s. 168-176.