VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017 Bc. Markéta Pelánová

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE MATERIÁLŮ
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE

TERMOCITLIVÉ POLYMERNÍ GELY
THERMOSENSITIVE POLYMER GELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Markéta Pelánová**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Ivana Chamradová, Ph.D.**
SUPERVISOR

BRNO 2017

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1099/2016
Ústav:	Ústav chemie materiálů
Studentka:	**Bc. Markéta Pelánová**
Studijní program:	Chemie, technologie a vlastnosti materiálů
Studijní obor:	Chemie, technologie a vlastnosti materiálů
Vedoucí práce:	**Ing. Ivana Chamradová, Ph.D.**
Akademický rok:	2016/17

Název diplomové práce:

Termocitlivé polymerní gely

Zadání diplomové práce:

Studium viskoelastických vlastností termocitlivých gelů
literární rešerši na dané téma
příprava a charakterizace vláknitých micel
studovat vliv teploty a koncentrace na reologické chování vláknitých micel

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Markéta Pelánová student(ka)	Ing. Ivana Chamradová, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Josef Jančář, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce na téma termocitlivé polymerní gely je věnována zejména termocitlivému triblokovému kopolymeru, který je složen z hydrofobního polylaktidu, polyglykolidu a hydrofilního polyethylenglykolu (PLGA−PEG−PLGA). Termocitlivé kopolymery jsou velmi atraktivní pro své fázové přechody sol-gel a gel-suspenze. Vodný roztok tohoto kopolymeru je při laboratorní teplotě ve formě solu, při teplotě lidského těla se z něho stává gel. Termocitlivé kopolymery proto nacházejí uplatnění jako injekčně aplikovatelné nosiče pro cílené dodávání léčiv s jejich řízeným uvolňováním. Nicméně ovlivnění nanostruktury termocitlivého hydrogelu výslednou koncentrací polymeru a teplotou není dosud zcela prostudovaným tématem.

V experimentální části bylo pozorováno viskoelastické chování hydrogelů pomocí dynamické reologické analýzy při různých koncentracích a teplotních podmínkách. Také byla stanovena velikost micel ve vodném roztoku kopolymeru a jejich distribuce pomocí techniky dynamického rozptylu světla. Charakterizace vláknitých micel byla doplněna zobrazovací technikou, kryogenní transmisní elektronovou mikroskopií.

ABSTRACT

The presented thesis on thermosensitive polymer gel is focused especially on a thermosensitive triblock copolymer, which is composed of hydrophobic polylactide, polyglycolid and hydrophilic polyethylene glycol (PLGA−PEG−PLGA). Thermosensitive copolymers are very attractive for their phase sol-gel transitions and gel-suspension transitions. The aqueous solution of this copolymer behaves like a sol at laboratory temperature and like a gel at body temperature. These systems are used as injectable carriers for targeted drug delivery with controlled release. However, the influence of the resulting polymer concentration and temperature on the thermosensitive hydrogel nanostructure was not yet fully studied.

In the experimental part, the viscoelastic behavior of hydrogels was observed by dynamic rheological analysis at different polymer concentrations and temperature conditions. The average size and distribution of micelles of triblock copolymer in aqueous solution were measured using dynamic light scattering technique. Characterization of fibrous micelles was complemented by imaging technique, cryogenic transmission electron microscopy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Micelární gely, triblokový kopolymer, reologie, hydrogel

KEYWORDS

Micellar gels, triblock copolymers, rheology, hydrogel

PELÁNOVÁ, M. *Termocitlivé polymerní gely.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 52 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Ivana Chamradová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Mé poděkování patří zejména vedoucí diplomové práce Ing. I. Chamradové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat své rodině za zázemí a podporu během studia.

OBSAH

1 Úvod 6
2 Teoretická část 7
2.1 Syntetické polymery pro medicínské aplikace 7
2.1.1 Polylaktid 8
2.1.2 Polyglykolid 9
2.1.3 Polyethylenglykol 9
2.1.4 Triblokový kopolymer PLGA–PEG–PLGA 10
2.2 Polymerní gely 12
2.2.1 Chemické gely 12
2.2.2 Fyzikální gely 13
2.3 Molekulární gely 16
2.3.1 Vláknité micely 18
2.4 Termocitlivé nosiče léčiv 19
2.4.1 Termosenzitivní micely 20
2.4.2 Termosenzitivní hydrogely 20
2.4.3 Termocitlivé lipozomy 21
2.4.4 Termocitlivé dendrimery 21
2.5 Charakterizace blokových polymerů 21
2.5.1 Kritická micelární koncentrace 22
2.5.2 Reologie 23
2.5.3 Viskoelastické materiály 26
2.5.4 Rotační reometry 28
3 Experimentální část 30
3.1 Použité materiály 30
3.1.1 Syntéza triblokového kopolymeru 30
3.2 Použité zařízení a přístroje 30
4 Symboly a zkratky 31
5 Seznam použitých zdrojů 33

1 ÚVOD

Gely jsou všude kolem nás, najdeme je v potravinách (kečup), spotřebitelských produktech (zubní pasta), průmyslových produktech (lepidla). Ve skutečnosti je gel „podstatou živé hmoty“, protože gel je i cytoplasma v eukaryotických buňkách. Gel podle Floryho je tvořený zesíťovanými molekulárními jednotkami, které jsou více či méně náhodně distribuované v prostoru, tím vzniká trojrozměrná síť. Dnes je pozornost více upřena na molekulární gely, které se skládají z malých organických molekul, povrchově aktivních látek (PAL), peptidů nebo globulárních proteinů, které tvoří dlouhá vlákna [1].

Velký zájem je především o molekulární hydrogely, jinak řečeno trojrozměrné sítě, které jsou rozpuštěny ve vodě nebo její směsi. Hydrogely mohou být vyrobeny prakticky z jakéhokoliv polymeru, který je ve vodě rozpustný, což zahrnuje širokou škálu chemického složení a fyzikálních vlastností. V důsledku toho jsou hydrogely běžně používány v klinické praxi a experimentální medicíně pro širokou škálu aplikací, včetně tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny [2].

Unikátní vlastnosti hydrogelů vzbudily velký zájem o jejich využití v aplikacích pro podávání léčiv. Jejich vysoce porézní struktura je dána hustotou příčných vazeb v gelové matrici, kterou lze kontrolovat. Rychlost uvolňování léčiva je závislá na pórovitosti těchto nosičů, difúzním koeficientu léčiva, koncentraci léčiva, krystalinitě, teplotě skelného přechodu, rozpustnosti a molekulové hmotnosti polymeru. Hydrogely jsou také obecně vysoce biokompatibilní. Biokompatibilita je podporována vysokým obsahem vody. Mají také svá úskalí. Nízká pevnost v tahu omezuje použití hydrogelů v nosných aplikacích, může vést k předčasnému rozpouštění nebo odtékání z cíleného místa. Jedním z důležitých problémů hydrogelů, které jsou určené pro řízené dávkování léčiv, je množství a homogenita obsažené účinné látky. Porozita hydrogelů je dalším úskalím, která často vede k rychlému uvolňování léčiva od několika hodin do několika dnů [2, 3].

Termodynamiku termocitlivých hydrogelů je třeba studovat kvůli správnému dávkování léčiv, např. rozpad celého gelu v jeden moment by způsobil uvolnění velké dávky léčiva. Důležitým parametrem je koncentrace polymeru, při nízkých koncentracích triblokový kopolymer funguje jako micelární nosič léčiv. Při vyšších koncentracích se z něho stává hydrogelový nosič. Pro medicínu jsou použitelné pouze hydrogely, které přechází v gel při teplotě těla. Pokud by docházelo ke gelaci při nižších teplotách, tak by pravděpodobně tyto gely nebylo možné injekčně aplikovat. Naopak pokud by gelace probíhala při vyšších teplotách, tak by nedošlo ke stabilizaci na správném místě. Sol by se v těle volně pohyboval a účinná látka by se neuvolňovala pouze na cíleném místě.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Syntetické polymery pro medicínské aplikace

Pro medicínské aplikace se používají biomateriály. Biomateriál je klasifikován jako „neživý“ materiál používaný ve zdravotnictví, u kterého se předpokládá interakce s biologickým systémem (prof. Williams 1987). Tyto materiály jsou určené k propojení s biologickými systémy, aby léčily, nebo nahradily tkáně, orgány nebo funkce lidského těla. Biomateriály mohou být podle původu rozděleny na **syntetické a přírodní**.

Vlastnosti syntetických biomateriálů mohou být nastaveny přípravou (syntézou). Můžeme je kopolymerovat nebo také modifikovat pomocí funkčních skupin, např. kyselinou itakonovou. Nabízí široké spektrum mechanických vlastností a kontrolu kinetiky degradace. Oproti tradičním materiálům (kovy, keramika) hojně užívaných ve zdravotnictví jako náhrady kostí mají syntetické polymery velkou výhodu díky jejich vlastnostem, mezi které lze zahrnout biokompatibilitu, sterilnost, přiměřené mechanické i fyzikální vlastnosti. Další výhodou je, že nekorodují a nejsou alergenní [4, 5].

V medicíně se syntetické polymery začaly používat v období druhé světové války, kdy došlo k jejich náhodnému objevu leteckým pilotem, který byl zraněn, ale jeho tělo neprojevilo nepříznivou chronickou reakci na přítomnost částeček polymethylmetakrylátu (PMMA). Později se PMMA začal používat jako náhrada rohovky, dále nahrazoval části poškozené lebky. Další pokrok nastal v 50. letech, kdy došlo k významným pokrokům v oblasti vývojů materiálů a chirurgických technik. Syntetické polymery se začaly používat jako náhrada krevních cév, srdeční chlopně, začal se používat také kostní cement. Na konci 20. století už více jak polovina aplikovaných materiálů byla vyrobena z polymerů nebo ho částečně obsahovala [4].

Syntetické polymery mají v medicíně široké uplatnění, jde především o kloubní protézy, dentální implantáty, mimotělní zařízení, švy, krevní cévy, produkty tkáňového inženýrství (TE) a klasické náhrady kovových a keramických prvků. Nejvíce používané syntetické polymery v medicíně jsou polyvinylchlorid (PVC), polystyren (PS), nízkohustotní polyethylen (LDPE), vysokohustotní polyethylen (HDPE), polypropylen (PP), polykarbonát (PC), polyamid (PA), polyuretan (PU), polyethylentereftalát (PET) a silikon. Často se polymery kombinují a vytváří tak kopolymery nebo kompozity. Pokud se v těle nevstřebává ani jedna komponenta řadíme materiál mezi nevstřebatelné (PMMA, PC). Když se časem jedna komponenta vstřebá, mluvíme o částečně vstřebatelných, např. PET/kolagen, karbonová vlákna (CF)/polyglykolid (PGA), CF/polylaktid (PLA). Jako vstřebatelný označujeme materiál, který se zcela rozloží (PLA/polyethylenglykol (PEG), PLA/PGA) [4].

V poslední době dochází k rozvoji rozložitelných biomateriálů a biokompozitů v medicínských aplikacích. Bioresorbovatelné biopolymery se používají jako chirurgické nitě, ortopedické fixační implantáty, nosiče léčiv, podpůrné konstrukce pro TE. Podpůrné konstrukce jsou složeny z materiálu, který je většinou ve formě trojrozměrné matrice (scaffold, lešení) v kombinaci s živými buňkami [4].

Velký rozvoj zaznamenávají scaffoldy na bázi hydrogelů. Tyto polymerní nosiče léčiv mají za úkol transportovat zabudované léčivo k místu působení v organismu. Jako léčiva mohou být použita cytostatika, antibiotika, hormony, růstové faktory a další léčiva. Úkolem těchto systémů je udržovat určitou koncentraci léku během stanovené doby. Hydrogely jsou velmi

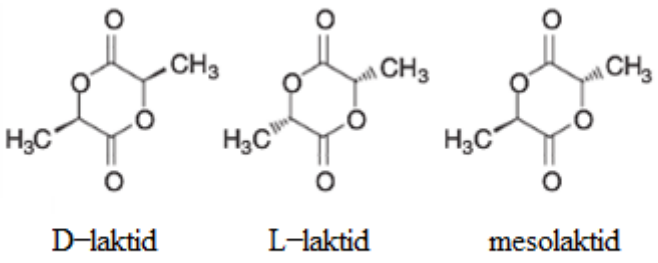
vhodné substráty pro TE, protože se svými fyzikálními vlastnostmi shodují s živými tkáněmi. Mají schopnost absorbovat velké množství vody a biologických tekutin, což se připisuje přítomnosti hydrofilních skupin, jako jsou −OH, −CONH, $-CONH_2$, a $-SO_3H$, které jsou obsaženy v molekulární struktuře polymerů. Jejich nerozpustnost a vlastnosti pevných látek zajišťuje polymerní síť. Mohou být připraveny tak, aby reagovaly na vnější prostředí (teplota, pH, světlo, elektrický signál). V současnosti je nejvíce studována odezva těchto hydrogelů na změny teploty nebo pH s cílem dosáhnutí fyzikálního zesítění za fyziologických podmínek. Tyto hydrogely podstupují vratný objemový fázový přechod nebo sol-gel fázový přechod na základě malé změny stavu okolního prostředí. Díky těmto vlastnostem jsou označovány jako „chytré“ hydrogely. Při změně prostředí mohou podléhat botnání, což způsobuje snadnější difúzi molekul léčiv skrze rozšířené polymerní sítě. Bez ohledu na typ použitého polymeru je mechanismus uvolňování uloženého léčiva z hydrogelové nanočástice komplexní a vyplývá především z difúze léčiva, botnání hydrogelové matrice a chemické reaktivity léčiva/matrice. Pro řízené doručování léčiv se používají především tyto polymery: PLA, PGA, polykaprolakton (PCL), PEG. Syntetické polymery jsou lepší kvůli vyšší nasákavosti, dlouhé životnosti a velkému výběru monomerů. Hydrogely ze syntetických polymerů mají vyšší pevnosti [6, 7, 8]. V následujících kapitolách budou rozepsány pouze polymery, které jsou obsaženy v pozorovaném materiálu v experimentální části.

2.1.1 Polylaktid

I když byl původně objeven v roce 1833, tak aniontovou polymerací z cyklického monomeru laktidu se začal vyrábět až v 60. letech 20. století, kdy získaný PLA dosahoval dobrých mechanických vlastností. První publikace o použití PLA v medicíně pochází z roku 1966. Vědecká skupina použila implantát z PLA u morčat a krys a zjistila, že polymer degraduje pomalu a je dobře tolerován studovanými organismy. V roce 1971 byla PLA použita pro ortopedickou fixaci, následně byly vyvinuty kopolymery PLA a PGA. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z *angl. food and drug administration*, FDA) také schválil injekční formu L−PLA (Sculptra®) [9].

PLA je chirální molekula, která může existovat ve dvou opticky aktivních formách, L-laktid a D−laktid (viz obr. 1). Polymerace těchto monomerů vede ke vzniku semikrystalických D−; L−laktidů. Polymerace racemického D,L−laktidu a mesolaktidu však vede ke vzniku amorfních polymerů. L−laktid je přirozeně se vyskytující isomer [10].

Je dobře známa hydrolytická degradace PLA vedoucí k náhodnému štěpení esterových vazeb v hlavním řetězci. Degraduje na kyselinu mléčnou, která je normální lidský metabolický vedlejší produkt, který degraduje na vodu a oxid uhličitý přes cyklus kyseliny citrónové [10].



Obr. 1: Monomery PLA [11]

2.1.2 Polyglykolid

PGA je vysoce krystalický polymer (~45-55 %), a proto vykazuje vysoký modul pružnosti v tahu a malou rozpustnost v organických rozpouštědlech. Navzdory špatné rozpustnosti byl tento polymer vyroben v různých formách. K vývoji PGA pro medicínské aplikace se používá mnoho technik, např. vytlačování, vstřikování, lisování, ale i loužení částic [10].

Díky vynikající schopnosti tvorby vláken byl PGA použit k výrobě vstřebatelných stehů. První biologicky odbouratelný syntetický šicí materiál s názvem DEXON®, který byl založen právě na PGA, byl v roce 1969 schválen FDA. Netkané textilie z PGA se ve velké míře používají jako scaffoldy pro regeneraci tkáně pro svou vynikající degradabilitu, dobré mechanické vlastnosti (počáteční) a životaschopnosti buněk na těchto matricích [10].

K degradaci polymeru dochází nespecifickým štěpením esterových vazeb. Polymer ztrácí svou pevnost během 1-3 měsíců, kdy hydrolyzuje a hmotnost ztrácí během 6-12 měsíců. V těle se PGA rozkládá na glycin, který může být vylučován močí nebo je glycin přeměněn na oxid uhličitý a vodu prostřednictvím citrátového cyklu. Vysoká rychlost rozkladu PGA, kyselé degradační produkty, rozpustnost limitují biomedicínské aplikace – jsou důležitými faktory, proč tento nadějný polymer začal být používán při kopolymeracích s vybranými polymery. Kopolymery PGA překonávají jeho nevýhody, např. kopolymer PLA−PGA má lepší mechanické vlastnosti [10].

V tab. 1 jsou shrnuty vlastnosti polymerů PLA a PGA a jejich kopolymeru. Uvedená rychlost degradace záleží na molekulové hmotnosti polymerů a jejich krystalinitě. S rostoucí krystalinitou je polymer odolnější vůči degradaci. Dále platí, že se zvyšujícím se obsahem hydrofobních jednotek v kopolymeru, se prodlužuje doba degradace. Přeneseno na kopolymer PLGA, vysoký výchozí poměr LA/GA, více jednotek PLA, značně prodlužuje dobu degradace.

Tab. 1: Vlastnosti polymerů a jejich kopolymeru [3, 10]

Polymer	Krystalinita	Tg [°C]	Rychlost degradace	Typické aplikace
PGA	Semikrystalický	35-40	1-3 měsíce	Stehy, netkané textilie
L−PLA	Semikrystalický	60-65	>2 roky	Fixace zlomenin, náhrada vazů
D,L−PLA	Amorfní	55-60	12-16 měsíců	Řízené dávkování léčiv, nosič pro TE
PLGA	Amorfní	45-55	1-6 měsíců	Stehy, fixace zlomenin, ústní implantáty, doprava léčiv

2.1.3 Polyethylenglykol

PEG je netoxický, ve vodě rozpustný polymer, který odolává rozpoznávání imunitním systémem. Polymerní řetězce s nižší molekulovou hmotností (M_n < 20 000 g/mol) se označují v literatuře jako PEG, označení polyethylenoxid (PEO) se vztahuje na polymery s vyšší molekulovou hmotností (M_n > 20 000 g/mol). PEG je rychle vylučován z těla močí a byl schválen pro široký rozsah biomedicínských aplikací. Kovalentně vázaný PEG na jinou molekulu (částici) může snížit původně „toxické“ vlastnosti molekuly na netoxické, dále způsobuje, že hydrofobní molekuly se stávají rozpustnými, např. PLGA−PEG−PLGA.

Hydrogely na jeho bázi byly použity k podávání léčiv, hojení ran a celé další řadě biomedicínských aplikací a jsou často používány v kombinaci s jinými polymery za vzniku odpovídajícího biomateriálu. PEG vytvořil základ pro některé komerční produkty - Hypol™, který má formu zesíťované pěny PEG s využitím pro hojení ran, nosič léčiv. Hydrogely na bázi PEG jsou zejména používány jako prostředky pro řízené uvolňování léčiv, rychlost uvolňování léčiva závisí na způsobu přípravy PEG, hustotě zesítění a rozpustnosti léčiva [12, 13].

2.1.4 Triblokový kopolymer PLGA−PEG−PLGA

Blokové kopolymery tohoto typu kombinují termogelaci, biodegradabilitu a netoxicitu, jsou určeny pro injekční vstřikování. Konečné kopolymery se řadí mezi „chytré“ hydrogely, které mohou být použity pro různé biomedicínské aplikace, včetně řízeného podávání léčiv. Tento kopolymer je při teplotě místnosti kapalina (sol), kterou lze injekčně vstřikovat, ale při teplotě těla se rychle převede na velmi viskózní gel. Hnací silou tepelné gelace jsou hydrofobní interakce. Přechod sol-gel vodných roztoků triblokového kopolymeru PEG−PLGA−PEG je pravděpodobně způsoben micelární roztažností, která je způsobena hydrofobními silami, které vedou k agregaci. Byly zjištěny dva důležité aspekty. Prvním aspektem je pokles druhého virálního koeficientu značící, že interakce polymer-polymer se zvyšuje vzhledem k interakci polymer-rozpouštědlo. Druhým a neméně významným aspektem je zvýšená micelární agregace, zvětšuje se jejich průměr a délka. Při zvyšování teploty dochází k micelárnímu růstu a zvyšování interakce polymer-polymer, což způsobuje sol-gel přechod [14, 15].

Tyto polymery jsou triblokové kopolymery, které se skládají z A-bloků a B-bloků, které jsou uspořádány jako ABA nebo BAB, kde A je PEG a B je PLA nebo PLGA. PLGA−PEG−PLGA je termocitlivý kopolymer typu BAB složený z poly(D,L−laktidu−*co*−glykolidu) (B−blok) a polyethylenglykolu (A−blok) s termoreverzibilním sol-gel přechodem. PLA a PLGA se vyznačují dobrou rozložitelností, blok je hydrofobní. PEG představuje unikátní fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, včetně biokompatibility, nízké imunogenicity, rozpustnosti ve vodě – hydrofilní blok. V těle je odbouratelný, pokud je jeho molekulová hmotnost nižší než 30 000 g/mol. Nad touto molekulovou hmotností není odbouratelný, ale tak vysoké molekulové hmotnosti se v TE nepoužívají. Složení kopolymeru ovlivňuje jeho morfologii a dobu degradace. Krystalinita silně ovlivňuje mechanické vlastnosti a rychlost biologického rozkladu. Úpravou velikosti segmentů blokového kopolymeru prostřednictvím parametrů polymerace je možné modulovat charakteristiky materiálů tak, aby vyhovovaly konkrétní aplikaci [14].

Výhodou takových hydrogelů je, že se nemusí tvarovat před umístěním do těla, nevyžadují chirurgický zákrok. Zároveň výhodou tohoto kopolymeru je, že nevyžaduje organické rozpouštědlo, protože kopolymer je snadno rozpustný ve vodě. Může distribuovat nejen hydrofobní léčivo, které se uzavře do micely, ale i hydrofilní léky, které jsou navázány přes aktivní vazbu na povrchu micely. Pokud léčivo nereaguje se skupinou na povrchu micely, může být navázáno pomocí linkeru, který má koncové reaktivní skupiny. Linker musí umožnit snadné navázání výchozí látky i snadné odštěpení konečného produktu [14, 16].

Mothe a spol. popsali přípravu a vlastnosti biologicky rozložitelného kopolymeru PLA−PEG−PLA, který byl připravený ze dvou různých prepolymerů PEG (M_n = 4 000 nebo 600 g/mol) a různé velikosti segmentů PLA. Připravené blokové kopolymery měli široký

rozsah molekulových hmotností (800-25 000 g/mol) a různé množství PEG (16-80 hmot. % PEG) [14].

Lee a spolupracovníci použili PEG s nízkou molekulovou hmotností (600 Da), celková hmotnost kopolymeru PEG/PLA byla měněna a studována její závislost na sol-gel přechodu. Studovali efekt změny molekulární hmotnosti L−PLA, tedy efekt hydrofobnosti, na sol-gel přechod. Zvýšený poměr L−PLA se projevil snížením hodnoty sol-gel přechodu [14].

Vztah mezi strukturou a sol-gel přechodem ukazuje, že teplota sol-gel přechodu a kritická koncentrace gelu se snižuje s rostoucí hydrofobicitou triblokových kopolymerů. Zvyšováním molekulové hmotnosti hydrofobního bloku (PLGA) z 2 320 g/mol na 2 840 g/mol, při zachování konstantní molekulové hmotnosti PEG (550 g/mol), se teplota sol-gel přechodu snížila o 10 °C a kritická micelární koncentrace (KMK) se také snižovala. Předešlé zjištění naznačuje, že tento přechod je řízen hydrofobními silami. Naopak pokud budeme zvyšovat molekulovou hmotnost PEG (550−780 g/mol) při PLGA 2300 g/mol, tak se posun projeví jen v určitých oblastech fázového diagramu. Teploty se zvyšují přibližně o 18 °C, oblast gelu však zůstala konstantní. Proto pevnost gelu byla určena hlavně hydrofobním blokem. D,L−PLA je více hydrofobní než PGA v PLGA, proto hydrofobicitu můžeme zvýšit poměrem těchto dvou sloučenin v kopolymeru (78:22 až 72:28). Dále může být teplota gelace ovlivněna přítomností aditiv, např. přídavkem thiokyanatanu sodného (NaSCN) ve formě soli se teplota sol-gel přechodu zvýšila o 5 °C [14].

2.1.4.1 Medicínské aplikace

Jak již bylo zmíněno, biologicky odbouratelné *in situ* tvořící hydrogely představují slibné systémy pro distribuci léčiv. Díky mechanismům micelizace a gelovatění jsou kopolymery PEG−PLGA využívány ke kontrolovanému uvolňování účinné látky. Integrita tohoto gelu byla pozorována u krys a ani po jednom měsíci nebyla pozorovaná povrchová eroze. Jeong a jeho spolupracovníci to vysvětlují tím, že při zvýšené teplotě PEG segmenty interagují s jádrem PLGA, formuje se nová smíšená fáze mezi jádrem a pláštěm, dochází k pevnému balení micel, což brání rozpuštění gelu [14].

Byla studována kinetika hydrogelu s ketoprofenem a spironolaktonem. Profil uvolňování byl silně ovlivněn hydrofobnosti léčiva. Čím víc je léčivo hydrofobní, tím déle se uvolňuje. Ketoprofen byl kontinuálně uvolňován po dobu dvou týdnů a spironolakton více než dva měsíce s profilem uvolňování S-tvaru: počáteční difuze, následovala kombinace degradace a difuze v pozdější fázi [14].

ReGel® je ochranná známka kopolymeru PLGA-PEG-PLGA s hmotnostně střední molekulovou hmotností (M_w) přibližně 4 200 g/mol a poměr M_w/M_n je 1,3. Regel® je ve vodě rozpustný biodegradovatelný polymer při teplotě nižší než je přechodová teplota, po vstříknutí do těla (teplota je vyšší než přechodová teplota) tvoří ve vodě nerozpustný gel s jednorázovým zvýšením viskozity o čtyři řády. Takto vytvořený gel uvolňuje léčivo v rozmezí od jednoho do šesti týdnů. Další důležitou vlastností je, že tento kopolymer je schopný rozpouštět a stabilizovat špatně rozpustné a citlivé léky, včetně proteinů. Například tento gel má vynikající kontrolu při řízeném uvolňování paclitaxelu po dobu přibližně 50 dnů [14].

Ostatní teplotně citlivé kopolymery mají oproti ReGelu odlišný molární poměr LA/GA v rozmezí od 6/1 do 15/1. Tyto kopolymery vykazují vyšší teplotu gelace a delší dobu

uvolňování léčiva. Jiná studie prokázala, že je možné dodávat proteiny (tj. lysozym) v biologicky aktivní formě [14].

Yu a jeho spolupracovníci získali termoreverzibilní fyzikální gel jednoduchým smísením vodného solu z blokového kopolymeru s vysráženým podobným kopolymerem, který má jiný poměr bloků. Takto připravené hydrogely jsou vhodné pro injekční vstřikování, lze dobře nastavit šířku oken. Těmito materiály lze dopravovat i proteiny [14].

Další příklad použití je kopolymer s obsahem kalcitoninu jako modelového peptidu. Byla dosažena kinetika uvolňování nultého řádu. Hlavním mechanismem, který se projevoval při uvolňování, byla difuze, doba želatinace neovlivňuje profil uvolňování léčiva ze systému. Rychlost uvolňování peptidu může být ovlivněna pomocnými látkami, např. laurylsulfátem sodným, který snižuje rychlost uvolňování léku ze systému [14].

V jiné studii byl PEG−PLGA−PEG smíchán s olejovou fází a poskytoval termocitlivou emulzi. Uvolňování paclitaxelu demonstruje možnost používat tyto emulze pro vaskulární embolizace a uvolňování antiangiogenního léčiva [14].

PLGA−PEG−PLGA byl také studován pro dodávání dexametazon acetátu do oka. Zejména se osvědčila koncentrace 20 hmot./obj. % protože má nízkou kritickou teplotu, kolem 32 °C, která je blízká povrchové teplotě oka. Dále byly také do kopolymeru vkládány ve vodě rozpustná léčiva. Jako modelový příklad byl zkoumán ve vodě rozpustný pentapeptid (TP5). Čím větší byla koncentrace polymeru, tím docházelo ke zpomalení rychlosti uvolňování léčiva, v důsledku více kompaktní konstrukce [14, 15].

2.2 Polymerní gely

Polymerní gely jsou systémy třídimensionální nekonečné sítě tvořené řetězci makromolekul, které prostupují celým disperzním prostředím. Řetězce makromolekul jsou k sobě na vybraných místech vázány. Podle povahy sil, které způsobují soudržnost síťové struktury, můžeme gely rozdělit na fyzikální a chemické. Podle charakteru disperzního prostředí můžeme gely rozdělit na **hydrogely**, s vodným disperzním prostředím, a **organogely**, jejichž disperzním prostředím je organická kapalina (např. alkany). Zvláštním typem makromolekulárních gelů jsou tzv. izogely, kde je disperzním prostředím monomer disperzního podílu (polystyren ve styrenu). Pod pojmem gel se většinou rozumí rosolovitý systém, který obsahuje kapalné disperzní prostředí (lyogel), v širším slova smyslu jsou do gelů také zahrnovány xerogely, které vznikají vysušením lyogelů, tj. odstraněním disperzního prostředí [17, 18, 19].

Gely se při menších napětích chovají elasticky, nedeformují se tedy trvale. Elasticita gelů je zajištěná díky trojrozměrné makromolekulární síti, která prostupuje celým lyogelem. V submikronovém měřítku se ale gel chová jako kapalné prostředí, což lze pozorovat na difuzivitě nízkomolekulárních látek, která je téměř stejná jako v roztoku, z kterého gel vznikl [20].

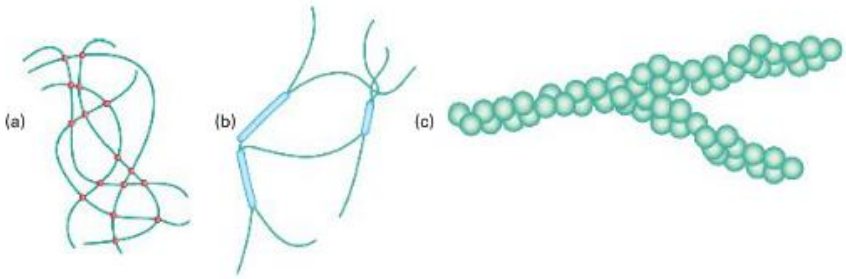
2.2.1 Chemické gely

Chemické gely tvoří sítě, které jsou spojeny kovalentní vazbou. Obecně lze chemické gely považovat za tepelně ireverzibilní. Kovalentní sítě mohou vznikat různými způsoby, zde jsou uvedeny dva: **síťování lineárního polymeru** a **síťovací polymerace**. Nejznámějším příkladem síťování lineárního polymeru je vulkanizace kaučuků. Síťovací polymerace je kopolymerace dvojfunkčního monomeru s vícefunkčním, př. síťování styrenu

divinylbenzenem. V průběhu obou procesů narůstá polymerační stupeň vznikajících makromolekul. Nakonec se vytvoří jedna velká makromolekula, která prostoupí celým systémem, právě takový stav nazýváme bod gelace. Chemické sítě mají charakteristické vlastnosti jako je pružnost (za předpokladu, že se nacházíme nad teplotou skelného přechodu), botnání v rozpouštědle, jsou permanentní. Vlastnosti výsledné sítě jsou ovlivněny množstvím kovalentních vazeb – uzlů. Ovlivnění vlastností křížovými vazbami je těžké určit, protože není jednoduché řídit chemické reakce, ale také dochází k přirozenému zapletení řetězců v roztoku. Kromě toho přispívají ještě další efekty, jako jsou defekty sítě – konce řetězců, uzavřené smyčky. Topologie sítě je považována za hlavní faktor ovlivňující elasticitu [19, 21].

2.2.2 Fyzikální gely

Fyzikální gely jsou tepelně reverzibilní a jsou výsledkem intermolekulárních asociací tvořených především van der Waalsovými silami, elektrostatickými nebo vodíkovými interakcemi. V roztoku polymeru, schopného tvořit fyzikálně zesítěný gel, dochází ke sdružování úseků řetězců, které plní funkci uzlů. Vzniklé spoje jsou obvykle podstatně větší než kovalentní uzly, proto se často nazývají uzlové nebo spojné oblasti. Na obr. 2 jsou uvedeny struktury v různých měřítcích, jsou zde ukázány rozdíly mezi chemickou, fyzikální a koloidní sítí. Obecnou podmínkou pro tvorbu gelu je omezená rozpustnost polymeru v daném rozpouštědle. Voda a roztoky elektrolytů jsou často dobrými rozpouštědly biopolymerů. Nicméně rozpustnost můžeme ovlivnit chemickou modifikací, např. roubováním nebo substitucí nepolárních (hydrofobních) skupin [21].



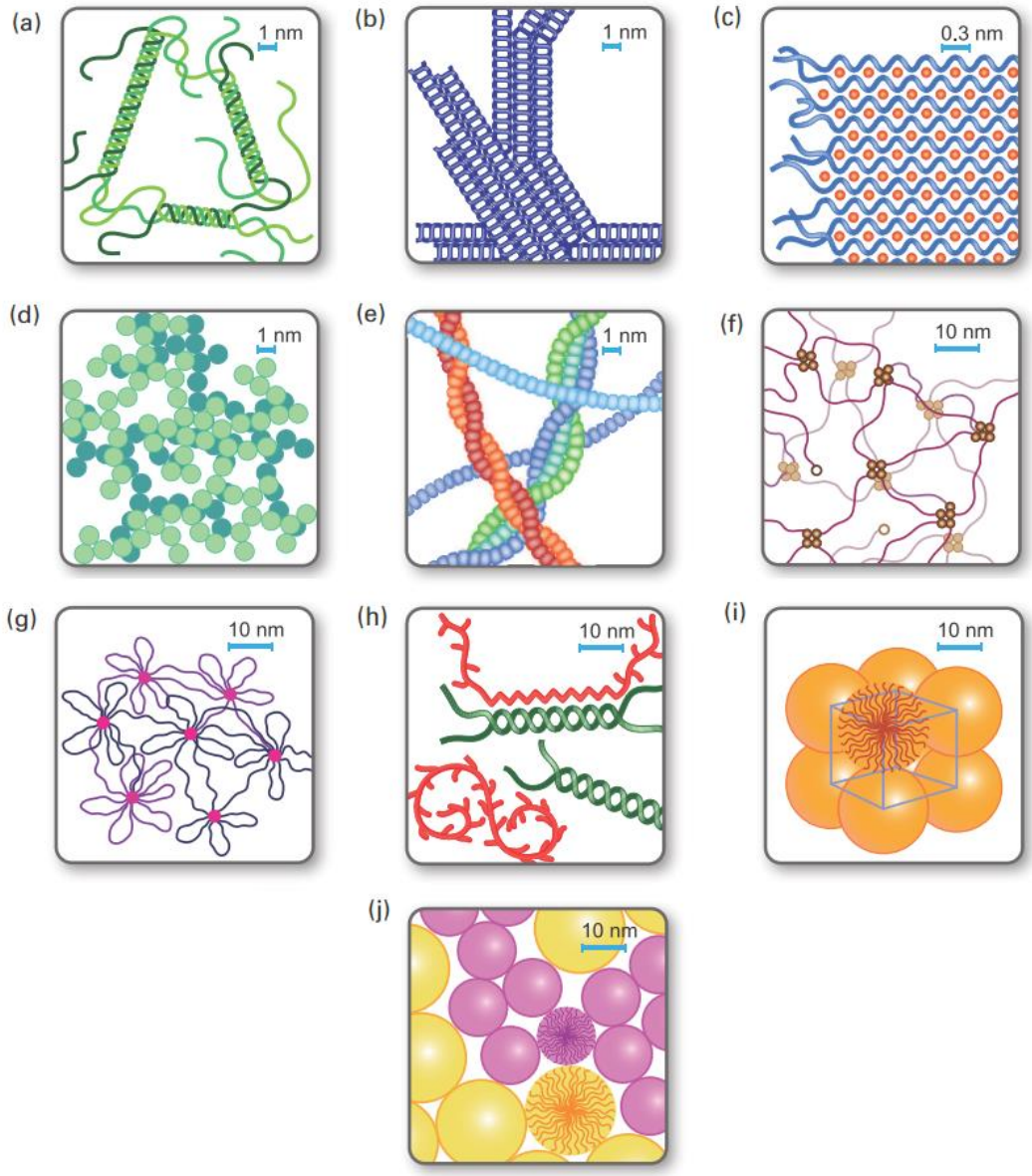
Obr. 2: Typy struktur: (a) uzly v chemické síti; (b) uzlové nebo spojné oblasti ve fyzikálních gelech; (c) vlákna tvořená v koloidech. Na obrázcích není uvedeno měřítko, (a) a (b) jsou typicky <0,3 nm, (c) může být v rozměrech > 2nm [21].

Prvním stupněm „gelovatění“ je tedy přesycení roztoku s ohledem na určité funkční skupiny v polymerním řetězci. Pokud je roztok přesycen látkou s nízkou molekulovou hmotností, tak se systém obvykle rychle rozdělí na dvě fáze (suspenze). U polymerních roztoků může po přesycení dojít za určitých podmínek k tvorbě fyzikálního gelu. K tomuto jevu dochází většinou u kopolymerů, které mají odlišnou chemickou povahu, např. obsah polárních i nepolárních skupin. Jedna část je v rozpuštěném stavu, zatímco druhá má tendenci se srážet z roztoku. Polymerní gely poté obsahují trojrozměrné sítě polymerních molekul v celém médiu. Celkový mechanismus gelace fyzikální sítě spočívá v souhře mezi rozpustností a agregací. Dále gelaci ovlivňuje kombinace několika dalších faktorů: teplota, pH, koncentrace polymeru, molekulová hmotnost polymeru a iontová síla [21].

Uzlové oblasti představují široký výběr různých typů, které se navzájem liší velikostí, strukturou, pevností, dobou života a jsou většinou kombinací několika typů. Kovalentní uzly

u chemických gelů lze považovat za nekonečně permanentní, u fyzikálních gelů tomu tak není. Některé uzlové oblasti mohou v čase zanikat a v jiném uspořádání opět vznikat, také se mohou při mechanickém namáhání rozpadat a ihned znovu obnovovat. Pevnost a životnost uzlových oblastí se projevuje především v reologických vlastnostech. Silné fyzikální gely mají pevné spoje a jsou elastické, chovají se podobně jako gely chemické. Naopak slabé fyzikální gely jsou málo trvanlivé, elasticky se chovají pouze při malých mechanických napětích. Pokud na slabý fyzikální gel působí velké mechanické napětí, tak dochází k zanikání uzlů a následnému rozpadu sítě. Jako fyzikální uzly mohou někdy působit zapleteniny, které nejsou projevem přitažlivých fyzikálních sil [21]. Mechanismy, které vedou k tvorbě fyzikální gelů:

1. Konformační změny polymeru. Do této kategorie se řadí vznik trojšroubovice u želatiny (obr. 3 a), agregace šroubovic v některých karagenech (obr. 3 b) a dvojité šroubovice v agaróze. Dalším příkladem je tzv. „egg-box“ struktura v alginátových gelech (obr. 3 c). První dva příklady jsou vyvolány snížením teploty a poslední dva jsou vyvolány změnami teploty nebo specifickým iontovým obsahem.
2. Denaturace globulárních proteinů, produkují se agregáty (sítě) koloidního typu s rozvětvenou strukturou (obr. 3 d) nebo s lineární (obr. 3 e).
3. Hydrofobní efekt vyskytující se u amfifilních polymerů. Pokud vložíme hydrofobní funkční skupiny do ve vodě rozpustného (hydrofilní) polymeru, vytváří se tento efekt, ve kterém mají hydrofobní části tendenci samouspořádávání do micel. To vede ke vzniku různých struktur v závislosti na architektuře kopolymeru: telechelické (obr. 3 f), náhodné bloky (obr. 3 g), triblokové kopolymery (obr. 3 i), lineární nebo rozvětvené.
4. Synergie mezi dvěma různými polymery (obr. 3 h). K tomu dochází v některých směsích polysacharidů a u některých specifických syntetických polymerů, které nedělají gel jako jednotlivé komponenty. Takový mechanismus má rysy kategorie 1 (konformační změna) a kategorie 5 (nemísitelnost). Směsi podobných triblokových kopolymerů se stejnou délkou bloku vedou k nemísitelnosti (obr. 3 j).
5. Nemísitelnost nebo separace fází. K tomu dochází zejména v binárních polymerních směsích nebo v roztoku polymeru, kde je špatné rozpouštědlo a to při nižších teplotách nebo s vybranými organickými rozpouštědly. Separace fází kapalina-kapalina může být potlačena vysokou viskozitou směsi, ale to není jediný mechanismus, hraje roli také skelný přechod nebo krystalizace může zasahovat do oddělení fází [21].



Obr. 3: Mechanismy tvorby sítě a pozorované struktury v systémech fyzikálních gelů: (a) spirálová asociace (želatina, agaróza); (b) šroubové formace v nabitých polysacharidech (karageny); (c) „egg-box" u Ca^{2+} alginátových gelů; (d) koloidní agregace proteinů v blízkosti izoelektrického bodu; (e) fibrilární agregace proteinů v amyloidových gelech při nízkém pH; (f) hydrofobní efekt v telechelických (koncově funkcializovaných) polymerních agregátech; (g) „květiny" (z ang. flower-like) v agregátech amfifilních blokových kopolymerů; (h) synergické interakce mezi dvěma polysacharidy; (i) koloidní krystal se sférickými micelami; (j) směsi podobných sférických micel v ternárních systémech (koloidní sklo) [21].

2.2.2.1 Hydrofobní efekt

U fyzikálních gelů může docházet k uspořádání polymeru do tvaru micel (viz obr. 3 f). Tvorbu micel vysvětluje hydrofobní efekt. Pro tvorbu hydrofobně spojených sítí jsou potřeba makromolekuly, které mají dvojí povahu. Pokud je jedna část rozpustná ve vodě (hydrofilní),

tak druhá nepolární část má tendenci být vyloučena z vody (hydrofobní). Tyto makromolekuly se nazývají amfifilní. Molekuly jsou kvůli své amfifilitě nuceny zaujmout unikátní orientaci vzhledem k vodnému médiu, které někdy iniciuje tvorbu organizované struktury. Amfifilní makromolekuly mohou být syntetizovány s různými architekturami: náhodné blokové kopolymery, telechelické kopolymery, triblokové kopolymery s hydrofobním jádrem nebo jako modifikované polysacharidy, které obsahují hydrofobní skupiny. V závislosti na chemické struktuře je můžeme klasifikovat jako aniontové, kationtové, neiontové nebo zwitterionické [9].

Standardní (Gibbsova) volná energie převodu jedné uhlovodíkové molekuly z vodné fáze do oleje je velká a negativní, což odráží zřejmý fakt, že nepolární oleje mají extrémně malou rozpustnost ve vodě. Podobné chování by se dalo očekávat pro hydrofobní řetězce PAL. Termodynamika tvorby micel ukazuje, že entalpie tvorby micel ve vodě je pravděpodobně pozitivní, to znamená, že je endotermická [21].

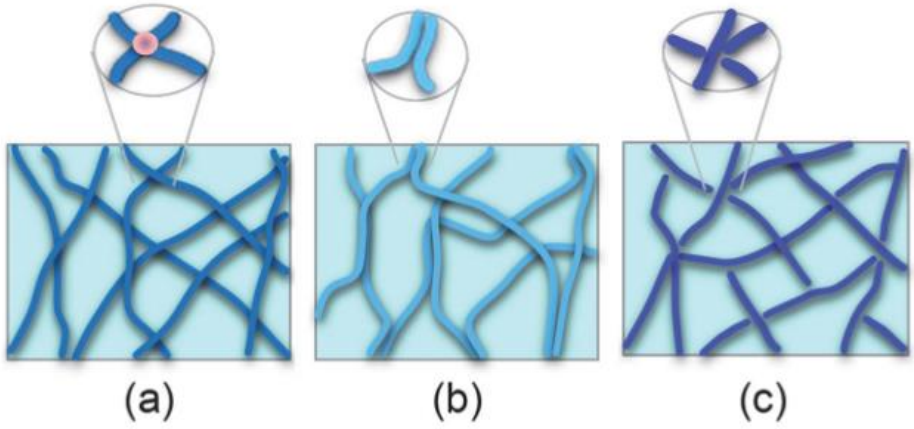
To, že se micely tvoří nad KMK, znamená, že jejich volná energie pro jejich uspořádávání je negativní, $\Delta G<0$, při zachování vztahu $\Delta G=\Delta H-T\Delta S$ a faktu, že entalpie tvorby micel, $\Delta H>0$, je kladná, tak změna entropie $\Delta S>0$. Kladná změna entropie spojená s tvorbou micel indikuje přínos entropie z rozpouštědla, přestože molekuly jsou klastrovány dohromady. Je-li molekula uhlovodíku obklopena vodou, tak díky tomuto seskupení klesá entropie vody. Jakmile jsou molekuly PAL seskupeny do malých shluků, tak dojde ke zvýšení entropie molekul rozpouštědla [21].

2.3 Molekulární gely

Nyní obraťme pozornost na molekulární gely, které vznikají samouspořádáváním malých molekul. Typický systém zahrnuje organické molekuly s malou molekulovou hmotností (gelátory) v rozpouštědle. **Organogelátory** jsou gely organických rozpouštědel a **hydrogelátory**, které vytváří gel ve vodě. Zpočátku je gelátor rozpuštěn v rozpouštědle při vysoké teplotě za vzniku tenkého roztoku (sol). Po ochlazení pod charakteristickou teplotu (T_{gel}) se sol přemění na elastický pružný gel, který udrží svou váhu i při otočení vialky. Gelátory mohou být také při pokojové teplotě tenký sol, který při zvýšení teploty přechází v gel. Reologické studie potvrzují elastické chování gelů, tzn. že elastický modul (G') a ztrátový modul (G'') není závislý na frekvenci. Elektronová mikroskopie těchto gelů obvykle odhalí síť vláken, někdy je v tomto kontextu používán termín SAFIN (self-assembled fibrous network), který vyjadřuje, že vláknitá síť byla vytvořena samouspořádáváním gelátorů. Průměr vláken je obvykle v měřítku nanometrů, zatímco jejich délka je často vyšší než několik desítek mikronů. Vlákna jsou tedy velmi dlouhá v poměru k jejich tloušťce. Je zřejmé, že vlákna jsou tvořena samouspořádáváním gelátoru podél axiálního rozměru [1].

Podobný scénář je také u vláknitých gelů peptidů a proteinů. V případě vláknitých cytoskeletálních proteinů, jako jsou např. aktin nebo mikrotubuly, jsou stavebními kameny samy kulové makromolekuly. V případě aktinu je stavební kámen G-aktin, protein o molekulové hmotnosti kolem 30 000 g/mol a velikost průměru je přibližně 5 nm. Roztok G-aktinu ve vodě při pokojové teplotě je tenký sol. Za specifických podmínek koncentrace soli, teploty atd. se G-aktin samouspořádává do vláken F-aktinu, který má průměr přibližně 30 nm a délku mnoha mikronů. Následně je vzorek převeden na elastický gel. I když je velké množství zesíťovaných proteinů známé kvůli F-aktin, ke tvorbě gelů dochází i v jejich nepřítomnosti [1].

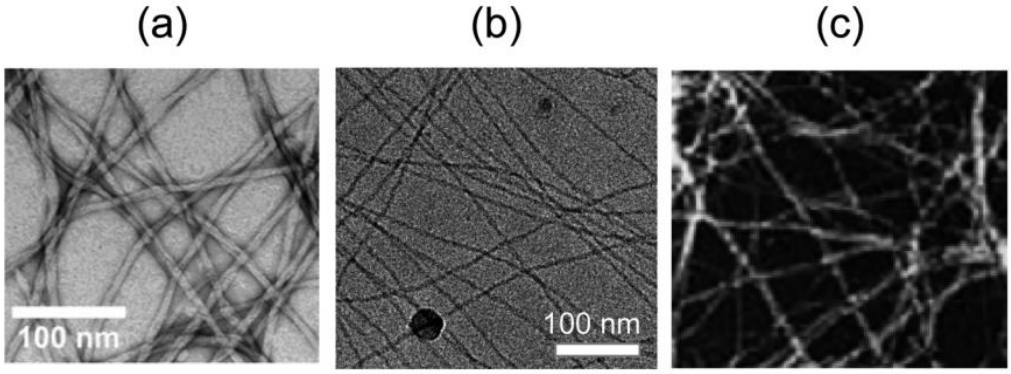
Pro vysvětlení tvorby molekulárních nebo proteinových gelů vědci používají často analogii se zesítěnými polymery (tj. model Floryho gelu) a trvají na tom, že jen dlouhé vláknité micely nestačí na to, aby roztok vykazoval elastické chování, a tedy musí existovat ještě další interakce mezi vlákny („příčné“ vazby). Jsou tři základní případy, které lze očekávat: (a) interakce mezi řetězci micel - křížení, (b) spojovací zóny nebo svazování, (c) zasekávání vláken do sebe/větvení. Tyto interakce jsou schematicky znázorněny na obr. 4. První možnost nastává, když se kříží dvě vlákna, poté může dojít ke slabé přitažlivé interakci, která se v podstatě rovná zesítění. Tato interakce může být stejná jako ta, která vede k růstu vláken nebo to může být interakce mezi povrchy vláken na základě chemického složení. Druhý případ naznačuje, že dvě sousední vlákna se spojí do axiálního svazku v důsledku svinutí. Poslední případ micelární interakce, která je vysvětlována tím, že v případě rigidních vláken dojde k jejich zaseknutí do sousedních vláken či vytvoření nových micelárních větví. Tato varianta vede ke vzniku rozvětvené sítě. Alternativně by mohlo dojít k rozvětvení v důsledku sekundární nukleace zrn s novou orientací na rozhraní vlákna, což vede k sférolitickému růstu. Obecně je první případ, tedy přitažlivost řetězců, málo pravděpodobný, protože většina molekulárních gelů je tvořena amfifilními gelátory. Při jejich uspořádání většinou dojde k tomu, že hydrofobní část tvoří vnitřní část vlákna a hydrofilní skupiny tvoří vnější část vlákna. Při tomto uspořádání je poté těžké vysvětlit, proč by se hydrofilní povrchy vláken měly výrazně přitahovat. Pokud jde o spojovací zóny nebo spletení, tak zde existují i nějaké publikované studie gelů, kde jsou tyto zóny odhalené, ale v žádném případě není univerzálně platné. Konečně, co se týče sférolitického růstu, je to vidět na gelech, které jsou silně krystalické, ale mnoho gelů má vlákna amorfní, a to i když jsou vlákna uspořádaná, jsou často pružná, nikoliv tuhá [1].



Obr. 4: Základní 3 případy vzniku sítě v molekulárních gelech: (a) atrakce na uzlech, (b) spojovací zóny nebo svazování, (c) větvení [1].

Na obr. 5 jsou snímky molekulárních gelů z transmisního elektronového mikroskopu (TEM), kde je patrné, že vlákna jsou semiflexibilní, nenachází se v nejpravděpodobnější konformaci náhodných klubek, ale ani nejsou úplně rovná. Na obr. 5 (a) vlákna tvoří hydrogel z organické molekuly F5-fenylalaninu [24]. Obr. 5 (b) byl pořízen na kryogenním TEM, zobrazuje gel tvořený vláknitými micelami PAL EDAB o koncentraci 50mM [25] a obr. c) je TEM snímek gelu z vláken proteinu F-aktinu o koncentraci 1 μM [26]. Na snímcích nelze pozorovat konce vláken a evidentní není ani větvení vláken. Spojovací zóny nebo splétání nelze vyloučit, ale tyto prvky nejsou viděny často, pokud k nim vůbec dojde. Je pozoruhodné,

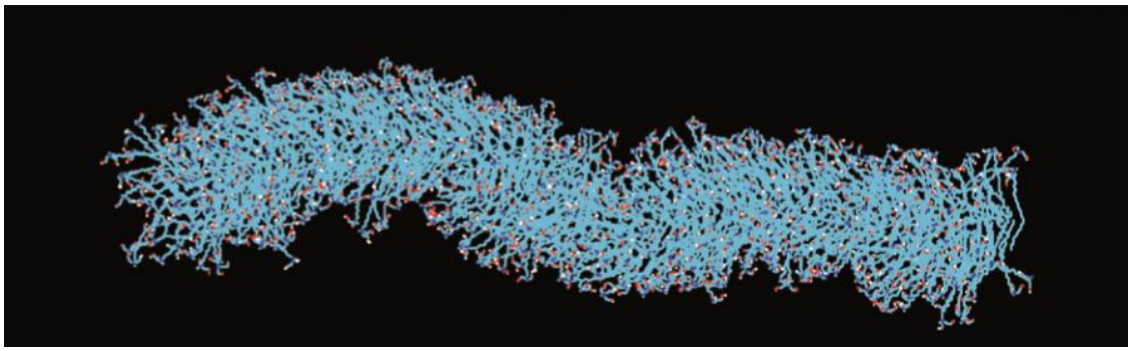
že zobrazení různých druhů molekulárních gelů vede vždy k podobné struktuře. V každém případě se zdá, že vlákna preferují tvorbu sítě pomocí topologických interakcí než pomocí fyzikálních interakcí [1].



Obr. 5: Snímky molekulárních gelů pořízené TEM [1, 24, 25, 26]

2.3.1 Vláknité micely

Vláknité micely překlenují mezeru mezi zapletenými polymery a molekulárními gely. Vodný roztok vláknitých micel je typicky složen z poměrně dlouhých kationtových PAL, např. cetyl (C_{16}) trimethylamoniumbromid (CTAB) a soli jako je chlorid sodný (NaCl). V takových roztocích se PAL samouspořádávají do dlouhých vláknitých micel s průměrem okolo 2-3 nm a průměrná konturová délka je větší než 500 nm. Na obr. 6 je zobrazená vláknitá micela, která byla vytvořena počítačovou simulací molekulární dynamiky (MD). Jedná se o tzv. vláknité („wormlike“, „thread-like“) micely, jejich existence byla potvrzena řadou technik, včetně kryogenní transmisní elektronové mikroskopie (kryo-TEM). Vláknité micely se zaplétají a tvoří přechodné sítě stejně jako polymery, ale tyto systémy obvykle vykazují viskoelastické chování, jejich relaxační čas je konečný. Dlouhé vláknité micely jsou podobné polymerům, existují však zásadní rozdíly. Distribuce délek vláknitých micel je široká a průměrná velikost je funkcí koncentrace, konturová délka obvykle nabývá hodnot od stovek nanometrů až po řádově jednotky mikronů. Vláknité micely jsou velmi dynamickým systémem, kde dochází k neustálému štěpení a rekombinaci v důsledku teplotních výkyvů. Vláknité micely mohou tvořit smyčky a spojovat se [1, 23].



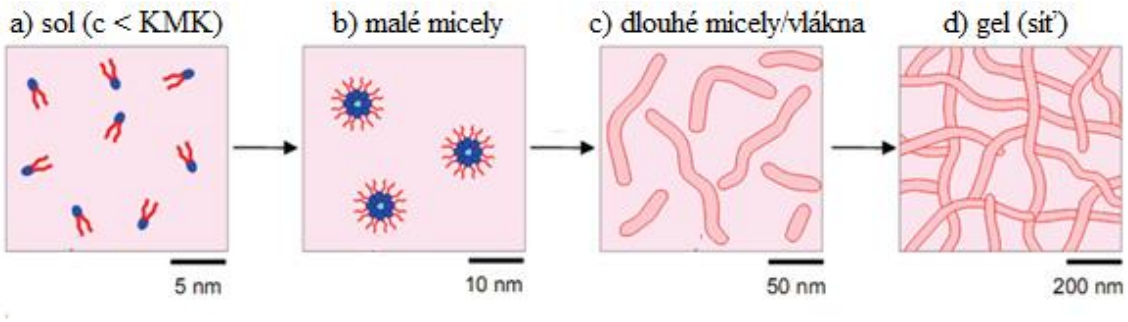
Obr. 6: MD simulace vláknité micely [27]

Reologické chování vláknitých micel bývá často dosazováno do Maxwellova modelu s jedním relaxačním časem τ. To je nejjednodušší model pro viskoelastické tekutiny. Vláknité micely mají různé konturové délky, což má za následek vysokou polydisperzitu. Při

reologickém měření bylo ale zjištěno, že vláknité micely vykazují pouze jeden relaxační čas. Polydisperzita však vede ke spektru relaxačních časů, což je důležitým aspektem pro odklon od Maxwellova modelu a byl objasněn Catesem v roce 1990. Vláknité micely jsou stejně jako polymery opravdu dlouhé, liší se však tím, že je pohromadě drží pouze slabé nekovalentní interakce. Molekuly PAL se můžou v micelách neustále měnit, protože vlákna se často štěpí a rekombinují. Z tohoto důvodu jsou vlákna označována často jako „žijící“. Vláknité micely mohou relaxovat aplikované napětí tímto „vypínacím“ mechanismem (rozpad a následná rekombinace), která má charakteristické časové měřítko nazývané čas rozpadu (z *angl.* „breaking time“ t_{br}). Normální polymery, které jsou spojeny kovalentními vazbami, nemění svoji strukturu při působení napětí až do určité meze [1, 22].

Cates zároveň poznamenal, že ke štěpení dochází mnohem rychleji než k relaxaci celé struktury, platí $t_{br} << \tau$, celkový relaxační proces má tedy jediný τ a může být tedy použit Maxwellův model. Experimenty potvrdily základní aspekty této teorie. Čas rozpadu t_{br} je obtížně stanovitelný parametr, pokud je ale PAL tvořena C_{16}, tak bylo zjištěno, že t_{br} je v řádu od 0,01 do 0,1 s. Tyto nízké hodnoty potvrzují spolehlivost teorie, že vláknité micely podléhající maxwellovy relaxaci, mají rychlý čas štěpení (*z angl. „fast-breaking“ limit*) [22].

Na obr. 7 je schematicky znázorněný proces tvorby vláknitých micel aniontově nabité látky. Na obr. 7 a) je znázorněná amfifilní molekula, která má hydrofilní „hlavičku“, která je v obrázku znázorněna modrou barvou a hydrofobní část, „ocas“, který je červený. Na obr. 7 b) je znázorněna sférická struktura micel při pokojové teplotě. Při zavedení aditiva do roztoku (v ilustraci je to p-ethylenfenol (PEP)), přecházejí micely ze sférických koloidních částic do vláken (obr. 7 c). Při vyšších koncentracích gestorů v roztoku vzniká gel (obr. 7 d). Takovéto typy gelů jsou homogenní a amorfní. Vykazují mez kluzu a jsou frekvenčně nezávislé na modulu pružnosti v reologických experimentech. Gely nelze snadno narušit, můžeme je narušit pouze velkými smykovými rychlostmi, napětími, ale dokáží se obnovit v řádech sekund [28].



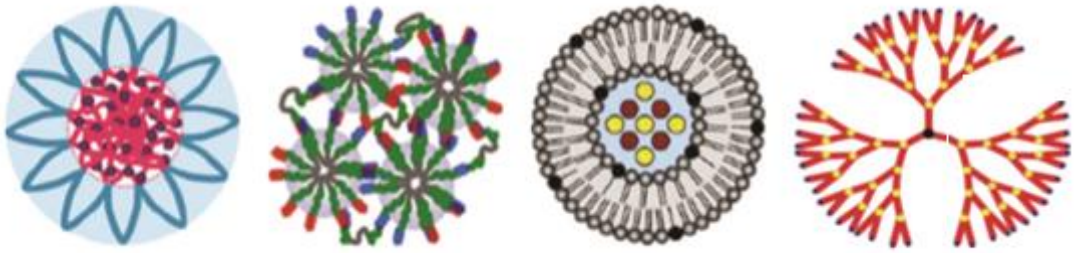
Obr. 7: Schematické znázornění tvorby vláknitých micel [28]

2.4 Termocitlivé nosiče léčiv

Tyto materiály mají ostrou přechodovou teplotu, kdy se stávají buď rozpustné, nebo nerozpustné. Systémy doručování léčiv, které jsou závislé na změně teploty, využívají různé polymerní vlastnosti, např. tepelně vratný přechod polymerních molekul, skelný přechod a krystalické tání [29].

V posledních letech vzrostl především ve farmacii zájem o termocitlivé nanočástice zahrnující micely, hydrogely, liposomy a dendrimery (viz obr. 8). Tyto farmaceutické

nanočástice se mohou v tkáni hromadit aktivním nebo pasivním cílením. Pasivní cílení je založeno na vlastnostech nosičů (jako je rozpustnost, stabilita *in vivo* a distribuce velikosti částic), aktivní cílení je založeno na navázání speciálních ligandů na povrch nanonosičů [30, 33].



Obr. 8: Příklady termocitlivých nosičů (polymerní micela, hydrogely, liposomy, dendrimery) [30]

2.4.1 Termosenzitivní micely

Termosenzitivní micely jsou amfifilní blokové kopolymery, které se skládají z hydrofobních a hydrofilních bloků. Ty mají tendenci vytvářet micely ve vodném roztoku z důvodu snížení Gibbsovy volné energie, především v závislosti na hydrofobní interakci (detailněji popsáno v kapitole 2.2.2.1). V důsledku hydrofobní interakce, kdy mezi sebou reagují hydrofilní segmenty amfifilních blokových kopolymerů, vzniká samouspořádáváním tzv. shell-core struktura micely se střední velikostí 10-60 nm ve vodném roztoku. Termosenzitivní micely mohou být rozděleny do dvou skupin: polymerní micely s termosenzitivním vnějším pláštěm a polymerní micely s termocitlivým vnitřním jádrem [30].

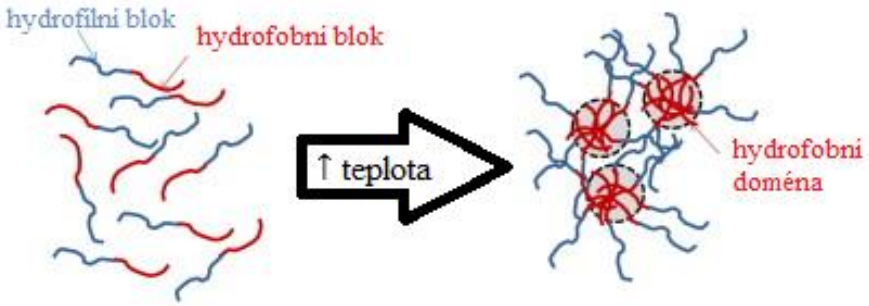
2.4.2 Termosenzitivní hydrogely

Termocitlivé hydrogely jsou trojrozměrné hydrofilní polymerní sítě, které jsou schopné absorbovat velké množství vody nebo biologických tekutin, jsou schopny reagovat na teplotní stimuly v těle. Tyto systémy podstupují reverzibilní fázový přechod sol-gel, v mnoha případech i přechod gel-suspenze, se změnou teploty prostředí. Řada polymerních materiálů má tento přechod blízký teplotě těla (37 °C), díky této teplotě mají materiály velký potenciál právě v oblasti medicíny pro dodávání léčiv. Teplotně citlivé hydrogely jsou klasifikovány do negativně termosenzitivní, pozitivně termosenzitivních a tepelně reverzibilní gely [29, 31]

2.4.2.1 Negativní termocitlivé hydrogely

Negativní termocitlivé hydrogely jsou charakterizovány nižší kritickou rozpouštěcí teplotou z angl. *low critical solution temperature* (LCST), která může být definována jako kritická teplota, pod kterou polymer nabotná v roztoku. Makroskopicky lze popsat tento stav jako jednofázový. Zatímco nad LCST se polymer smršťuje. Mechanismus je znázorněn na obr. 9. Toto chování vychází z hodnoty entalpie, kdy pod LCST převažuje interakce vodíkových můstků mezi řetězcem polymeru a molekulami vody. Nad LCST je celý proces entropicky řízen (hydrofobními interakcemi) a dochází vlivem desolvatace řetězce k hydrofobizaci makromolekul. Ze strukturního hlediska dochází ke kolapsu klubka a fázové separaci, která se makroskopicky projeví jako zákal. LCST lze ovlivňovat zabudováním hydrofilních nebo hydrofobních skupin ve struktuře polymeru. Např. pokud přidáme hydrofilní monomery, zvýšíme LCST. Naopak pokud zvýšíme množství hydrofobních monomerů, tak LCST klesá. Obecně tedy platí, že čím více hydrofobních segmentů v hydrogelu je, tím je větší hnací síla

pro hydrofobní agregaci, a tím je nižší teplota gelace. Do této skupiny patří např. poly(N-izopropylakrylamid) [30, 31].



Obr. 9: Mechanismus gelace termocitlivých fyzikálních hydrogelů [32]

2.4.2.2 Pozitivní termocitlivé hydrogely

Pozitivní termocitlivé hydrogely mají horní kritickou rozpouštěcí teplotu (z angl. *upper critical solution temperature,* UCST). Hydrogel se smršťuje při ochlazení pod UCST. Do této skupiny se řadí např. polyakrylamidy [31].

2.4.3 Termocitlivé lipozomy

Lipozomy jsou sférické, samostatně uzavřené struktury, tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou obklopující vodnou vnitřní část. Liposomy mají v průměru přibližně 100 nm (obr. 8). Termocitlivé lipozomy se používají především k uvolňování léčiv při nádorových onemocnění [30].

2.4.4 Termocitlivé dendrimery

Dendrimery mají jedinečnou architekturu a vlastnosti, jako je vysoká kontrolovatelnost struktury, povrchové vlastnosti a jejich velikost. Dendrimery se skládají z centrálního jádra, ke kterému je připojená vnitřní vrstva složená z opakujících se jednotek a vnější vrstvy připojené k vnitřní (obr. 8). Vlastnosti jsou ovlivňovány funkčními skupinami na molekulárním povrchu. Dendrimery se někdy označují jako polymery 21. století a jsou využívány jako nosiče léčiv a genů. Léčivo může být zapouzdřeno mezi větve dendrimeru, což umožňuje doručování nestabilních nebo špatně rozpustných léčiv. Jako jádro dendrimeru může být např. kopolymer polyamidaminu s polypropyleniminem, termocitlivý plášť je tvořen isobutyramidem [30, 33].

2.5 Charakterizace blokových polymerů

Pro studium kopolymerů schopných tvořit micelární strukturu ve vodném roztoku je nutné nejdříve charakterizovat výchozí polymer. Nejčastěji používaná technika pro stanovení molekulové hmotnosti a distribuce molekulové hmotnosti polymerů je gelová permeační chromatografie (GPC), pro stanovení složení hydrofobní/hydrofilní se používá NMR (nukleární magnetická rezonance). 1H NMR umožňuje stanovit strukturní vlastnosti, jako poměr EO/LA, číselně střední stupeň polymerace (DP), střední číselnou molekulovou hmotnost (M_n). Pro vyhodnocení tepelných vlastností, včetně teploty tání (T_m), entalpie tání (ΔH_m), teploty skelného přechodu (T_g), teploty studené krystalizace (T_c), se používá diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). DSC, infračervená spektrometrie (IČ) a rentgenové

difrakční techniky se používají k určení krystalinity, pokud zvyšujeme délku PLA bloku, tak dochází k poklesu krystalinity [14].

Rozpuštěním kopolymerů ve vodném roztoku dostáváme disperzní koloidní systém. Pro studium vzniklých hydrogelů je nutné volit techniky vhodné pro studium vodných roztoků.

a) Reologie

Pomocí reologie analyzujeme jak dynamicko-mechanické chování, tak tokové křivky. Můžeme studovat chování i při zvyšující se teplotě, je tedy možné studovat sol-gel přechod. Následně se analyzuje samouspořádávání a termogelace těchto blokových kopolymerů

Další metoda, která může být použita ke stanovení sol-gel přechodu, navzdory tomu, že ji lze považovat za subjektivní a nepřesnou je obracení zkumavek. Do zkumavky připravíme 4 ml roztoku, teplotu zvyšujeme o 1 °C, pokud zkumavku obrátíme a je 30 s bez průtoku, roztok je považován za gel.

b) Dynamický rozptyl světla (DLS)

Přičemž DLS se používá ke stanovení hydrodynamické velikosti micel. Velikost micel může být vynesena jako funkce teploty.

c) Zobrazovací techniky

Vzhledem k malým rozměrům vláknitých micel se nabízí kryo-TEM, která má výborné rozlišení, až kolem 0,2 nm. Kryo-TEM také umožňuje zobrazení systému při různých teplotách.

d) Ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV-VIS)

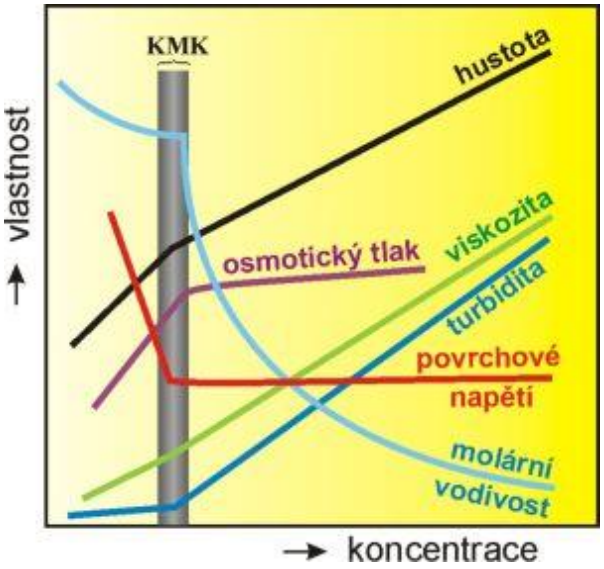
Stanovuje se kritická micelární koncentrace (KMK), charakterizující tvorbu micel. UV-VIS společně s fluorescenčními technikami a povrchovými napětími jsou nejčastěji používané za účelem stanovení KMK. Při stanovení KMK pomocí UV-VIS se používá rozpouštění hydrofobního barviva, které se uzavře do micel, tím dojde k ověření tvorby micel.

e) Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS), maloúhlový rozptyl neutronů (SANS)

Tyto techniky slouží k určení velikosti a tvaru částic. Můžeme díky nim stanovit velikost micel v roztoku. Nejvyšší hodnotu poloměru rozptylující částice můžeme určit z párové distribuční funkce, tato hodnota může také poukazovat na agregaci částic a sloužit tak při bližším určování tvaru a velikosti částic ve vzorku [14, 44].

2.5.1 Kritická micelární koncentrace

Nad úzkým rozsahem koncentrace, která je charakteristická pro každé rozpouštědlo, se rozpuštěné amfifilní látky spojují za vzniku agregátů zvané micely. Tato koncentrace, nad níž se tvoří znatelné množství micel, nazýváme KMK. Při této koncentraci dochází k náhlé, dobře definované změně v některých z fyzikálně-chemických vlastností vodných roztoků PAL. Vlastnosti, kterými je možné definovat KMK, jsou např. mezifázové napětí, vodivost, osmotický tlak, samodifúzní koeficient a viskozita (viz.obr. 10) [34].



Obr. 10: Fyzikální vlastnosti, kterými je možné stanovit KMK [34]

Pod touto koncentrací se molekuly v systému nachází ve formě unimerních molekul. KMK pro různé PAL je různá, pohybuje se v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol·dm^3. Tvorbu micel ovlivňuje mnoho faktorů:

- **Vliv chemické struktury**

KMK závisí na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce PAL, na vlastnostech hydrofilní skupiny a u ionogenních PAL i na vlastnostech protiiontů vzniklých disociací. Hodnota KMK klesá s rostoucí **délkou lineárního řetězce**, naopak struktura **rozvětvených** řetězců (či přítomnost dvojných vazeb, polární substituce aj.) vede ke zvýšení KMK.

Dále mají na KMK vliv **hydrofilní skupiny**, ten je dán její povahou a nábojem. KMK neionogenních PAL je nižší než ionogenních při stejné délce uhlovodíkového řetězce. Na hodnotu KMK neionogenních PAL má velký vliv rozměr a povaha hydrofilní skupiny.

- **Vliv příměsí**

Hodnotu KMK dále ovlivňují další látky v roztoku. Jednoduché anorganické elektrolyty snižují KMK. Čím vyšší je koncentrace anorganického a mocenství opačně nabitého iontu, tím nižší je hodnota KMK. U neoionogenních PAL je vliv příměsí menší než u ionogenních.

V roztoku mohou být dále neelektrolyty, které můžou mít různé vlivy. Např. nepolární látky mají malý vliv, silně polární látky mají komplexní účinky, lineární alkoholy s dlouhými řetězci snižují KMK.

- **Vliv teploty a tlaku**

U neionogenních PAL se obvykle s rostoucí teplotou hodnota KMK snižuje, naopak u ionogenních PAL se obvykle hodnota KMK zvyšuje s rostoucí teplotou. Teplotní závislost KMK může vykazovat i zřetelné minimum. Vliv tlaku na KMK je poměrně malý a to i v oblastech velmi vysokých tlaků [34].

2.5.2 Reologie

Reologie se zabývá deformací a tokem materiálů. Pokud na materiál působí síla, tak dochází k jeho deformaci. Když se deformace zvětšuje s dobou působení síly, materiál teče. Viskozita udává poměr mezi působící silou (tečným, smykovým napětím) a rychlostí změny deformace (smykovou rychlostí). Viskozita vyjadřuje vnitřní tření kapaliny. Materiály s nízkou

viskozitou tedy tečou dobře, naopak materiály s vysokou viskozitou odolávají toku lépe. Kromě toho, že materiály tečou, mohou také pružit. Do určité míry mohou odolávat (mez toku) a pak teprve začít téct, dále mohou klouzat podél stěny potrubí atd. Abychom mohli předpovědět chování materiálů v běžném životě, ale také v technologických procesech, musíme provádět reologická měření přesně geometricky vymezenými senzory s precizním stanovením působící síly a vyvolané deformace, poté můžeme rozlišit jevy, které se v materiálu odehrávají a správně popsat reologické chování daného materiálu [35].

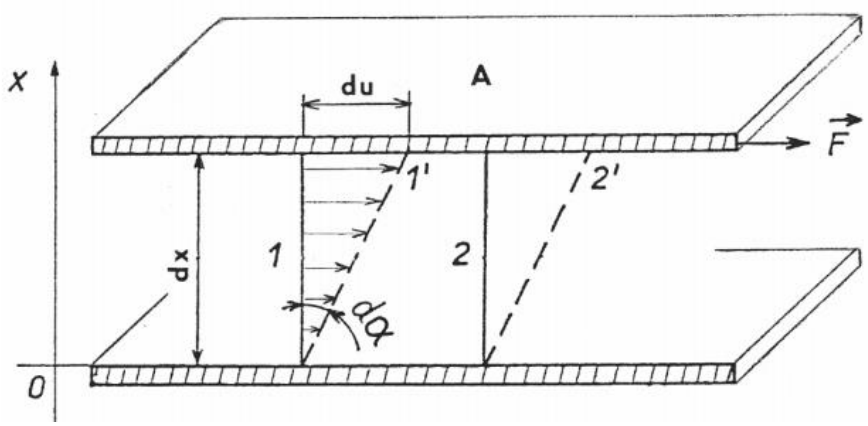
Reologická studie poskytuje velmi důležité informace a i velmi malá změna složení pozorovaného materiálu může dramaticky změnit reologické chování. Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice, které vyjadřují vztah mezi smykovým napětím a deformací kapaliny. K popisu tokového chování se používají reologické modely [36].

2.5.2.1 Newtonské kapaliny

Jedním z nejjednodušších modelů, který popisuje reologické chování ideálně viskózních materiálů, jsou newtonovské kapaliny. Jejich chování popisuje Newtonův zákon, který má tvar:

$$\sigma = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot \dot{\gamma},$$

kde η je dynamická viskozita, která charakterizuje vnitřní tření newtonské kapaliny, du je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin, které jsou od sebe vzdálené o dx a $\dot{\gamma}$ je gradient rychlosti (rychlost deformace, rychlost smyku), charakterizuje tvarové změny v proudící tekutině. Newtonův zákon je zobrazen na obr. 11, kde je mezi deskami umístěná látka. Dolní deska je stacionární, horní deska o ploše A se pohybuje rychlostí u_0, která je vyvolána smykovou silou $\vec{F}$ působící v rovině desky [36].



Obr. 11: Rychlostní profil toku v kapalině mezi stacionární a pohybující se deskou [36]

Smykové napětí vyjadřuje odpor materiálu vůči deformaci:

$$\sigma = \frac{F}{A}\left[Pa\right].$$

Smykovou deformaci můžeme vyjádřit relativním posunutím (mezi dvěma vrstvami):

$$\gamma = \frac{u}{x}\left[s^{-1}\right].$$

Hodnota dynamické viskozity je látkovou charakteristikou, která s rostoucí teplotou klesá a s rostoucím tlakem roste. Jednotka dynamické viskozity je $[Pa \cdot s = kg/m \cdot s]$. Převrácená hodnota dynamické viskozity se nazývá fluidita (tekutost) $\varphi = 1/\eta$. Podíl dynamické viskozity a hustoty tekutiny se nazývá viskozita kinematická:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}\left[m^2/s\right].$$

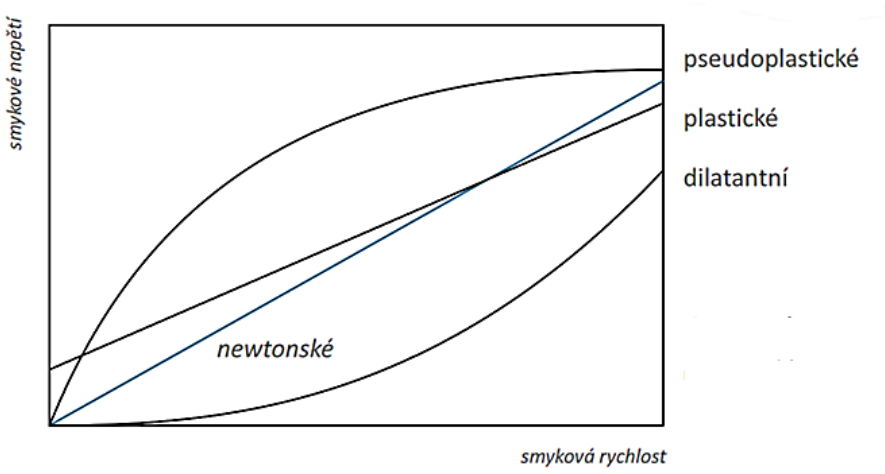
Tekutiny, které se řídí Newtonovým zákonem se nazývají newtonské. Zpravidla se sem řadí nízkomolekulární látky, jejich toková křivka je zobrazena na obr. 12. Deformace těchto látek je nevratná a trvalá. Vložená energie do systému se v něm ztrácí a přetváří se na teplo. Tento typ deformace je nazýván jako vizkózní deformace a popisuje se modelem pístu. Konstantou úměrnosti mezi vkládaným smykovým napětím a rychlostí deformace je viskozita kapaliny [36].

2.5.2.2 Nenewtonské kapaliny

Pro nenewtonovské kapaliny platí analogický zákon:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma},$$

kde η je tzv. zdánlivá viskozita, která závisí na rychlosti deformace nebo tečném napětí. K charakterizaci toku nenewtonovských kapalin je tedy nutné znát průběh závislosti $\eta = f(\dot{\gamma})$. Jejich deformace je viskózní. Rozdíl v chování od newtonovských kapalin lze znázornit závislostí smykového napětí na smykové rychlosti (viz obr. 12)



Obr. 12: Newtonské a nenewtonovské kapaliny [39]

Základní typy nenewtonovských kapalin jsou:

a) Pseudoplastické kapaliny, s rostoucím gradientem rychlosti se zdánlivá viskozita zmenšuje.
b) Dilatantní kapaliny, s rostoucím gradientem rychlosti zdánlivá viskozita roste.

K vyjádření tokových křivek pseudoplastických a dilatatních kapalin se používá tento vztah:

$$\dot{\gamma} = K \cdot \sigma^n,$$

n>1 pro pseudoplasticitu, n<1 pro dilataci, kde *K*, *n* jsou empirické látkové parametry, které charakterizují vlastnosti toku nenewtonské kapaliny, závisí na teplotě.

c) Binghamské kapaliny, kapaliny s plastickou složkou deformace. K toku materiálu dochází až po překročení prahového smykového napětí, tzv. mez kluzu.

Existují také kapaliny, jejichž deformace je časově závislá. Ty můžeme rozdělit na tixotropní a reopektické. Jejich tokové křivky vykazují hysterezi, což znamená, že nemají stejný průběh při zvyšování a snižování napětí [36].

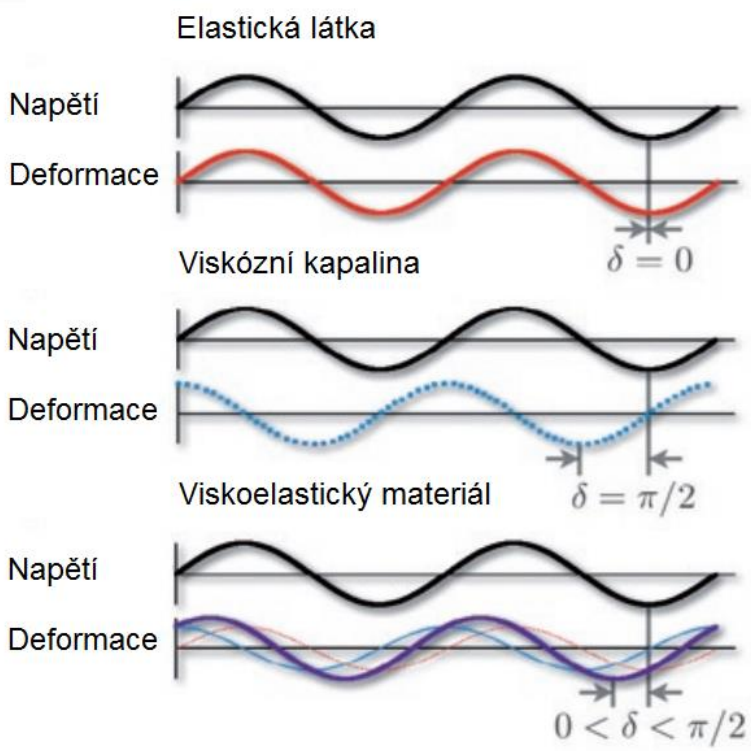
2.5.3 Viskoelastické materiály

Polymerní molekuly mají velkou konformační rozmanitost a jsou velké, což zamezuje uskupení do uspořádaného systému typického pro většinu pevných látek. Přítomnost polymerních klubek v tavenině zabraňuje, aby se materiál choval jako klasické newtonovy kapaliny. Odezva polymerních materiálů na působící napětí není ani čistě elastická, ani čistě viskózní. Jejich odezva je viskoelastická. Když na viskoelastický materiál aplikujeme konstantní napětí v čase, tak deformace bude v čase růst a materiál začne téct (creep). Pokud na polymer aplikujeme konstantní deformaci v čase, tak napětí bude s časem klesat. Tento jev je označován jako relaxace napětí [38, 41].

Modul je definovaný jako poměr napětí a deformace, které jsou u viskoelastických materiálů funkcí času, tak je také modul funkcí času. Na strukturní úrovní se aplikace napětí projevuje přeuspořádáváním řetězců. Dlouhé řetězce se uspořádávají ve směru působící síly, po přerušení se řetězce zaplétají a systém vykazuje elastický návrat. Viskoelastické vlastnosti jsou funkcí teploty i času [38, 41].

Pro pochopení chování, struktury a složení polymerních materiálů musíme určit elastickou i viskózní komponentu. Reologická dynamická analýza je metoda, která měří viskózní a elastickou složku po aplikaci oscilační síly nebo deformace při frekvenci ω, obvykle sinusového průběhu, jako funkci času nebo teploty. V závislosti na typu namáhání je měřena napěťová nebo deformační odezva. Oblast, kde při namáhání nedochází k destrukci vzorku, se nazývá lineárně-viskoelastická (LVO). Výstupem reologických měření je komplexní modul (G^*), který se skládá ze dvou složek. Ztrátový modul (G''), který přísluší viskózní složce, elastický modul (G') přísluší elastické složce [38, 41].

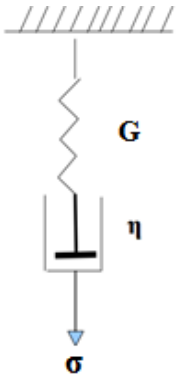
V závislosti na druhu vzorku, aplikovaném sinusovém signálu a odezvě vzorku se objeví fázový posun δ. U čistě elastického materiálu se veškerá energie při zatížení opět uvolní po odlehčení vzorku, nedochází tedy k žádné ztrátě vložené mechanické energii, nedochází ani k její přeměně v teplo. U čistě elastické látky je amplituda napětí i deformace ve fázi, naopak u čistě viskózních materiálů dochází k fázovému posuvu o 90°. Viskoelastické materiály mají odezvu částečně viskózní i elastickou, proto dochází k fázovému posuvu, který se nachází v intervalu mezi 0-90°. Na obr. 13 jsou schematicky znázorněny odezvy elastických látek, viskózních kapalin a viskoelastických materiálů na vkládané kmitající napětí [38, 40, 41].



Obr. 13: Chování materiálů po vložení kmitajícího napětí [40]

Rozdíl chování mezi elastickými, viskózními a viskoelastickými materiály je dobře popsatelný při časovém nebo frekvenčním měření. Pro každý materiál je charakteristický relaxační čas (τ), pokud je doba, kdy aplikujeme napětí kratší než τ, tak se chová jako pevná látka a pokud je čas měření větší než τ, tak se chová jako viskózní kapalina. Poměr charakteristické doby relaxace k době pozorování se nazývá Debořino číslo (De). Pokud je De>>1, tak se materiál chová jako pevná látka, naopak pokud je De<<1, chová se jako kapalina [39].

Jedním z fenomenologických modelů popisující viskoelastické materiály je Maxwellův model. Schématické znázornění je vidět na obr. 14, kde je sériově zapojená pružina (elastický prvek) s pístem (viskózní prvek). Napětí je na obou komponentách stejné, celková deformace je však součtem jejich deformací [39].



Obr. 14: Maxwellův model [39]

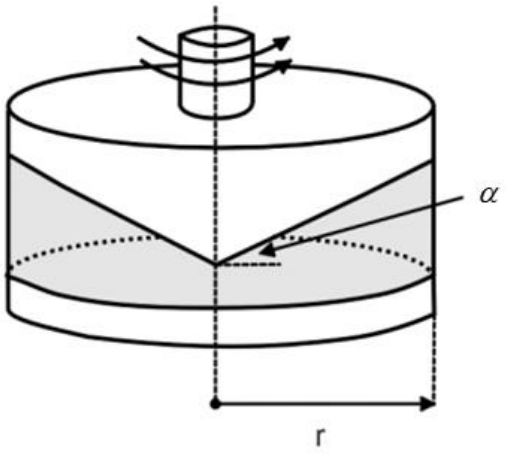
Deformační vztah pro Maxwellův model je $\gamma = \frac{\sigma}{\eta} + \frac{\dot{\sigma}}{G}$, po úpravě dostaneme $\sigma + \tau\dot{\sigma} = \eta\dot{\gamma}$, kde $\tau = \eta / G$ je relaxační čas. Takže například charakteristický relaxační čas pro Maxwellovy kapaliny je poměr viskozity a modulu pružnosti ve smyku [39].

2.5.4 Rotační reometry

Vzorek je podrobován smyku mezi dvěma definovanými plochami, z nichž jedna vykonává otáčivý pohyb a při různých rychlostech otáčení se vyhodnocuje odpor vzorku. Typem rotačního reometru používaného při experimentální části je kužel–deska (průměr 40 mm, úhel 2 °) (obr. 15). Tato geometrie je vhodná pro neplněné kapaliny, taveniny nebo disperze (suspenze a emulze) s malými částicemi. Měřená kapalina se dává do úzké štěrbiny mezi dvě plochy. Horní geometrie pak může vykonávat točivý pohyb či oscilační pohyb žádanou úhlovou rychlostí ω. Použitá dolní deska byla vyhřívaná (Peltier).

Vztah mezi smykovým napětím σ a momentem síly M je pro uspořádání kužel–deska s poloměrem podstavy kužele R dán rovnicí $\sigma = 3M / 2\pi R^3$ a pro gradient rychlosti platí $\dot{\gamma} = \omega / \alpha$, α je úhel štěrbiny v radiánech. Tokovou rovnici nenewtonských kapalin lze tedy tímto viskozimetrem určovat přímo z naměřených závislostí momentu síly na úhlové rychlosti [36]. Platí:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} = \frac{3M \cdot \alpha}{2\pi \cdot R \cdot \omega^3} = K\frac{M}{\omega}$$



Obr. 15: Schéma reometru kužel-deska [37]

2.5.4.1 Oscilační měření

Při oscilačních testech na materiál aplikujeme dynamické napětí, které má sinusový průběh. U těchto testů je definována buď amplituda napětí, nebo deformace a frekvence namáhání. Oscilační měření musí probíhat v lineární visko-elastické oblasti (LVO). Měření lineárních visko-elastických vlastností pomáhá přemostit vztah mezi molekulární strukturou a vlastnostmi materiálu. Pokud na materiál působíme malou deformací nebo ji aplikujeme dostatečně pomalu, tak je molekulární uspořádání blízko rovnováze. Mechanická odezva je pak odrazem dynamických procesů na molekulární úrovní, které jsou i v rovnováze. Velikost napětí a deformace jsou spojeny lineárně a chování kapalin je kompletně popsáno funkcí času [38, 41].

Napěťové/deformační namáhání

Při tomto typu oscilačního testu se amplituda při namáhání zvyšuje, frekvence a teplota jsou konstantní. Díky deformačnímu měření můžeme určit LVO. Obecně platí, že pevné materiály mají LVO nejkratší. Předpoklad pro toto měření je, že máme stabilní vzorek, jinak je nutné provést časové namáhání vzorku.

Časové namáhání

V průběhu tohoto testu je konstantní frekvence, amplituda a teplota. Z výsledků měření můžeme usuzovat, zda-li je zkoumaný materiál stabilní. U kapalin a suspenzí můžeme pozorovat sušení a těkání nebo tixotropii a reopexii.

Frekvenční namáhání

Frekvenční oscilační měření probíhá za konstantní teploty a amplitudy, dochází k postupnému zvyšování frekvence namáhání. Při tomto testu by měl být testovaný vzorek stabilní a deformace se musí nacházet v LVO. Z výsledků měření můžeme určit nulovou smykovou viskozitu a elasticitu materiálu.

2.5.4.2 Tokové měření

Testy toku slouží k měření viskozity. Viskozita představuje odpor vůči toku, je synonymem pro vnitřní tření. Při testech toku dochází ke kontinuálnímu zvyšování napětí nebo rychlosti namáhání. Z viskozitní křivky můžeme určit, zdali se jedná o látku tixotropní nebo pseudoplastickou [38, 41].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité materiály

Destilovaná voda
1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)

3.1.1 Syntéza triblokového kopolymeru

Kopolymer PLGA−PEG−PLGA byl připravený Ing. Ivanou Chamradovou, Ph.D. Triblokový kopolymer s hmotnostním poměrem PLGA/PEG = 2,4 a s molárním poměrem PA/GA = 2,9; indexem polydisperzity (PDI) = 1,12; M_n = 6 400 g·mol^{-1}, M_w = 7 200 g·mol^{-1} byl syntetizován polymerací za otevření kruhu v dusíkové atmosféře. PEG byl zbaven vzdušné vlhkosti při teplotě 130 °C po dobu 3 hodin za použití vakua. Poté byl přidán monomer D,L-laktid a monomer glykolidu pod proudem dusíku. Katalyzátor (Sn(II)-2-ethylhexanoát) byl přidán do homogenní směsi roztavených monomerů a po dobu 3 hodin při teplotě 130 °C probíhala polymerace. Kopolymer byl přečištěn od nezreagovaných monomerů rozpuštěním ve studené ultračisté vodě, vysrážen v roztoku při 80 °C. Vysrážený polymer byl oddělen dekantací a proces čištění byl 3x opakován. Přečištěný kopolymer byl vysušen v lyofilizátoru do konstantní hmotnosti [42].

3.2 Použité zařízení a přístroje

Analytické váhy
Spektrometr JASCO V-730
DynaPro NanoStar (WYATT TECHNOLOGI)
Reometr AR G2 (TA Instruments)
Mikroskop FEI Tecnai G^2
Termoblok HLC (DITABIS AG)
Kapalinový chromatograf Agilent HPLC 1100 Series

4 SYMBOLY A ZKRATKY

TE	tkáňové inženýrství
CF	karbonová vlákna
PLA	polymer kyseliny mléčné, polylaktid
PMMA	polymethylmetarylát
PP	polypropylen
PE	polyethylen
PS	polystyren
PC	polykarbonát
PET	polyethylentereftalát
PGA	polymer kyseliny glykolové, polyglykolid
PEG	polyetylenglykol
PLGA	kopolymer PLA a PGA
PCL	polykaprolakton
EDAB	euceryl dimethyl amidopropyl
SAFIN	vláknitá síť vytvořená samouspořádáváním gelátorů
PVC	polyvinylchlorid
LDPE	nízkohustotní polyethylen
HDPE	vysokohustotní polyethylen
PA	polyamid
PU	polyuretan
LA	kyselina mléčná
GA	kyselina glykolová
PEO	polyethylenoxid
PEP	p-ethylenfenol
CTAB	cetyl (C_{16}) trimethylamoniumbromid
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv
TP5	pentapeptit
PAL	povrchově aktivní látka
KMK	kritická micelární koncentrace
MD	molekulární dynamika (počítačová simulace)
LCST	spodní kritická teplota roztoku
UCST	horní kritickou rozpouštěcí teplotu
NaSCN	thiokyanatan sodný
THP	tetrahydrofuran
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
De	Debořino číslo
M_n	početně střední molekulová hmotnost
M_w	hmotnostně střední molekulová hmotnost
t_{br}	breaking time
τ	relaxační čas
T_{gel}	teplota, při které dochází k sol-gel přechodu
T_m	teplota tání

T_g	teplota skelného přechodu
S	entropie
T	teplota
t	čas
H	entalpie
G	Gibbsova volná energie
Δ	změna
G^*	komplexní modul
G´	elastický modul
G´´	ztrátový modul
η	dynamická viskozita
$\dot{\gamma}$	gradient rychlosti
du	vzájemná rychlost pohybu smykových rovin
A	plocha
u_0	rychlost
$\vec{F}$	smyková síla
δ	fázový posun
ω	úhlová rychlost
α	úhel
φ	fluidita
ν	kinematická viskozita
ρ	hustota
M	moment síly
K, n	empirické látkové parametry
-OH	hydroxylová funkční skupina
-CONH	amidová funkční skupina
$-CONH_2$	primární amidová funkční skupina
$-SO_3H$	sulfonová funkční skupina
GPC	gelová permeační chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
DP	číselně střední stupeň polymerace
ΔH_m	entalpie tání
T_c	teplotu studené krystalizace
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
IČ	infračervená spektrometrie
DLS	dynamický rozptyl světla
Kryo-TEM	kryogenní transmisní elektronová mikroskopie
UV-VIS	ultrafialová a viditelná spektrometrie
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
SANS	maloúhlový rozptyl neutronů

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] RAGHAVAN, Srinivasa R. a Jack F. DOUGLAS. The conundrum of gel formation by molecular nanofibers, wormlike micelles, and filamentous proteins: gelation without cross-links? *Soft Matter* [online]. 2012, **8**(33), 8539- [cit. 2017-02-19]. DOI: 10.1039/c2sm25107h. ISSN 1744-683x. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm25107h

[2] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* [online]. 2008, **49**(8), 1993-2007 [cit. 2017-02-19]. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027. ISSN 00323861. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386108000487

[3] KAMALY, Nazila, Basit YAMEEN, Jun WU a Omid C. FAROKHZAD. *Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release* [online]. [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00346. ISBN 10.1021/acs.chemrev.5b00346. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.5b00346

[4] HNÁTKOVÁ, Eva. *Využití biologicky rozložitelných polymerů pro konstrukční prvky v oblasti medicíny*. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Vladimír Sedlařík, Ph. D.

[5] MICHLOVSKÁ, L.: Functionalization of biodegradable polymers by itaconic anhydride. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2009. 59 p. Supervisor Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.

[6] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969

[7] JELÍNKOVÁ, Eva. *Polymerní systémy pro řízené uvolňování a cílenou dopravu léčiv*. Zlín, 2003. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Jakub Sedlák.

[8] SPERLING, L. H. *Introduction to physical polymer science*. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience, 2001, 671 s. ISBN 0471329215.

[9] RATNER, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* [online]. 3rd ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013 [cit. 2017-04-23]. ISBN 978-0-08-087780-8. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpBSAIMM06/cid:kt00BGC918/viewerType:pdf/root_slug:biomaterials-science?cid=kt00BGC918&page=11&b-q=hydrogels&sort_on=default&b-subscription=TRUE&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=oft%2C%20hydrogel%20cont&q=hydrogels

[10] NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, **32**(8-9), 762-798 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017. ISSN 00796700. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670007000664

[11] VAN BLITTERSWIJK a CLEMENS. *Tissue Engineering* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2013 [cit. 2017-04-23]. ISBN 978-0-08-055919-3. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpTE000025/viewerType:toc/root_slug:tissue-engineering/url_slug:kt00BJVII9?b-q=peg%20tissue&b-subscription=TRUE&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default

[12] *Journal of Controlled Release* [online]. 1999, **62**(1-2) [cit. 2017-04-23]. ISSN 01683659. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365999000279

[13] Polyethylenglykol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Polyethylenglykol

[14] BONACUCINA, Giulia, Marco CESPI, Giovanna MENCARELLI, Gianfabio GIORGIONI a Giovanni Filippo PALMIERI. Thermosensitive Self-Assembling Block Copolymers as Drug Delivery Systems. *Polymers* [online]. 2011, **3**(4), 779-811 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.3390/polym3020779. ISSN 2073-4360. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2073-4360/3/2/779/

[15] KHODAVERDI, Elham, Farnaz Sadat Mirzazadeh TEKIE, Seyed Ahmad MOHAJERI, Fariba GANJI, Gholamhossein ZOHURI a Farzin HADIZADEH. Preparation and Investigation of Sustained Drug Delivery Systems Using an Injectable, Thermosensitive, In Situ Forming Hydrogel Composed of PLGA–PEG–PLGA. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2012, **13**(2), 590-600 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1208/s12249-012-9781-8. ISSN 1530-9932. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1208/s12249-012-9781-8

[16] Úvod do chemie léčiv. In: *VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE* [online]. Praha, 2014 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: https://cv.vscht.cz/files/uzel/0000969/CHAZO-Uvod-do-chemie-leciv.pdf?redirected

[17] VINTILOIU, Anda a Jean-Christophe LEROUX. Organogels and their use in drug delivery — A review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008, **125**(3), 179-192 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.09.014. ISSN 01683659. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365907005391

[18] Co je co v povrchové a koloidní chemii. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/ebook.help.htm

[19] Polymerní gely. In: *NANO[STUDIJNÍ] MATERIÁLY* [online]. Liberec: Technická univerzita v Liberci [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/3021/mod_resource/content/0/4%20Polymern%C3%AD%20gely.pdf

[20] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 198 s. ISBN 807080422X.

[21] DJABOUROV, Madeleine, Katsuyoshi. NISHINARI a S. B. ROSS-MURPHY. *Physical gels from biological and synthetic polymers* [online]. [cit. 2017-02-19]. ISBN 978-052-1769-648. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpPGBSP003/cid:kt00C3UC98/viewerType:pdf/root_slug:physical-gels-from-biological?cid=kt00C3UC98&page=1&b-q=polymer%20gels&sort_on=default&b-subscription=TRUE&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=polymer%20gels&b-toc-

cid=kpPGBSP003&b-toc-root-slug=physical-gels-from-biological&b-toc-url-slug=introduction&b-toc-title=Physical%20Gels%20from%20Biological%20and%20Synthetic%20Polymers

[22] M. E. Cates and S. J. Candau, Statics and dynamics of worm-like surfactant micelles, *J. Phys.: Condens. Matter*, 1990, 2, 6869-6892.

[23] Rheology and Structure of Wormlike Micelles, L. M. Walker, *Current Opinion in Coll. & Interface Science* **6**(5-6):451-456 (2001).

[24] D. M. Ryan, S. B. Anderson, F. T. Senguen, R. E. Youngman and B. L. Nilsson, Selfassembly and hydrogelation promoted by F(5)-phenylalanine, Soft Matter, 2010, 6, 475-479.

[25] R. Kumar, C. C. Kalur, L. Ziserman, D. Danino and S. R. Ranghavan, Wormlike micelles of a C22-tailed zwitterionic betaine surfactant: from viscoelastic solutions to elastic gels, Langmuir, 2007, 23, 12849-12856.

[26] J. Y. Xu, A. Palmer and D. Wirtz, Rheology and microrheology of semiflexible polymer solutions: actin filament networks, Macromolecules, 1998, 31, 6484-6492.

[27] PADDING, J. T., W. J. BRIELS, M. R. STUKAN a E. S. BOEK. *Review of multi-scale particulate simulation of the rheology of wormlike micellar fluids* [online]. [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1039/b911329k. ISBN 10.1039/b911329k. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=b911329k

[28] RAGHAVAN, Srinivasa R. Distinct Character of Surfactant Gels: A Smooth Progression from Micelles to Fibrillar Networks †. *Langmuir* [online]. 2009, **25**(15), 8382-8385 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1021/la901513w. ISSN 0743-7463. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la901513w

[29] GRUMEZESCU, Alexandru. *Engineering of nanobiomaterials: applications of nanobiomaterials* [online]. [cit. 2017-02-26]. ISBN 978-032-3415-323. https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpENAN0002/cid:kt010WTWX3/viewerType:pdf/root_slug:engineering-nanobiomaterials?cid=kt010WTWX3&page=18&b-q=thermosensitive%20gel&sort_on=default&b-subscription=TRUE&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=.3.5%20THERMOSENSITIVE%20NANO&q=thermosensitive%20gel

[30] SHAO, Pengyu, Bochu WANG, Yazhou WANG, Jun LI a Yiqiong ZHANG. The Application of Thermosensitive Nanocarriers in Controlled Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2011, **2011**, 1-12 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1155/2011/389640. ISSN 1687-4110. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/jnm/2011/389640/

[31] BAJPAI, A.K., Sandeep K. SHUKLA, Smitha BHANU a Sanjana KANKANE. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* [online]. 2008, **33**(11), 1088-1118 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005. ISSN 00796700. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670008000609

[32] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* [online]. 2008, **49**(8), 1993-2007 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027. ISSN 00323861. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386108000487

[33] JELÍNKOVÁ, Eva. *Polymerní systémy pro řízené uvolňování a cílenou dopravu léčiv*. Zlín, 2003. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Jakub Sedlák.

[34] *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-x.
[35] Reologie. *Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i.* [online]. 2006 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: http://www.icpf.cas.cz/cs/reologie
[36] Základy reologie a reometrie kapalin. In: *Masarykova univerzita* [online]. 2007 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C4680/um/2457585/2457594/Reologie_a_reometrie_kapalin.pdf
[37] PICOUT, David R. a Simon B. ROSS-MURPHY. Rheology of Biopolymer Solutions and Gels. *The Scientific World JOURNAL* [online]. 2003, **3**, 105-121 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1100/tsw.2003.15. ISSN 1537-744x. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/tswj/2003/524215/abs/
[38] VOLDÁNOVÁ, M. Studium kinetiky samouspořádávacího procesu kolagenu I. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 105 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Josef Jančář, CSc..
[39] S. BANERJEE a A.K. TYAGI. *Functional materials preparation, processing and applications* [online]. London: Elsevier, 2012 [cit. 2017-04-25]. ISBN 978-012-3851-437. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpFMPPA00S/cid:kt009WYO36/viewerType:pdf/root_slug:functional-materials?cid=kt009WYO36&page=1&b-q=polymer%20gels&sort_on=default&b-subscription=TRUE&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=.5.6%20Polymer%20Gels&q=polymer%20gels
[40] WEITZ, D., WYSS, H., LARSEN, R. Oscillatory Rheology: Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials. Laboratory Journal. 2007, s. 68-70.
[41] TA Instruments. *Rheology: Theory and Applications Course*. 2008.
[42] CHAMRADOVÁ, I. Polymeric materials for controlled drug delivery and controlled release of active substances. Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Materials Science, 2015. p. 102, supervisor doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.
[43] HYUN, K., WILHELM, M., KLEIN, O.C., a spol. A review of nonlinear oscillatory shear tests: Analysis and application of large amplitude oscillatory shear (LAOS). Progress in Polymer Science. 2011, roč. 36, s. 1697-1753.
[44] VARADE, Dharmesh, Kousuke USHIYAMA, Lok Kumar SHRESTHA a Kenji ARAMAKI. *Wormlike micelles in Tween-80/CmEO3 mixed nonionic surfactant systems in aqueous media* [online]. [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.jcis.2007.02.090. ISBN 10.1016/j.jcis.2007.02.090. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979707002895