

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA CERGOL

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

L. Cergol: Sinteza kopolimerov D,L–laktida in trimetilenkarbonata ter izdelava mikro in nanodelcev

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA CERGOL

**SINTEZA KOPOLIMEROV D,L–LAKTIDA IN TRIMETILENKARBONATA TER
IZDELAVA MIKRO IN NANODELCEV**

**SYNTHESIS OF D,L–LACTIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE
COPOLYMERS AND FORMULATION OF MICRO AND NANOPARTICLES**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Aleša Obreze in asist. dr. Petre Kocbek.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Alešu Obrezi in somentorici asist. dr. Petri Kocbek za ves njun trud, ker sta si vedno vzela čas za pomoč pri raziskovalnem delu in strokovne diskusije kot tudi za podporo in vse spodbudne besede.

Na koncu pa bi se rad najlepše zahvalil svojim staršem za moralno podporo, saj sta mi ves čas študija stala ob strani, in prijateljem za vse lepe trenutke, ki smo jih tekom študija preživeli skupaj.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Aleša Obreze in somentorice asist. dr. Petre Kocbek.

POVZETEK

Biorazgradljivi polimeri se že vrsto let uporabljajo za izdelavo dostavnih sistemov in tudi za izdelavo kirurškega nitja in vsadkov za fiksacijo zlomov kosti ter usmerjanje rasti regenerirajočega se tkiva. Trenutno potekajo obsežne raziskave biorazgradljivih materialov, ki kažejo možnost uporabe na področju tkivnega inženirstva in za izdelavo sodobnih dostavnih sistemov, ki bi omogočali nadzorovano in ciljno sproščanje zdravilnih učinkovin ter s takšnim pristopom izboljšali kakovost zdravljenja. Biorazgradljivi polimeri se po vnosu v organizem v znanem časovnem obdobju razgradijo in preko naravnih poti izločijo iz telesa, torej predstavljajo ugodno zamenjavo za polimere, ki se v fiziološkem okolju ne razgradijo in se zato, zlasti po večkratni aplikaciji, kopičijo v organizmu, kar lahko privede do nastanka neželenih učinkov in zakasnele imunske reakcije. Ker potrebe po novih biorazgradljivih polimerih še vedno naraščajo, smo v diplomskem delu izvedli sintezo kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L–laktida, saj so le-ti obetavni kandidati na področju izdelave novih dostavnih sistemov. Sintetizirali smo osem kopolimerov z različnimi razmerji monomerov v polimerni verigi. Polimerizacijo smo izvajali 24 ur pri temperaturi 120 °C v prisotnosti katalizatorja kositrovega(II) 2–etilheksanoata v atmosferi argona. Sinteza je potekala s koordinativnim insercijskim mehanizmom z odpiranjem obroča. Predlagali smo tudi verjetni potek polimerizacije, kjer v prvi stopnji poteče aktivacija monomera trimetilenkarbonata, ki nato reagira z drugimi monomeri. Izkoristki sintez so znašali med 88 % in 99 %. Sintetizirane kopolimere smo strukturno ovrednotili z ¹H-NMR analizo in jim z diferencialno dinamično kalorimetrijo (DSC) določili termične lastnosti. Razpadnost kopolimerov v vodi smo spremljali v času treh mesecev pri temperaturi 37 °C. Z ¹H-NMR analizo smo določili razmerje monomerov v kopolimerih in ugotovili, da se dobro ujema s predvidenim; hkrati pa smo potrdili čistoto kopolimerov (odsotnost nezreagiranih monomerov) in uspešnost izvedene sinteze. Z DSC analizo smo ugotovili, da so kopolimeri amorfní in da temperatura steklastega prehoda narašča z deležem D,L–laktida v kopolimeru. *In vitro* razpadnost kopolimerov v vodi v času treh mesecev smo spremljali, da bi ugotovili hitrost razpada in vrsto erozijskega procesa. Ugotovili smo, da so kopolimeri z visokim deležem hidrofobnega trimetilenkarbonata v vodnem mediju zelo stabilni, zaradi minimalne dovzetnosti karbonatne vezi za hidrolizo in razpadajo s površinsko erozijo. Visoka vsebnost D,L–laktida v kopolimeru pospeši razpad. Ti kopolimeri se razgrajujemo s procesom globinske erozije. Iz sintetiziranih kopolimerov smo v zadnjem delu naloge izdelali polimerne mikro- in nanodelce. Mikrodelce smo

L. Cergol: Sinteza kopolimerov D,L–laktida in trimetilenkarbonata ter izdelava mikro in nanodelcev

izdelali z metodo elektrorazprševanja iz kopolimerov z deležem D,L–laktida med 68 % in 84 %. Nanodelce smo izdelali z metodo nanoprecipitacije iz 0,5 % in 2,5 % raztopine kopolimerov v acetonu, ki smo jo injicirali v disperzni medij (bidestilirana voda) brez stabilizatorja ali s stabilizatorjem (polivinilalkohol (Moviol™ 4-98), poloksamer 188 (Lutrol®F68)). Izdelani nanodelci so imeli povprečno velikost od 80 do 252 nm, polidisperzni indeks od 0,07 do 0,248, kar smo določili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo, in zeta potencial od – 13 do – 41 mV, kar smo določili z Dopplerjevo lasersko anemometrijo. Ugotovili smo, da so vse merjene lastnosti nanodelcev odvisne od koncentracije kopolimera v organskem topilu, razmerja monomerov v kopolimeru in prisotnosti oz. odstotnosti stabilizatorja v disperznem mediju. Biorazgradljivi kopolimeri na osnovi D,L–laktida in trimetilenkarbonata, ki smo jih sintetizirali in ovrednotili v diplomski nalogi, predstavljajo obetaven material na izdelavo sodobnih dostavnih sistemov za vnos učinkovin v organizem.

ABSTRACT

Biodegradable polymers are in use for several years for manufacturing drug delivery systems, medical sutures in surgery and implants for fixation of bone fractures or guiding growth of damaged tissue. Nowadays extensive research of biodegradable materials is taking place in the areas of tissue engineering and for manufacturing advanced delivery systems for controlled and targeted delivery of active substances, thereby enhancing the quality of treatment. After application of biodegradable polymers in human body they degrade after a known time, therefore presenting a better choice than polymers, which are stable and accumulate in physiological environment after multiple intake, which may lead to undesired side effects and late inflammatory reactions. Whereas the need for new biodegradable polymers still increases, we synthesised copolymers from trimethylene carbonate and D,L–lactide, since they represent a promising material for manufacturing advanced drug delivery systems. We synthesised eight copolymers with different monomeric ratios in polymer chain. Polymerization was carried out for 24 hours at 120 °C under argon using stannous octoate as a catalyst. Mechanistically the reaction should be described as ring-opening polymerization with coordination insertion. We also suggested a likely course of polymerization, whereby the first stage is activation of trimethylene carbonate, which may react with other monomeric species. The yields were in range between 88 % and 99 %. In further experimental work we evaluated structural and thermal properties of copolymers using ^1H – NMR technique and differential scanning calorimetry. Disintegration of copolymers in water was monitored for three months at 37 °C. With ^1H – NMR analysis we determined a molar ratio of monomers in polymer chain and found out that they fit well with the starting ratios of monomers. At the same time we confirmed purity of copolymers (absence of nonreacted monomers) and effectiveness of synthesis. The DSC analysis showed that the copolymers are amorphous and the glass transition temperature increases with the proportion of D,L–lactide in copolymers. We monitored *in vitro* degradation of copolymers in water during three months to determine decomposition rate and type of erosion process. Copolymers containing high proportion of hydrophobic monomer trimethylene carbonate are very stable in aqueous medium, because of minimum susceptibility of carbonate bond towards hydrolysis and they degrade with surface erosion. High levels of monomer D,L–lactide in copolymer accelerates the degradation and these copolymers decompose in the process of bulk erosion. In the last part of our work we prepared polymeric micro– and nanoparticles from synthesized polymers. Microparticles

were produced by electrospinning method from copolymers containing between 68 % and 84 % of D,L–lactide in polymer chain. We prepared nanoparticles by solvent displacement method from 0,5 % and 2,5 % copolymer solution in acetone, which was injected in dispersion medium (double – distilled water) with or without a stabilizer (polyvinyl alcohol (Moviol™ 4-98); poloxamer 188 (Lutrol® F68)). Manufactured nanoparticles had an average size of 80 nm to 252 nm, polydispersity from 0,07 to 0,248, which was determined by photon correlation spectroscopy and zeta potential between –13 and – 41 mV, which was determined by laser Doppler anemometry. We found that all measured properties of nanoparticles depend on the concentration of copolymer in an organic solvent, the molar ratio of monomers in polymer chain and the presence or absence of stabilizer in dispersion medium. The synthesized and evaluated copolymers based on D,L–lactide and trimethylene carbonate therefore represent a promising material for manufacturing advanced delivery systems for the introduction of active substances in organism.

VSEBINA

POVZETEK.....	3
ABSTRACT.....	5
SEZNAM OKRAJŠAV.....	8
1. UVOD.....	10
1.1. BIORAZGRADLJIVI POLIMERI.....	10
1.2. LASTNOSTI IN UPORABA BIORAZGRADLJIVIH MATERIALOV.....	11
1.3. POLIMERI V INŽENIRSTVU MEHKIH TKIV.....	13
1.4. BIORAZGRADLJIVOST POLIMEROV <i>IN VIVO</i>	16
1.5. NANODELCI IZ BIORAZGRADLJIVIH POLIMEROV KOT DOSTAVNI SISTEM.....	20
1.6. METODE IZDELOVANJA POLIMERNIH NANODELCEV.....	23
2. NAMEN DELA.....	28
3. METODE IN MATERIALI.....	29
3.1. REAGENTI IN TOPILA.....	29
3.2. LABORATORIJSKA OPREMA.....	29
3.3. REAKCIJA POLIMERIZACIJE TMC IN DLLA V KOPOLIMERE, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE KOPOLIMEROV.....	30
3.4. VREDNOTENJE KOPOLIMEROV Z ¹ H-NMR – SPEKTROSKOPIJO.....	31
3.5. SPREMLJANJE <i>IN VITRO</i> RAZPADA KOPOLIMEROV V TRIMESEČNEM ČASOVNEM OBDOBJU.....	31
3.6. VREDNOTENJE KOPOLIMEROV Z DSC ANALIZO.....	32
3.7. IZDELAVA NANODELCEV Z METODO DIFUZIJE TOPILA (NANOPRECIPITACIJA).....	33
3.8. MERJENJE VELIKOSTI IN ZETA POTENCIALA NANODELCEV.....	33
3.9. ELEKTROKOPRŠEVANJE RAZTOPINE KOPOLIMEROV V ACETONU.....	36
3.10. VREDNOTENJE VZORCEV ELEKTROKOPRŠEVANJA Z VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO (SEM).....	37
4. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	37
4.1. SINTEZA KOPOLIMEROV.....	37
4.2. DSC ANALIZA KOPOLIMEROV TMC – DLLA.....	41
4.3. <i>IN VITRO</i> RAZPADNOST KOPOLIMEROV TMC – DLLA.....	44
4.4. IZDELAVA NANODELCEV.....	49
4.5. MERJENJE VELIKOSTI NANODELCEV.....	49
4.6. MERJENJE ZETA POTENCIALA NANODELCEV.....	53
4.7. MORFOLOGIJA VZORCEV ELEKTROKOPRŠEVANJA.....	56
5. SKLEP.....	59
6. LITERATURA.....	61
7. PRILOGE.....	64

SEZNAM OKRAJŠAV

APC	antigen predstavitvene celice
TPP	cinkov tetrafenilporfolaktol
DSC	diferencialna dinamična kalorimetrija
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
IFN – γ	interferon - γ
IL – 2	interlevkin – 2
δ	kemijski premik (NMR spekter)
PGLA	kopolimer iz mlečne in glikolne kisline
DLLA – TMC	kopolimer iz trimetilenkarbonata in D,L–laktida
poli(mPEG – TMC)	kopolimer iz trimetilenkarbonata in monometoksi polietilenglikola
Sn(Oct) ₂	kositrov(II) 2–etilheksanoat
m	multiplet (NMR)
ND	nanodelec
NMR	jedrsko magnetna resonanca
PdI	polidisperzni indeks
PEO	polietilenoksid
PEG	polietilenglikol
PGA	polimer iz glikolne kisline
PLLA	polimer iz L-mlečne kisline
PDLA	polimer iz D,L-mlečne kisline
PVA	polivinilalkohol
P – 188	poloksamer 188
SCF	suprekritični fluid

ScCO ₂	superkritični ogljikov dioksid
T _m	temperatura tališča
T _g	temperatura steklastega prehoda
TMC	trimetilenkarbonat
VEGF – 1	vaskularni endotelijski rastni dejavnik – 1
I _δ	vrednost integrala pri kemijskem premiku (NMR spekter)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
ZU	zdravilna učinkovina

1. UVOD

1.1. BIORAZGRADLJIVI POLIMERI

Biorazgradljivi polimeri so v zadnjih dvajstih letih doživeli zelo velik razvoj in se danes v veliki meri uporabljajo na področju farmacije, klinične biomedicine in tkivnega inženirstva. Biorazgradljivi polimeri predstavljajo obetaven material v razvoju medicinskih pripomočkov, kot sočasne proteze, tridimenzionalne porozne strukture, ki služijo kot ogrodja v tkivnem inženirstvu in v razvoju sodobnih dostavnih sistemov za vnos nizkomolekularnih učinkovin in biomakromolekul. Takšni dostavni sistemi omogočajo stabilnost in kontrolirano ter podaljšano sproščanje vgrajenih učinkovin (1,2). Vsaka aplikacija zahteva specifične fizikalne, kemične in mehanske lastnosti polimerov, da dosežemo optimalne lastnosti sistema glede na namen uporabe. V ta namen se v zadnjih letih intenzivno raziskujejo številni novi naravni in sintezni biorazgradljivi polimeri.

Polimeri so makromolekule, ki so sestavljene iz ponavljajočih se enot monomerov, ki so med seboj povezane s kovalentnimi vezmi, verige polimera pa se med seboj povezujejo z vodikovimi in Van der Waalsovimi vezmi ter ionskimi oz. drugimi elektrostatskimi interakcijami. Reakcije sinteze polimerov, t.i. polimerizacije, v osnovi delimo v dve skupini: stopenjske (polikondenzacije) in verižne, slednje pa se po mehanizmu delijo na anionske, kationske, radikalske in koordinativne polimerizacije. Glede na izvor delimo polimere na naravne in sintezne (3). Naravni polimeri so v klinični uporabi že vrsto let in vključujejo polisaharide (npr. škrob, dekstran, alginat, hitosan, hialuronska kislina) in proteine (npr. kolagen, albumin, želatina, fibrin). Vedno večji poudarek pa je na razvoju sinteznih kopolimerov, ker imajo le-ti v splošnem več prednosti pred naravnimi (4):

- Sestavljajo jih monomeri z dobro definirano strukturo in lastnostmi;
- S spreminjanjem reakcijskih pogojev polimerizacije (katalizator, razmerje katalizator/polimer, temperatura, topilo, pH, uvajanje novih monomerov) lahko pripravimo materiale z želenimi lastnostmi glede na namen uporabe;
- Postopki izolacije in čiščenja so bolj enostavni kot pri naravnih polimerih
- Manjša imunogenost in posledično boljša biokompatibilnost;
- Bolj predvidljivi profili razgradnje *in vivo*, saj so naravni polimeri v večji meri podvrženi encimski razgradnji, kjer se količina posameznih encimov spreminja tako med posamezniki kot tkivi v telesu.

Med sintezniimi polimeri se najpogosteje uporabljajo poliestri, predvsem polimlečna in poliglikolna kislina. Vendar pa imajo ti polimeri nekatere pomanjkljivosti kot so relativna togost in krhkost, velik delež kristaliničnosti, slaba adhezija celic in prehitra razgradnja v biološkem okolju (5). Erozija, ki poteka po celotnem volumnu, sprošča kisle razpadne produkte razgradnje, ki lahko povzročijo zakasnelo vnetno reakcijo, kar je privedlo do razvoja številnih drugih sinteznih biorazgradljivih polimerov. Polikarbonati predstavljajo ugodno alternativo, saj se razgrajujejo s površinsko erozijo, razpadni produkti so manj kisli, amofnega značaja, hkrati pa imajo superiorne mehanske lastnosti, ki so primernejše za uporabo v tkivnem inženirstvu in kot dostavni sistemi za vnos farmakološko aktivnih učinkovin (6). Ravno tako se razvijajo druge skupine biorazgradljivih polimerov, kot so poliortoestri, polifosfazeni, poliuretani in poliureje ter polianhidridi, ki vsaka na svoj način zadovoljuje potrebe glede na namen uporabe. V klinični medicini se že uporabljajo različna kirurška nitja za zapiranje ran (Vicryl[®], Maxon[®]) in pripomočki za fiksacijo kosti npr. vijaki (Lactosorb[®], slika 1) in ploščice (slika 2), veliko raziskav pa se posveča razvoju sinteznih biorazgradljivih implantatov, ki začasno nadomeščajo npr. delovanje sklepov (gležnja, kolena, komolca), kožnim nadomestkom in tridimenzionalnim polimernim ogrodjem za regeneracijo mehkih tkiv npr. srca, perifernega živčevja, mehurja, jeter in ledvic (7).



Slika 1 in slika 2: Vijaki (levo) in ploščice (desno) iz biorazgradljivih polimerov PLA/PGA za fiksacijo kosti.

1.2. LASTNOSTI IN UPORABA BIORAZGRADLJIVIH MATERIALOV

Skupna lastnost vsem biorazgradljivim polimerom je, da v svoji verigi (glavni, stranski, prečnih povezavah) vsebujejo skupine, ki *in vivo* s kemijsko in/ali encimsko hidrolizo razpadejo na manjše fragmente, oligomere in monomere. Kemijska in encimska hidroliza

lahko potekata paralelno in neodvisno ena od druge. Po vnosu medicinskega pripomočka v organizem ne potrebujemo postoperativne kirurške odstranitve, saj pripomoček v določenem časovnem obdobju sam razpade, se preko bioloških poti metabolizira in izloči iz organizma. Z uporabo biorazgradljivega medicinskega pripomočka dodatno zmanjšamo verjetnost nastanka poškodbe, ki lahko nastane pri odstranitvi vsadka, s čimer močno izboljšamo complianco zdravljenja (8).

Pogoj za uporabo medicinskih implantatov in dostavnih sistemov za vnos učinkovin v organizem sta biokompatibilnost in ustrezna adhezija celic na mestu implantacije. Polimeri in njihovi produkti razpada morajo biti biokompatibilni z manjšno mero imunogenosti in ne smejo povzročati vnetnih reakcij, nekroze tkiva, alergičnih reakcij ali karcinogeneze (7). Posledično morajo biti vsi biomateriali najvišje stopnje čistote, material mora biti takšen, da ga lahko enostavno steriliziramo s konvencionalnimi metodami (γ -žarki, etilenoksidom) ter ne smejo vsebovati nečistot, ki se lahko med uporabo izlužijo (inicijatorji, stabilizatorji, emulgatorji, plastifikatorji, nezreagirani oligomeri in monomeri), kar privede do neželenih učinkov (7). Včasih se na mestu vnosa v telo pojavi akutno sterilno vnetje, ki je posledica načina aplikacije. Biorazgradljivi polimeri, ki so v stiku s krvjo, morajo biti hemokompatibilni, kar pomeni, da ne smejo vezati proteinov iz plazme in krvnih celic, kar bi privedlo do lokalnega strjevanja krvi in nastanka trombov na mestu uporabe. Pri izbiri ustreznega biokompatibilnega polimera so kritični parametri mehanske lastnosti polimera in časovni profil njegove razgradnje.

Uporaba biorazgradljivih polimerov bi za fiksacijo pri kostnih zlomih (koleno, kolk, stegenica) lahko nasledila materiale, kot so nerjaveče jeklo, zlitine kobalta in kroma, titanove zlitine in strukturne keramike, ki so trdnjše in bolj toge od kosti (9). Prav razlika v togosti je vzrok za neustreznost številnih implantatov. Togi implantati prenašajo pri normalni fiziološki aktivnosti npr. hoji, športni aktivnosti večji delež mehanske obremenitve kot kostno ogrodje, ki se obnavlja, pri čemer ščitijo kostno ogrodje in obdajajoče mišično tkivo pred normalno stresno obremenitvijo. Kot rezultat ščitenja pred stresom se mišično tkivo postopoma resorbira, adhezija med implantatom in mišičnim tkivom se zmanjša in implantat postane skozi daljše časovno obdobje ohlapen, kar vodi v dodaten kirurški poseg in odstranitev implantata z mesta uporabe (9). Polimerni materiali z razgradnjo izgubljajo mehansko trdnost, kar omogoča rast kosti, kjer se je prej nahajal implantat in tako postopno prenašajo breme preko implantanta na regenerirajočo se kostno

ogrodje. Ključnega pomena je, da polimerni matriks zagotavlja ustrezno mehansko podporo tkivu, predvsem v začetni fazi regeneracije, zagotoviti pa mora pritrditev, migracijo in razvoj oz. zorenje osteogenetskih celic, ki tvorijo kostnino. Pri razvoju umetnega kostnega ogrodja poskušamo čimbolje posnemati mehanske (natezna trdnost, Youngov modul, elongacija pri zlomu) in strukturne lastnosti spongiozne kosti (tabela I), ki jih gradijo gosta kolagenska vlakna z rdečim kostnim mozgom (10). Polimeri, ki se uporabljajo za fiksacijo so togi z veliko mehansko trdnostjo (40-500 MPa) in velikimi Youngovimi moduli ($\approx 1000-2000$ MPa). Nizek Youngov modul pomeni velik raztezek materiala pri določeni obremenitvi oz. sili v skladu s Hookovim zakonom, kar pri materialih, ki jih uporabljamo za fiksiranje obnavljajoče se kosti, ni zaželeno, saj s tem ne zagotovimo ustrezne mehanske podpore in zaščite regenerirajočemu tkivu. Biorazgradljivi materiali bi lahko imeli poleg osnovne fiksacijske funkcije tudi vlogo dostavnega sistema. Takšni kombinirani vsadki bi v poškodovano tkivo sproščali zdravilne učinkovine in rekombinantne rastne dejavnike npr. kostni morfogogenetski protein, trombocitni rastni dejavnik, transformirajoči rastni dejavnik- β , medtem ko se polimerno ogrodje razgrajuje, in s tem pristopom spodbujali rast kosti in celjenje zloma.

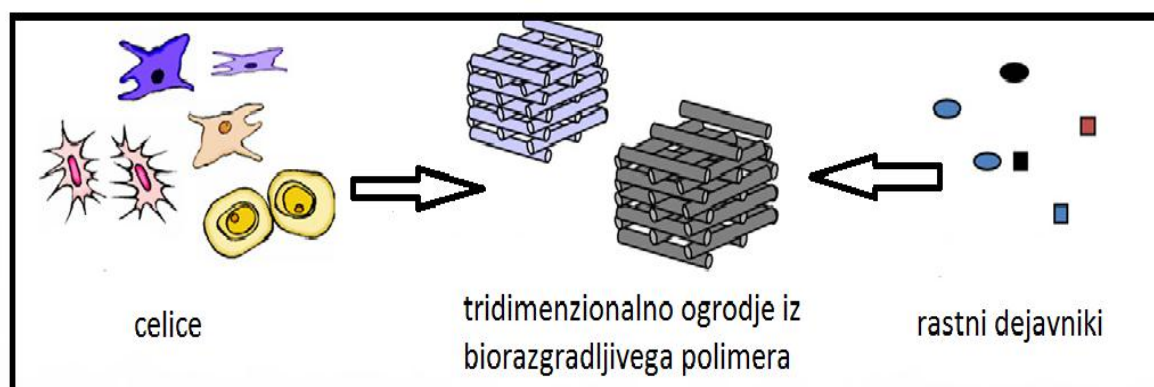
Tabela I: Mehanske lastnosti kostnega in vezivnega tkiva

Vrsta tkiva v organizmu	Natezna trdnost (MPa)	Youngov modul (MPa)
Spongiozna kost	7,4	20-500
Kortikalna kost	60-160	3.000-30.000
Hrustanec (sklep)	3,7-10	0,7-15,3
Ligamenti	13-46	65-541
Kita	24-112	143-2310

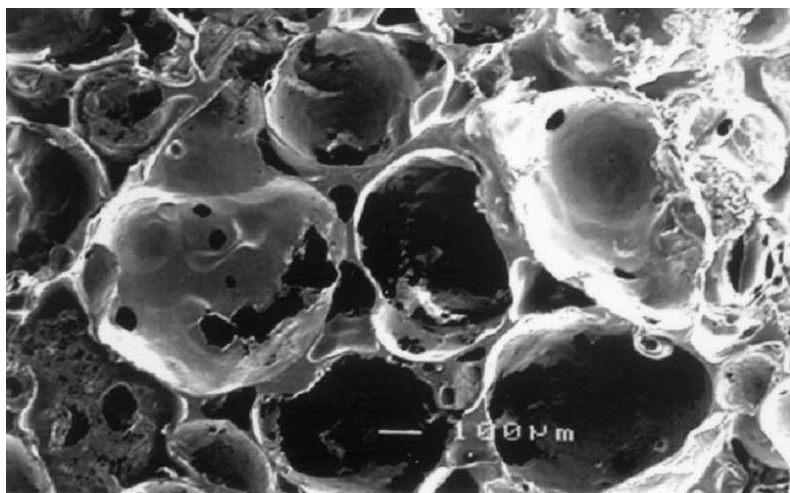
1.3. POLIMERI V INŽENIRSTVU MEHKIH TKIV

Izguba tkiva kot posledica fizične poškodbe ali bolezenskega stanja v organizmu predstavlja velik problem v klinični medicini. Transplantacija tkiv in organov je standardni postopek za zdravljenje takšnih stanj, vendar ta pristop zdravljenja omejuje število

ustreznih darovalcev. Ostali načini zdravljenja, ki so še na voljo, vključujejo kirurško rekonstrukcijo, uporabo zdravil, umetnih protez in drugih medicinskih pripomočkov, ki pa niso sposobni v zadostni meri nadomestiti funkcije izgubljenega ali obolelega tkiva. Osnovna ideja v tkivnem inženirstvu mehkih tkiv je transplantacija celic, ki jih dobimo z biopsijo vzorca tkiva in rasti dejavnikov v porozno biorazgradljivo polimerno ogrodje (slika 3) (11). Celice se v polimernem biorazgradljivem ogrodju razraščajo in tvorijo lastno zunajcelično okolje (medceličnino), medtem ko se polimerno ogrodje razgrajuje. Novo tkivo nastane bodisi znotraj bodisi zunaj telesa in bi naj bilo čimbolj podobno zdravemu tkivu ter naj s časom ne bi izgubljalo bioloških lastnosti. Tako se raziskujejo številni novi biorazgradljivi polimeri, v katere je možno vključiti celice in rekombinantne rastne dejavnike, ter metode, ki omogočajo preoblikovanje teh polimerov v porozna tridimenzionalna ogrodja. Načrtovanje in razvoj takšnih sistemov temelji na zagotavljanju ustrezne poroznosti polimernega ogrodja (slika 4), ki omogoča dosledno povezovanje med porami v skeletu, komunikacijo med celicami v novo nastajajočem zunajceličnem prostoru, primerno mehansko trdnost in ustrezne mikrolastnosti na površini skeleta ter zagotavlja pritrditev, razširjanje in razvoj vnešenih celic v polimernem ogrodju (11). Polimerno ogrodje mora imeti dovolj velik prosti volumen, ki omogoča razširjanje celic po celotnem ogrodju in nastanek homogenega tkiva ter ne sme vplivati na funkcijo razvitih celic.



Slika 3: Shematski prikaz transplantacije celic in rasti dejavnikov v porozno polimerno ogrodje z namenom tvorbe novonastajajočega tkiva.



Slika 4: SEM fotografija prečnega prereza poroznega ogrodja na osnovi biorazgradljivega polimera poli-L-laktida.

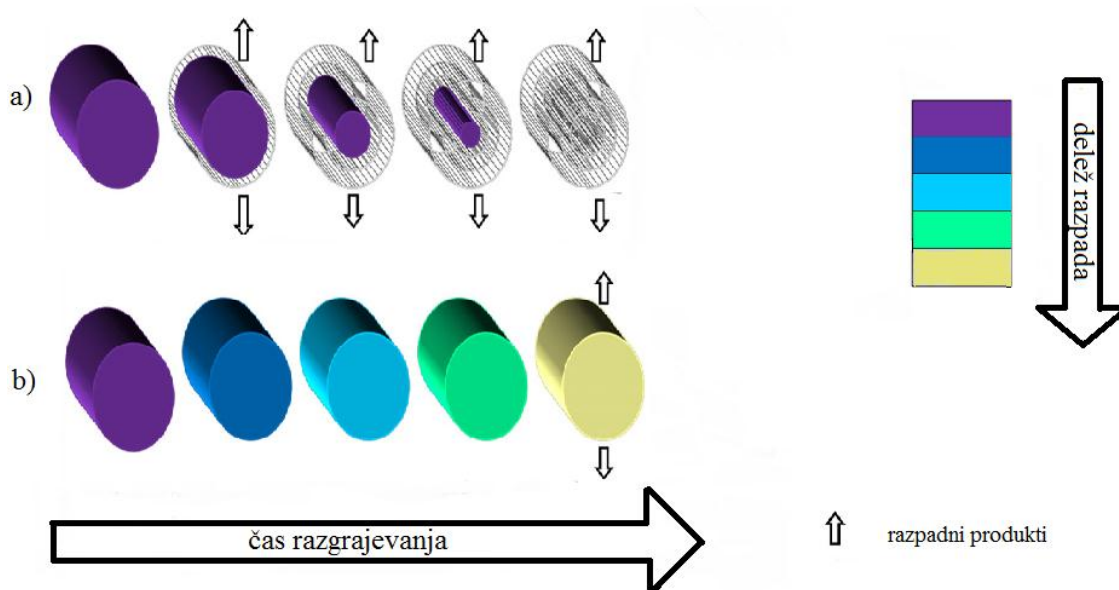
Kljub napredku na področju biomaterialov pa število polimerov za klinično uporabo še vedno ostaja omejeno. Materiali na osnovi PLA/PLG so relativno togi in krhki in imajo neustrezno kinetiko razpada za aplikacije, kot sta tkivno inženirstvo srca in priprava polimernih oblog, ki služijo kot umetni kožni nadomestki, kjer je potrebna dobra fleksibilnost materiala (12). Semikristalinični polimeri PLA/PGA lahko fragmentirajo pod nenehnimi mehanskimi obremenitvami, kar privede do nastanka večjih kristaliničnih fragmentov, ki lahko dražijo okoliško tkivo, zato v inženirstvu mehkih tkiv stremimo k uporabi amorfnih polimerov (13). Dodatno ti polimeri v končni fazah razpadnega procesa vežejo večje količine vode zaradi nastajanja prostih hidroksilnih in karboksilnih skupin, kar privede do nabrekanja polimera. Nabrekanje lahko povzroči kronično lokalno ishemijo živčevja, kar je vzrok za kronično bolečino dokler se implantat popolno ne resorbira. S tem namenom se danes razvijajo bolj hidrofobni amorfní kopolimeri laktida in TMC, ki izkazujejo boljše lastnosti za inženirstvo mehkih tkiv, zaradi večje fleksibilnosti, manjše lomljivosti, relativne odpornosti na konstanten mehanski stres ter manjšega nabrekanja v končni stopnji razgradnje. Kopolimeri DLLA-TMC predstavljajo ugodno alternativo poliuretanom, ki se uporabljajo kot material za umetne srčne zaklopke in kot obloga za kovinske razpornike pri balonski koronarni angioplastiki, vendar njihovo uporabo omejuje nastajanje relativno toksičnih razpadnih produktov. Semikristalinični fleksibilni kopolimeri TMC in ϵ -kaprolaktona, iz katerih enostavno izdelamo visoko porozna ogrodja, predstavljajo obetaven material v nevrokirurgiji za izdelavo umetnih živčnih vodil z

vključenimi Schwannovimi celicami, kadar medsebojno povezovanje živčnih pletežev zaradi obsežne lokalne poškodbe ni več mogoče (14).

1.4. BIORAZGRADLJIVOST POLIMEROV *IN VIVO*

Med najpomembnejše kriterije za uspešno uporabo biorazgradljivih polimerov za katerikoli namen v medicini, je poznavanje in razumevanje mehanizmov preko katerih se določen polimer razgrajuje/erodira in se v končni fazi resorbira z mesta aplikacije. Pretvorbo polimerov v vodotopne produkte najbolj opišemo s terminom bioerozija. Bioerozijski proces trdnega polimernega ogrodja je povezan z makroskopskimi spremembami v videzu implantata, fizikalno-mehanskimi spremembami in spremembami v fizikalnih procesih, kot so nabrekanje, deformacija in razpad strukture, izguba mase in končno izguba prvotne funkcije implantanta (15).

Razgradnja polimernega ogrodja je kemijski proces, kjer v prisotnosti molekul vode poteka hidrolitična cepitev skupin v glavni verigi polimera, stranskih verigah in/ali prečnih povezavah med polimernimi verigami. Erozijski procesi pa sodi med fizikalne procese in vključuje difuzijo vode, razpletanje in odplavljanje polimernih verig ter raztapljanje polimera. Glede na mehanizem delimo erozijo na površinsko in globinsko (slika 5) (15). Pet pomembnih dejavnikov vpliva na mesto, na katerem poteka erozija: stabilnost vezi, kristaliničnost, hidrofobnost polimera, lastnosti razgradnih produktov (topnost, kislost) in poroznost polimernega matriksa.



Slika 5: Površinska (a) in globinska (b) erozija polimernega ogrodja

Pri globinski eroziji je hitrost difuzije molekul vode večja od hitrosti razgradnje polimera v vodotopne produkte in poteka homogeno znotraj polimernega ogrodja. Kinetika globinske erozije je zelo kompleksna in nanjo vpliva zaradi prisotnosti vode poleg erozije tudi razgradnja samega polimera. Sprememba mase je sprva minimalna in v določeni časovni točki zelo hitro naraste. Ta fenomen pogojuje dejstvo, da poteka cepitev vezi v verigi polimera počasi, dokler se ne doseže neka kritična molekulska masa, kateri sledi naglo zmanjšanje polimerne mase, ki je posledica difuzije vodotopnih fragmentov iz notranjosti polimernega sistema. Za globinsko erozijo je značilno, da se zunanji volumen polimernega ogrodja dosti ne spreminja, povečuje pa se notranji prosti volumen. Pomanjkljivost polimernih ogrodij, ki so podvržena globinski eroziji, je, da se preko celotnega ogrodja tvorijo reže in razpoke, ki so lahko vzrok za nenadzorovane fragmentacije ogrodja. Večina polimerov, iz katerih izdelujemo medicinske pripomočke za fiksacijo kostnih zlomov in sodobne dostavne sisteme za vnos učinkovin v organizem, je podvržena globinski eroziji. Takšni medicinski pripomočki za fiksacijo zlomov lahko nenadzorovano fragmentirajo, kar vodi v izgubo mehanske trdnosti implantata in neučinkovito oporo regenerirajočemu kostnemu tkivu, dostavni sistemi pa zagotavljajo manjšo zaščito učinkovinam in ne omogočajo ohranjanja konstantnih plazemskih profilov. Razgradnja učinkovine lahko poteče že znotraj polimernega ogrodja, kar ima za posledico manjšo terapevtsko učinkovitost dostavnega sistema.

V nasprotju z globinsko erozijo je pri površinski eroziji hitrost difuzije molekul vode manjša od hitrosti erozije. Zatorej je erozijski proces omejen na površino ogrodja, ki bo čez čas postajalo vse manjše tj. prostornina ogrodja se bo manjšala, razmerje med maso in volumnom pa bo ostalo konstantno, prav tako se bo ohranila integriteta strukture implantata. Izguba mase je postopna in skoraj linearna v proučevanem časovnem intervalu. Kinetika površinske erozije je bolj predvidljiva, saj je njena hitrost sorazmerna površini implantata oz. dostavnega sistema. Z izdelavo dostavnih sistemov iz polimerov, ki se razgrajujejo s površinsko erozijo, je omogočena večja zaščita učinkovine v ogrodju in kinetika nulte reda sproščanja učinkovine. Med takšne polimere sodijo, poliortoestri, polifosfati in polianhidridi, kjer so v hidrofobni verigi prisotne skupine, ki so zelo občutljive za hidrolizo.

Biorazgradljivi polimeri se lahko razgrajujejo *in vivo* tudi z oksidacijo in pod vplivom svetlobe (fotoliza). Skoraj vsi trenutno dostopni implantati oz. dostavni sistemi se v

največji meri razgrajujejo zaradi hidrolitične cepitve vezi v glavni verigi polimera. Ključni dejavniki, ki vplivajo na hitrost razgrajevanja so (15):

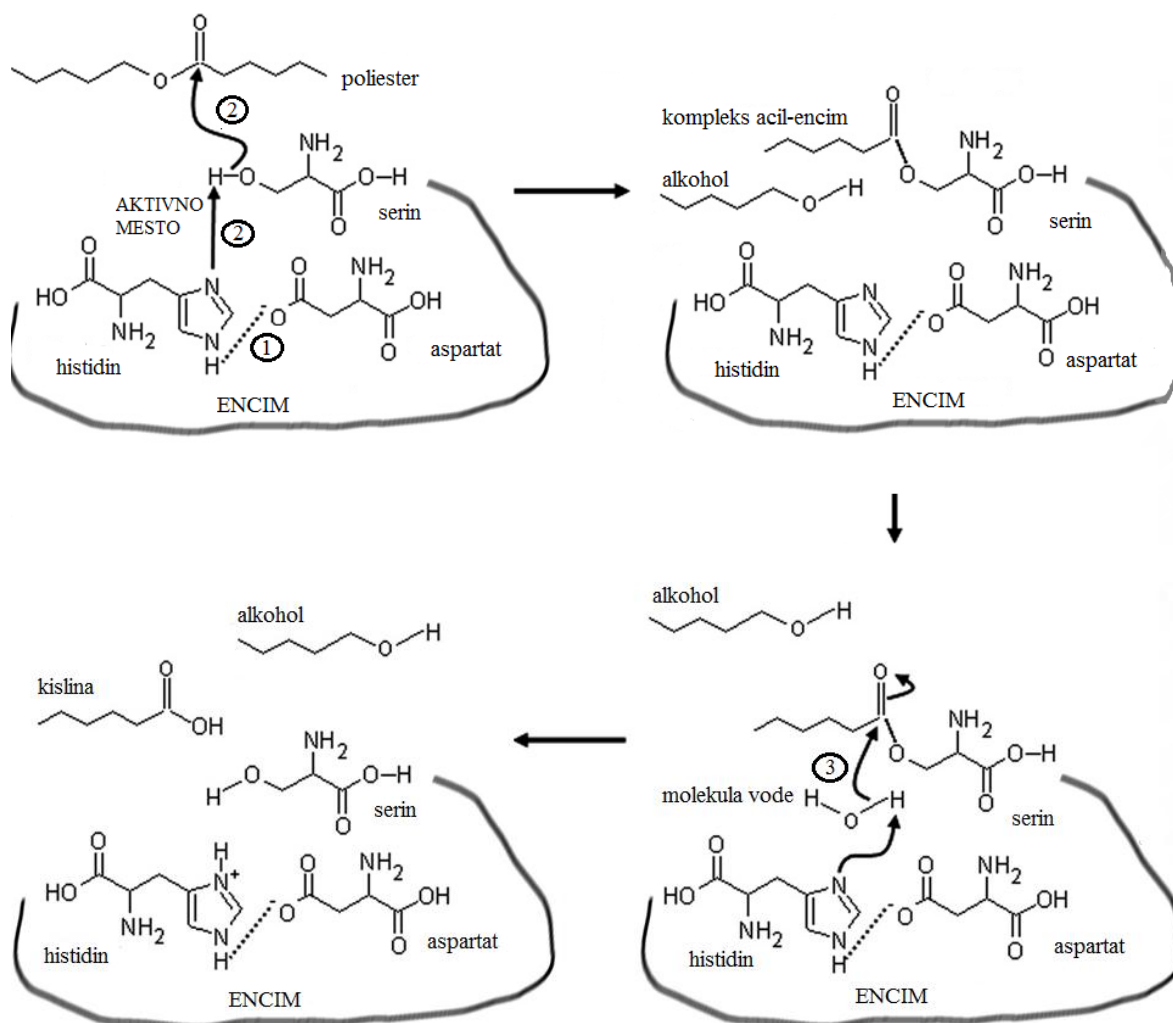
- Kemična stabilnost hidrolitično reaktivnih skupin v glavni verigi polimera
- Hidrofilnost/hidrofobnost monomerov v polimerni verigi
- Molekulska masa polimera
- Proces proizvodnje in geometrija polimernega ogrodja
- Morfološke lastnosti polimera

Dovzetnost reaktivnih skupin za proces hidrolize v verigi polimera je poglavit parameter, ki vpliva na hitrost procesa hidrolize. V splošnem je znano, da anhidridna vez hitreje hidrolizira kot esterska, esterska pa hitreje kot amidna, torej bo hidroliza polianhidridov hitrejša kot hidroliza poliestrov ali poliamidov (15). Dejanske hitrosti procesa hidrolize ne moremo napovedovati le na podlagi labilnih skupin v polimerni verigi, saj je pomembna tudi prepustnost polimernega ogrodja za molekule vode. Le-ta je odvisna od hidrofilne oziroma hidrofobne narave monomerov v polimeru in ima ključen vpliv na hitrost hidrolize. Hidrofobne molekule imajo manjšo težnjo za vezavo molekul vode, saj ne tvorijo vodikovih vezi. Tako lahko z zamenjavo bolj hidrofilne sebainske kisline z bolj hidrofobnim bis(karboksifenoksi)propanom za kar trikrat upočasnimo hidrolizo polianhidrida, čeprav je kemična reaktivnost anhidridne vezi za hidrolizo v obeh primerih zelo podobna (16). Na hitrost hidrolize polimera vplivajo tudi skupine, ki sterično ovirajo dostop molekul vode do hidrolitičnih skupin v verigi polimera npr. metilne, fenilne skupine. Denimo polilaktid in aromatski polianhidridi hidrolizirajo počasneje kot poliglikolid in alifatski anhidridi, zaradi prisotnih metilnih skupin v polilaktidu in fenilnih skupin v aromatskih polianhidridih, ki ovirajo penetracijo vode do esterske in anhidridne vezi (17, 18). Molekulska masa polimera oz. dolžina polimerne verige prav tako vpliva na razgradnjo polimera. Večja kot je molekulska masa polimera, daljše so polimerne verige. Dolge polimerne verige tvorijo med seboj večje število interakcij, kar zmanjša razdaljo med njimi in tako preprečuje dostop molekul vode do labilnih vezi v polimeru. Nadalje vplivata na potek hidrolize tudi morfološki lastnosti polimera, kot sta semikristaliničnost in amorfnost. Polimerne verige so v kristaliničnem področju gosto naložene in urejene ena ob drugo, kar preprečuje prodiranje molekulam vode. Posledično poteče najprej hidroliza amorfnih področij in površinska hidroliza kristaliničnih področij, delež kristaliničnosti polimera pa se med potekom erozije postopno povečuje. Ta vpliv je posebno pomemben

pri polimerih z veliko stopnjo kristaliničnosti kot sta PLLA (37%) in PGA (45-55%). Dober primer vpliva morfologije polimera na hitrost hidrolize sta PLLA in PDLA. Oba polimera imata enako kemično zgradbo verige in enak delež hidrofobnih skupin, vendar ima stereoregularen (izotaktičen) in semikristaliničen polimer PLLA čas razpadnosti (12-18 mesecev) kot racemen in amorfen PDLA (11-15 mesecev) (15). Prav tako je za amorfne polimere pomembna temperatura steklastega prehoda (T_g). Polimeri, ki imajo T_g pod telesno temperaturo (T_t), so v *in vivo* okolju v zmečkanem stanju, kjer so polimerne verige zaradi manjšega števila vodikovih vezi, interakcij dipol-dipol in Van der Wallsovih vezi med molekulami polimera bolj gibljive, z večjo možnostjo rotacij in omogočajo molekulam vode lažji dostop, kar ima za posledico hitrejšo hidrolizo. Predvsem pa je temperatura steklastega prehoda pomembna za polimere, ki imajo T_g malo nad 37°C , saj lahko voda deluje kot mehčalo in zniža T_g pod telesno temperaturo, kar povzroči prehod polimera iz steklastega v zmeččano stanje. Posledično se spremeni profil razpada takšnega polimera. Geometrija polimernega ogrodja, predvsem razmerje med površino in volumnom, tudi vpliva na njegovo razgradnjo. Večje razmerje med površino in volumnom pomeni večjo površino polimernega ogrodja, ki je v stiku z molekulami vode, kar vodi v hitrejšo difuzijo vode v polimerno ogrodje, torej hidroliza nastopi hitreje in poteka hitreje.

Razgradnja polimerov poteka *in vivo* tudi z encimsko hidrolizo, ki ima večji pomen pri hidrolizi naravnih polimerov (19). Encimi so biomakromolekule, ki zaradi velike molekulske mase ne morejo prodirati v polimerno ogrodje, torej hidroliza poteka na površini le-tega. Omenili smo že, da lahko kemijska in encimska razgradnja polimerov potekata vzporedno in neodvisno ena od druge. V začetnih stopnjah prevladuje kemijska hidroliza polimernega ogrodja. Postopna fragmentacija in izguba integritete strukture polimernega ogrodja poveča njegovo površino in olajša dostop encimskim makromolekulam do verig polimera, kar vodi v hitrejšo encimsko razgradnjo v končnih stopnjah razpada. Encimska razgradnja sinteznih polimerov je opazna pri določenih alifatskih poliestrih, poliamidih, polikarbonatih in poli(ester uretanih). Predstavili jo bomo na primeru alifatskega poliestra. Hidroliza polimera poteka v aktivnem mestu hidrolaz s pomočjo treh aminokislinskih preostankov tj. katalitične triade: aspartata, histidina in serina (slika 6) (19). V prvi stopnji aspartat tvori vodikovo vez z obročem histidina. Bazična aminokislina histidin v drugi stopnji odcepi vodikov atom γ -hidroksilne skupine serina. Tvori se alkoksidna skupina, ki izvede nukleofilni napad na elektrofilni ogljik

estrskes skupne, kar vodi v nastanek acil-encimskega kompleksa. V zadnji stopnji molekula vode odcepi acilno skupino z encima, pri čemer nastane prosta karboksilna skupina polimera, encimska molekula pa se regenerira in lahko vstopa v reakcijo s preostalimi estrskimi skupinami v verigi polimera.

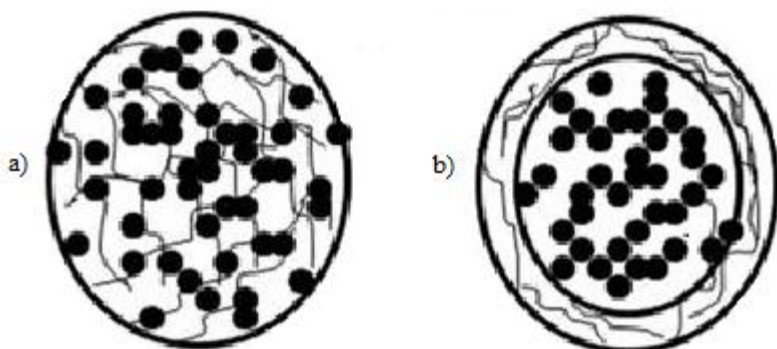


Slika 6: Encimska razgradnja poliestrov v katalitičnem mestu hidrolaz preko treh aminokislin oz. katalitične triade: aspartata, histidina in serina

1.5. NANODELCI IZ BIORAZGRADLJIVIH POLIMEROV KOT DOSTAVNI SISTEM

Polimerni nanodelci so polimerni delci koloidne velikosti (10 do 1000 nm). Zdravilna učinkovina (ZU) je v njih raztopljena, suspendirana ali adsorbirana na njihovo površino. S spreminjanjem parametrov proizvodnje, fizikalno-kemijskih lastnosti ZU ter narave nosilnega polimera lahko izdelamo dve po zgradbi različni vrsti nanodelcev (slika 7)

- nanosfere, ki imajo učinkovino razporejeno po celotnem ogrodju in
- nanokapsule, ki imajo rezervoar učinkovine, ki ga obdaja polimerna ovojnica (20).



Slika 7: Polimerni nanodelci: nanosfere (a) in nanokapsule (b).

Z vključitvijo ZU v nanodelec le-to zaščitimo pred vplivi okolja, lahko povečamo obseg absorpcije preko mukoznih barrier v organizmu ter posledično povečamo njeno biološko uporabnost, z vključitvijo hidrofilnih učinkovin v polimerni nanodelec pa lahko pospešimo hitrost njihovega prehajanja čez lipofilne bariere v organizmu. Med sintezni biorazgradljivimi polimeri se za izdelavo dostavnih sistemov največ uporabljajo naslednji polimeri: polilaktid in poliglikolid ter njuni kopolimeri, v manjši meri pa tudi poli-ε-kaprolakton.

Izsledki predkliničnih in kliničnih raziskav predstavljajo polimerne nanodelce kot učinkovit sodoben dostavni sistem, ki omogoča nadzorovano sproščanje ter ciljno dostavo zdravilnih učinkovin. Koncept nadzorovanega sproščanja je ključnega pomena pri vnosu učinkovin z nizkim terapevtskim indeksom, kjer se zahteva konstantna plazemska koncentracija v ozkem območju med terapevtskim in letalnim odmerkom. Površino nanodelca lahko funkcionaliziramo z vezavo različnih hidrofilnih polimerov (PEO, PEG), kar nanodelcem omogoča, da se izognejo prepoznavi celicam retikuloendotelijskega imunskega sistema in se posledično daljši čas zadržijo v krvnem obtoku, da lahko dosežejo tarčno mesto (21). Vezava bioloških makromolekul na površino nanodelcev, kot so imunoglobulini G in aptameri, omogoča nanodelcem prepoznavo specifičnih površinskih struktur (npr. transmembranskih proteinov) na določenem tipu celic in posledično ciljno dostavo zdravilnih učinkovin (angl. »magic bullets«). Takšen pristop zdravljenja je ključnega pomena pri vnašanju citostatikov in genski terapiji, kjer želimo minimalne učinke ZU na zdrava tkiva po sistemskem vnosu ZU v organizem in maksimalen učinek na

tumorske celice. Dokazano je, da polimerni nanodelci s citostatiki učinkovito prehajajo skozi endotelij žilja tumorjev. Nanokapsule iz poli-DLLA so učinkovit sistem za vnos paklitaksela v cerebrospinalno tekočino pri zdravljenju glioma. Na tak način dosežemo podaljšano sproščanje učinkovine (do 20) dni ter višjo koncentracijo (10-20 $\mu\text{g/mL}$) v citoplazmi malignih celic, s čimer izboljšamo učinkovitost zdravljenja (22). Kopolimer mlečne in glikolne kisline (PGLA) se uporablja tudi za izdelavo nanodelcev, ki vsebujejo vgrajeno fotoobčutljivo učinkovino cinkov tetrafenilpofrolaktol (TPP) za fotodinamično terapijo kožnega raka, glioma, raka dojke in pljučnega raka (23). Rezultati raziskav na malignih celičnih kulturah in glodalcih kažejo popolno uničenje tumorskega tkiva. Fotodinamična terapija omogoča aktivacijo TPP z obsevanjem z vidno svetlobo specifične valovne dolžine, pri čemer nastajajo reaktivne kisikove zvrsti, ki selektivno uničijo maligne celice. Selektivnost je posledica dejstva, da se TPP dalj časa zadržuje v malignih celicah (24-36 ur) kot v zdravem tkivu, zato lokalno maligno tvorbo obsevamo po 24 urah glede na vnos v organizem. V raziskavah razvijajo nanokapsule iz blokkopolimera poliTMC-PEG-poliTMC, ki naj bi predstavljali obetaven sistem za vnos citostatika metotreksata in nanosfere iz blokkopolimera poli(mPEG-TMC), ki omogočajo vnos in nadzorovano sproščanje glukokortikoida deksametazona (24, 25). Zvezdast kopolimer TMC-DLLA prečnopremrežen s ω,ω,ω -triakrilatom se uporablja za izdelavo nanodelcev z vgrajenimi proteini kot so VEGF-1, IL-2 in IFN- γ . Polimerni nanodelci so ustrezen sistem tudi za uporabo v diagnostične namene npr. slikanja z magnetno resonanco. Blokkopolimera poli(mPEG-DLLA) in PGLA se uporabljata za oblaganje nanokapsul, ki vsebujejo anorgansko jedro iz superparamagnetnih materialov in služijo kot kontrastno sredstvo v preiskavah magnetne resonace, kjer se ugotavlja terapevtska učinkovitost citostatikov za zaviranje razraščanja metastazirajočih malignih tvorbo (26).

Polimerni nanodelci niso najprimernejši dostavni sistem, ki bi omogočal lokalno podaljšano sproščanje učinkovine na mestu vnosa v organizem. Majhna velikost nanodelcem onemogoča zadrževanje na mestu vnosa zaradi neoviranega prehajanja skozi endotelij žilja in prehajanja v sistemski krvi obtok (27). Kadar želimo doseči podaljšano sproščanje učinkovine iz depo sistema, predstavljajo ugodno zamenjavo nanodelcem polimerni mikrodenci (1-1000 μm), ki imajo večjo težnjo ostati na mestu vnosa v organizem npr. po podkožni, intramuskularni, pljučni aplikaciji. Izsledki predkliničnih raziskav kažejo podaljšano sproščanje anestetikov in nesteroidnih antirevmatikov iz

mikrodelcev po intramuskularnem vnosu skozi obdobje več tednov v primerjavi s polimernimi nanodelci (< 30 ur), kar lahko s pridom izkoristimo za simptomatsko zdravljenje bolnikov s kronično bolečino (27). Dolgotrajnejši učinek zdravilne učinkovine v polimernih mikrodelcih dodatno dosežemo zaradi manjšega takojšnjega sproščanja (»burst release«) le-te iz dostavnega sistema, kar je posledica manjše specifične površine polimernih mikrodelcev v primerjavi z nanodelci. S farmacevtskega stališča so zanimivi mikrodelci z velikostjo manjšo od 100 μm . Tašna velikost mikrodelcev omogoča intravenski vnos, vendar določene raziskave nakazujejo na možnost nastanka pljučne embolije z eksudacijo proteinov zaradi mašenja pljučnih kapilar, kar lahko vodi v nastanek pljučne hipertenzije. Velikost polimernih mikrodelcev močno vpliva na njihov način vnosa v organizem. Polimerni mikrodelci ne prodirajo skozi celične membrane, ampak se zdravilna učinkovina sprošča s postopnim razgrajevanjem polimernega ogrodja oz. z difuzijo, torej ti dostavni sistemi omogočajo manjšo zaščito učinkovine pred vplivi okolja v primerjavi z nanodelci. Polimerne mikrodelce prevzemajo samo specializirane celice, ki so sposobne fagocitoze (npr. monociti, makrofagi, APC), kadar je njihova velikost manjša od 10 μm (27). Takšni dostavni sistemi bi torej omogočili dostavo antigena le do fagocitirajočih celic, s čimer bi izboljšali učinek imunskega odziva zaradi manjšega volumna porazdelitve antigena po ostalih tkivih v organizmu. Polimerni mikrodelci manjši od 5 μm kažejo možnost uporabe za lokalno dostavo in podaljšano sproščanje bronhodilatatorjev (npr. β_2 -adrenergičnih agonistov), mukolitikov, protivnetnih, baktericidnih (npr. pentamidina) in protivirusnih učinkovin v spodnje dihalne poti do pljučnih alveolov, medtem ko polimernih nanodelcev ne moremo uporabiti v obliki praškov za inhalacijo, saj se z izdihanim zrakom v trenutku odstranijo iz organizma (28). Z upočasnjem sproščanjem iz mikrodelcev zmanjšamo »burst release« in hitrost sistemske absorpcije učinkovine preko pljučnih kapilar in verjetnost nastanka neželenih učinkov povezanih s takšnimi učinkovinami.

1.6. METODE IZDELOVANJA POLIMERNIH NANODELCEV

Težavo pri izdelovanju nanodelcev predstavlja obvladovanje neugodnega termodinamskega stanja, ki je posledica zmanjšanja velikosti delcev. Zaradi nanometriške velikosti delcev naraste prosta Gibbsova energija sistema, ki je merilo za spontanost procesa. Za stabilizacijo disperzij nanodelcev uporabljamo dva splošna pristopa, s pomočjo katerih kompenziramo naraslo Gibbsovo prosto energijo: kinetični in termodinamski

pristop. Termodinamsko stabilnost sistema dosežemo z dodajanjem površinsko aktivnih snovi, ki se razporedijo na medfazi trdno/tekoče in znižajo medfazno napetost oz. energijo sistema, medtem ko pri kinetičnem pristopu stabilizacije uporabljamo ionske in sterične stabilizatorje. Z adsorbcijo ionskega stabilizatorja na površino nanodelca, postane le-ta nabita, istovrstni naboj pa preprečuje zблиževanje delcev zaradi elektrostatskih odbojnih sil, ki delujejo med njimi. Prevelika koncentracija ionskega stabilizatorja lahko destabilizira koloidni sistem, saj prebitek stabilizatorja deluje kot elektrolit, ki zmanjša debelino električnega dvosloja nanodelcev, kar vodi v flokulacijo nanodelcev v disperznem sistemu. Sterični stabilizatorji se z Van der Waalsovimi in vodikovimi vezmi vežejo na površino delca, njihove dolge verige pa so raztopljene v disperznem mediju. Kadar se dva delca medsebojno približata in se verige stabilizatorja pričnejo prepletati, se topilo v tem področju zniža vrednost kemijskega potenciala v primerjavi z molekulami topila zunaj tega območja. Vzpostavitev gradienta vodi v povečan pretok molekul disperznega medija v področje prepletanja verig stabilizatorja po principu osmoze, kar žene delca narazen (29). Uporaba neionogenih steričnih stabilizatorjev je metoda izbora, saj so le-ti fiziološko sprejemljivejši v primerjavi z ionogenimi stabilizatorji (npr. natrijev dodecilsulfat), ki lahko poškodujejo celične membrane, hkrati pa so manj občutljivi na prisotnost elektrolitov v krvnem obtoku in gastrointestinalnem traktu, torej omogočijo večjo stabilnost nanodelcev tudi po vnosu v organizem.

Za izdelavo polimernih nanodelcev (ND) je v literaturi opisanih vrsta različnih metod, vse pa imajo skupno lastnost, da iz polimernih molekul izdelujemo večje delce tj. nanodelce (angl. »bottom-up methods«). ND lahko izdelujemo s postopkom kemične polimerizacije iz monomerov npr. polimerizacija iz (mikro)emulzije, suspenzije, medfazna polimerizacija; v večini primerov pa se za izdelavo polimernih ND poslužujemo metode ionotropnega geliranja in kompleksacije polielektrolitov ter obarjalnih metod kot so: metoda obarjanja iz emulzije, metoda nanoprecipitacije in metoda obarjanja v prisotnosti supekritičnih fluidov. Splošna prednost obarjalnih metod je odsotnost ostrih reakcijskih pogojev (npr. zelo visoke temperature, tlaki), ki jih uporabljamo pri polimerizacijskih metodah. Dodatno težavo predstavlja pri izdelavi nanodelcev s polimerizacijo težko odstranjevanje nezreagiranih monomerov oz. oligomerov in iniciatorjev polimerizacije, ki lahko delujejo toksično po vnosu takšnega dostavnega sistema v organizem.

Za proizvodnjo nanodelcev iz hidrofobnih polimerov se najpogosteje uporabljajo metode obarjanja nanodelcev iz emulzije O/V (21). Obarjanje delcev lahko dosežemo z redčenjem emulzije (emulzijsko-difuzijska metoda) ali z odparevanjem topila (metoda odparevanja lahkih organskega topila). Kot topilo oz. netopilo lahko pri teh metodah uporabimo tudi superkritične fluide. Proces izdelave nanodelcev z obarjanjem iz dvofaznega sistema razdelimo na tri stopnje, ki so pri vseh metodah enake:

- v prvi stopnji polimer in učinkovino raztopimo v organskem topilu ali superkritičnem fluidu
- v drugi stopnji raztopino polimera z zdravilno učinkovino primešamo vodnemu mediju s stabilizatorjem O/V in homogeniziramo pri čemer nastane emulzija
- s spremembo pogojev povzročimo obarjanje polimera v obliki nanodelcev

Pri emulzijsko-difuzijski (angl. »emulsion-diffusion method«) metodi se organsko topilo (npr. etilacetat, metiletilketon, benzilalkohol) in vodni medij delno mešata, zato dobimo v prvi fazi emulzijo. Z redčenjem te emulzije z vodnim medijem povzročimo obarjanje polimernih delcev v vodno fazo (21).

Metodo odparevanja lahko hlapnega organskega topila (angl. »solvent evaporation method«) uporabimo, kadar se topilo (npr. diklorometan, kloroform) in vodni medij ne mešata. Disperzijo segrejemo na višjo temperaturo, kot je temperatura vrelišča organskega topila, da povzročimo odparevanje organskega topila. Metoda odparevanja s povišano temperaturo je primerna, kadar imamo opravka s termostabilno učinkovino. V kolikor imamo opravka s termolabilnimi učinkovinami, odparevamo topilo pri znižanem tlaku z rotavaporjem ali vakumsko črpalko (21).

Z metodo nanoprecipitacije (angl. »solvent displacement method«) lahko izdelamo polimerne nanodelce v primeru, da se organsko topilo in vodni medij popolnoma mešata. Raztopino polimera in učinkovine v organskem topilu dodajamo npr. s kapljanjem ali injiciranjem v vodni medij s stabilizatorjem. Organsko topilo zelo hitro oddifundira v vodno fazo, topnost polimera in učinkovine se posledično močno zmanjša in oborijo se polimerni nanodelci v zmesi organsko topilo/vodni medij (30).

Nanodelci iz hidrofobnih polimerov niso najprimernejši dostavni sistem za vgrajevanje hidrofilnih učinkovin, saj pri takšnih učinkovinah prevlada afiniteta do zunanjega vodnega medija, zato se v polimerno ogrodje ne vključijo ali se vključi le majhen del. V tem primeru uporabimo metode obarjanja z difuzijo/odparevanjem topila iz dvojne emulzije V/O/V (31). Primarno V/O emulzijo pripravimo z dodajanjem majhnega volumna vodne raztopine s hidrofilno učinkovino v raztopino polimera v organskem topilu, ki se delno meša z vodo npr. etilacetat, ali se z vodo ne meša. Tako dobimo primarno emulzijo, ki jo nato združimo s sekundarno vodno fazo s stabilizatorjem O/V. Tako pripravljeno dvojno emulzijo homogeniziramo (rotor stator homogenizator, visokotlačni homogenizator ali soniciranje), organsko topilo pa odparimo pod znižanim tlakom z vakumsko črpalko ali rotavaporjem ali sistem razredčimo, da se delno topno organsko topilo popolnoma raztopi v vodni fazi.

Obarjanje polimera lahko poteče tudi v prisotnosti superkritičnih fluidov (SCF) (32). Med superkritičnimi fluidi najpogosteje uporabljamo superkritični CO₂ (scCO₂), ker ima nizko kritično točko ($T_c = 31,1 \text{ } ^\circ\text{C}$; $P_c = 73,7 \text{ bar}$), veliko stisljivost in difuzibilnost, je netoksičen, negorljiv in relativno poceni. Poznamo dve osnovni metodi z uporabo SCF (32): pri prvi je SCF topilo za naš polimer, pri drugi je SCF netopilo za naš polimer:

- hitra ekspanzija superkritičnega fluida (angl. »rapid expansion of supercritical solution«)
- obarjanje v superkritičnem fluidu (angl. »supercritical antisolvent«)

Pri metodi hitre ekspanzije raztopine polimera v superkritičnem fluidu (angl. »rapid expansion of supercritical solution«) uporabimo scCO₂ kot topilo za raztapljanje polimera in učinkovine (33). Polimer in učinkovino pod visokim tlakom raztopimo v scCO₂ in raztopino z veliko hitrostjo razpršujemo skozi ozko iglo v posodo oz. precipitator, ki služi za zbiranje produkta. Razprševanje raztopine v scCO₂ in močno znižanje tlaka v precipitatorju zmanjšata moč raztapljanja scCO₂, kar vodi v desolvacijo polimera in obarjanje v obliki nanodelcev. Prednost te metode je, da pri postopku obarjanja ne uporabljamo organskih topil, pomanjkljivost pa slaba topnost večine polimerov in učinkovin v scCO₂. Pri metodi obarjanja v superkritični fluid (angl. »supercritical antisolvent method«) raztopimo polimer in učinkovino v primernem organskem topilu in raztopino razpršujemo v superkritični fluid (34). Pri tej metodi izkoriščamo lastnost, da se scCO₂ in organsko topilo dobro mešata, učinkovina in polimer pa sta v scCO₂ netopna. Z

razprševanjem močno povečamo specifično površino kapljic organskega topila, ki je v stiku s scCO_2 , kar vodi v hitro medsebojno difuzijo scCO_2 in organskega topila ter dodatno zmanjšanje premera kapljic raztopine polimera, ki se obori v obliki nanodelcev, vanj pa se vgradi učinkovina.

Nanodelce lahko izdelujemo tudi s tehnološkim postopkom elektrorazprševanja, kjer s pomočjo elektrod ustvarimo električno polje visoke napetosti (do 50 kV) med ozko kapilaro, skozi katero dovajamo raztopino polimera z ustrežno hitrostjo, in zbiralnikom. Zaradi zmanjševanja velikosti kapljic topilo hitro odpareva in električni naboj na površini kapljic se zgosti. Ko se doseže kritični naboj na površini kapljice nastopi t.i. Coulombova eksplozija, kjer se inducira popoln razpad kapljice na nanometriško velikost, polimer pa se obori v obliki nanodelcev v zbiralniku (35).

Za tehnološko proizvodnjo nanodelcev iz hidrofilnih naravnih (alginat, hitosan, pektin) in sinteznih (polivinilalkohol, polietilenoksid, polietilenimin, polivinilpirolidon) polimerov sta uporabni metodi ionotropnega geliranja in kompleksiranja polielektrolitov. Pri metodi ionotropnega geliranja polielektrolit prečno premrežimo z večvalentnimi ioni z nasprotnim nabojem (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , tripolifosfat⁵⁻). Za primer lahko navedemo dodajanje raztopine tripolifosfata v kislo vodno raztopino polisaharida hitosana in učinkovine. Delci nastanejo zaradi intramolekularnih in intermolekularnih elektrostatskih interakcij med protoniranimi aminskimi skupinami hitosana in negativno nabitim polifosfatom (36). Pri metodi kompleksiranja polielektrolitov dosežemo prečno premreženje zaradi elektrostatskih interakcij med dvema polimeroma z nasprotnima nabojevama npr. hitosan in alginat. V splošnem uporabljamo dve raztopini polimerov z različnim pH, v eni od teh raztopin pa raztopimo/suspendiramo učinkovino. Molekule hitosana so pozitivno nabite zaradi protoniranja aminskih skupin v kisli raztopini, molekule alginata pa negativne zaradi ionizacije karboksilnih skupin guluronske kisline v bazičnem mediju. Z dodajanjem raztopine hitosana v raztopino alginata z učinkovino se oborijo nanodelci, v katere se ujame učinkovina. Metodi ionotropnega geliranja in kompleksacije polielektrolitov lahko hkrati uporabimo za izdelavo nanodelcev. Avtorji raziskav navajajo učinkovito vgrajevanje insulina v nanodelce, ki so jih izdelali s predhodnim geliranjem alginata s kalcijevim kloridom, v drugi stopnji pa so izvedli kompleksiranje hitosana na nastale nanodelce. Kompleksiranje hitosana omogoči nastanek ovoja na površini nanodelcev, kar poveča njihovo obstojnost v vodnem mediju (37).

2. NAMEN DELA

Znanstveni napredek na področjih farmacije, medicine in biotehnologije z razvojem novih tehnologij izdelave farmacevtskih oblik, načinov zdravljenja in diagnosticiranja, je vzrok za intenzivno raziskovanje novih biorazgradljivih polimerov. Raziskave temeljijo predvsem na odkrivanju novih sinteznih biorazgradljivih polimerov, saj lahko z optimizacijo reakcijskih pogojev in vključevanjem raznovrstnih monomerov pripravimo kopolimere z želenimi lastnostmi, kot so kinetika razpada, fizikalno–kemijske in mehanske značilnosti. Razumevanje dejavnikov, ki vplivajo na kinetiko razpada in mehanske lastnosti ter biokompatibilnost, bo v prihodnosti ključnega pomena za razvoj biorazgradljivih polimerov. Kljub velikemu napredku na področju biomaterialov ostaja njihovo število omejeno, saj aplikacije zahtevajo specifične lastnosti polimerov glede na namen uporabe. Iz prej navedenih razlogov smo se odločili, da bomo v okviru diplomske naloge sintetizirali kopolimere TMC – DLLA z različnim množinskim razmerjem D, L–laktida in trimetilenkarbonata v polimerni verigi.

V prvi stopnji eksperimentalnega dela bomo izvedli sintezo kopolimerov TMC – DLLA s postopkom koordinativne polimerizacije in uporabo katalizatorja kositrovega(II) 2–etilheksanoata. Sintetizirane kopolimere TMC – DLLA bomo izolirali, očistili in strukturno ovrednotili z ^1H –NMR spektroskopijo in diferencialno dinamično kalorimetrijo (DSC).

V *in vitro* pogojih bomo spremljali kinetiko razpada sintetiziranim kopolimerom TMC – DLLA v časovnem obdobju treh mesecev. Izgubo mase kopolimerov bomo merili v petih časovnih točkah (po 2, 4, 6, 8, 12 tednih) in izračunali delež razpadlih kopolimerov ter poskušali ugotoviti mehanizem njihove razgradnje. Ker bodo izdelani kopolimeri potencialni izhodni material za oblikovanje mikro- in nanodostavnih sistemov, bomo iz njih poskušali izdelati polimerne nanodelce z metodo nanoprecipitacije in nanovlakna z metodo elektrorazprševanja. Izdelanim nanodelcem bomo določili velikost in porazdelitev velikosti s fotonsko korelacijsko mikroskopijo ter zeta potencial s pomočjo laserske Dopplerjeve anemometrije, produkt elektrorazprševanja pa bomo ovrednotili s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije. Namen diplomske naloge je v prvem delu proučiti vpliv razmerja monomerov TMC in DLLA v polimerni verigi na lastnosti izdelanih kopolimerov

L. Cergol: Sinteza kopolimerov D,L–laktida in trimetilenkarbonata ter izdelava mikro in nanodelcev in v drugem delu proučiti možnost izdelave mikro- in nanodostavnih sistemov iz teh kopolimerov.

3. METODE IN MATERIALI

3.1. REAGENTI IN TOPILA

Aceton za analizo (Merck; Nemčija)

Diklorometan (Merck; Nemčija)

Kositrov(II) 2-etilheksanoat (Sigma – Aldrich Chemie GmbH; Nemčija)

Laktid (Acros Organics, Belgija)

Polivinilalkohol (MoviolTM 4 – 98; Nemčija)

Poloksamer 188 (Lutrol[®] F68; Lek, Slovenija)

TMC (Boehringer Ingelheim Pharma & CO. KG; Nemčija)

3.2. LABORATORIJSKA OPREMA

DSC aparat Star W – 9.30 (Mettler Toledo; Švica)

Membranska črpalka (Vacuubrand GMBH & CO. KG; Nemčija)

Magnetno mešalo IKA RCT basic (IKA[®] Werke GmbH & Co. KG; Nemčija)

NMR – spektrometer Avance DPX 300 (Bruker; ZDA)

Rotavapor R – 144 (Büchi Labortechnik AG; Švica):

a) vodna kopel B – 480 (Büchi Labortechnik AG; Švica)

b) membranska črpalka Vario PC – 3001 (Vacuubrand GMBH & CO. KG; Nemčija)

Sušilna komora SP – 45 (Kambič; Slovenija)

Tehtnica EG 220 – 3NM (Kern & Sohn GmbH; Nemčija)

Tehtnica XS – 205 Dual Range (Mettler Toledo; Švica)

L. Cergol: Sinteza kopolimerov D,L–laktida in trimetilenkarbonata ter izdelava mikro in nanodelcev

Ultracentrifuga Centric – 322A (Tehtnica; Slovenija)

Vorteks Vibromix X – 10 (Tehtnica; Slovenija)

Zetasizer nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments; Anglija)

Spektroskopske metode

¹H-NMR spektri so bili posneti na inštrumentu Bruker Avance DPX 300 na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Kot topilo smo uporabili kloroform CDCl₃ in tetrametilsilan TMS kot interni standard.

Mettler TA 1 Star software apparatus

3.3. REAKCIJA POLIMERIZACIJE TMC IN DLLA V KOPOLIMERE, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE KOPOLIMEROV

Pri reakciji polimerizacije smo sintetizirali kopolimere TMC-DLLA v osmih različnih množinskih razmerjih monomerov D,L–laktida in trimetilenkarbonata. V 250 mL bučko smo natehtali ustrezno maso monomerov glede na predvideno množinsko razmerje v kopolimeru (enačba 1), dodali 5 kapljic katalizatorja Sn(Oct)₂ in zmes prepihovali z argonom. Skupna masa reakcijske zmesi je znašala med 10–12 g. Bučko smo zatesnili s parafilom in sintezo izvajali 24 ur na silikonski kopeli pri temperaturi 120 °C ob neprestanem mešanju z magnetnim mešalom. Potek sinteze ustavimo, ko opazimo svetlorumeno barvo taline. Po segrevanju smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in raztopili ob intenzivnem mešanju v 25 mL diklorometana. Diklorometan smo odparevali pri znižanem tlaku (T=40 °C; hitrost=200 vrtljajev/minuto; p = 600 mbar). Preobarjanje kopolimerov smo izvedli iz zmesi acetona v vodi. Kopolimere smo raztopili v 25 mL acetona in jih oborili z dodatkom 225 mL ledene vode. Vodno fazo smo oddekanirali. Sledove organskih topil (acetona in diklorometana) v kopolimeru smo odstranili z odparevanjem pri znižanem tlaku z uporabo rotavaporja (T=25 °C; hitrost=200 vrtljajev/minuto; p = 10 mbar; t=1,5 ure) in membranske črpalke (t=4 ure). Kopolimere z velikim deležem DLLA po končani sintezi raztopimo neposredno v 25 mL acetona (brez predhodnega raztapljanja v diklorometanu) in preoborimo z dodatkom 225 mL ledene vode.

$$m(\text{DLLA}) = \frac{m_z * M(\text{DLLA})}{\frac{y}{x} * M(\text{TMC}) + M(\text{DLLA})} \quad m(\text{TMC}) = m_z - \frac{m_z * M(\text{DLLA})}{\frac{y}{x} * M(\text{TMC}) + M(\text{DLLA})}$$

Enačba 1: Izračun zatehtanih mas monomerov TMC in DLLA za doseg predvidenega množinskega razmerja v kopolimeru TMC – DLLA; M=molekulska masa monomerov, m_z = masa zmesi, $\frac{y}{x}$ = množinsko razmerje TMC:DLLA v kopolimeru

3.4. VREDNOTENJE KOPOLIMEROV Z ^1H -NMR – SPEKTROSKOPIJO

Izhodna monomera DLLA in TMC ter sintetizirane kopolimere TMC-DLLA smo raztopili v 600 μL CDCl_3 in posneli ^1H -NMR spektre s 300 MHz spektrometrom. Z NMR tehniko smo ugotavljali uspešnost sinteze, prisotnost morebitnih stranskih produktov in nezreagiranih monomerov ter določili razmerje monomerov DLLA in TMC v kopolimeru. Uspešnost sinteze smo potrdili zaradi premika integralov skupin monomerov v spektrih sintetiziranih kopolimerov. Množinsko razmerje TMC in DLLA v kopolimeru smo določili s primerjavo vrednosti integralov protonov (I_δ) pri ustreznih kemijskih premikih δ (enačba 2 in 3):

- $\delta_1 = 1,42 - 1,64$ ppm (m; 6H; $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}\underline{\text{CH}_3}$)
- $\delta_2 = 2,02 - 2,10$ ppm (m; 2H; $\text{OCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{O}$)
- $\delta_3 = 4,20 - 4,37$ ppm (m; 4H; $\text{O}\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{O}$)
- $\delta_4 = 4,97 - 5,27$ ppm (m; 2H; $\text{O}(\text{C}=\text{O})\underline{\text{CH}}\text{CH}_3$)

$$\text{DLLA} : \text{TMC} = \frac{I_{\delta_4}}{2} : \frac{I_{\delta_3}}{4}$$

Enačba 2: Razmerje DLLA:TMC v kopolimeru izračunano s primerjavo vrednosti integralov pri kemijskih premikih $\delta_3 = 4,20 - 4,37$ ppm (m; 4H) in $\delta_4 = 4,97 - 5,27$ ppm (m; 2H).

$$\text{DLLA} : \text{TMC} = \frac{I_{\delta_1}}{6} : \frac{I_{\delta_2}}{2}$$

Enačba 3: Razmerje DLLA:TMC v kopolimeru izračunano s primerjavo vrednosti integralov pri kemijskih premikih $\delta_1 = 1,42 - 1,64$ ppm (m; 6H) in $\delta_2 = 2,02 - 2,10$ ppm (m; 2H).

3.5. SPREMLJANJE *IN VITRO* RAZPADA KOPOLIMEROV V TRIMESEČNEM ČASOVNEM OBDOBJU

V 15 ml centrifugirko smo natančno natehtali približno 1600 mg kopolimera in dodali 10 mL acetona. Kopolimere smo raztopili s pomočjo ultrazvoka v ultrazvočni kadički in vorteksiranjem. Vzorce smo nato centrifugirali pri 3900 obratih/minuto 10 minut, da smo odstranili morebitne neraztopljene dele vzorca. Prazne 1,5 mL vialo smo stehtali in jih nato

napolnili s 500 μL raztopine kopolimera z uporabo 1000 μL avtomatske pipete. Vzorce smo pripravljali v treh paralelkah. Polimerni film smo pripravili tako, da smo vzorce sušili do konstantne mase. Vialo smo pustili odprte 7 dni pri sobni temperaturi, tako da je aceton izhlapel in vsakodnevno spremljali njihovo maso; končni zaostanek topila smo odstranili s 24 urnim sušenjem v sušilniku pri temperaturi 50 $^{\circ}\text{C}$. Maso kopolimerov v vialah smo določili gravimetrično. Na pripravljen polimerni film v vialah smo s pipeto dodali 1 mL bidestilirane vode in vialo zamašili s plastičnimi pokrovčki ter jih prenesli v inkubator s temperaturo 37 $^{\circ}\text{C}$. Po 2, 4, 6, 8 in 12 tednih smo ugotavljali delež razpadlega polimera tako, da smo z 2 mL injekcijsko brizgo iz vial odstranili vodni medij in vialo dvakrat sprali z 1 mL bidestilirane vode, pri čemer smo popolnoma odstranili razpadle fragmente kopolimera. Vialo z nerazgrajenim kopolimerom smo prenesli za 22 ur v sušilnik z vročim zrakom ($T = 90^{\circ}\text{C}$). Po sušenju smo vzeli vialo iz sušilne komore in jih zatesnili s pokrovčkom, da smo preprečili vezanje vlage na segrete kopolimere. Vialo smo ohladili na sobno temperaturo, odstranili pokrovčke in stehali zaostanek mase kopolimerov v vialah. Delež razpadlega kopolimera (%) smo izračunali po naslednji enačbi:

$$X_R (\%) = \left(1 - \frac{m(V + Pt)}{m(V + P_0)} \right) * 100$$

Enačba 4: delež razpadlega kopolimera TMC – DLLA v odstotkih; $m(V + P_t)$ – masa vialo s kopolimerom ob času t ; $m(V + P_0)$ – masa vialo s kopolimerom pred izvedbo testa razpadnosti

3.6. VREDNOTENJE KOPOLIMEROV Z DSC ANALIZO

DSC analizo smo uporabili za vrednotenje termičnih lastnosti kopolimerov. Za kalibracijo DSC inštrumenta smo kot standard uporabili indij. V aluminjaste lončke ($V = 40 \mu\text{L}$) smo zatehtali 15–25 mg vzorcev kopolimerov in monomerov TMC ter DLLA. Pokrovčke za lončke smo preluknjali z iglo in lončke nato nehermetično zaprli v stiskalnici. Lončke s kopolimeri smo prenesli v DSC aparaturo, kjer smo jih segrevali v temperaturnem območju od -40°C do 150°C s hitrostjo $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ v dušikovi atmosferi (pretok 40 mL/minuto). S prvim segrevanjem do 150°C smo iz vzorcev odstranili zaostanek topil (aceton in voda), ki izvirajo iz reakcije polimerizacije. Vzorce smo ohladili na sobno temperaturo ($T = 25^{\circ}\text{C}$) in jih še drugič segrevali. Iz termogramov drugega segrevanja smo določili temperaturo steklastega prehoda (T_g) kopolimerov in temperaturo tališča (T_m)

L. Cergol: Sinteza kopolimerov D,L–laktida in trimetilenkarbonata ter izdelava mikro in nanodelcev monomerov. Analizo vzorcev smo izvedli dvakrat, da bi zagotovili ponovljivosti rezultatov.

3.7. IZDELAVA NANODELCEV Z METODO DIFUZIJE TOPILA (NANOPRECIPITACIJA)

Nanodelce smo izdelali iz 0,5 %, 2,5 % in 5 % raztopine kopolimerov TMC – DLLA v acetonu in 0,5 % raztopine stabilizatorjev polivinilalkohola (PVA) in poloksamera 188 (P – 188) v bidestilirani vodi.

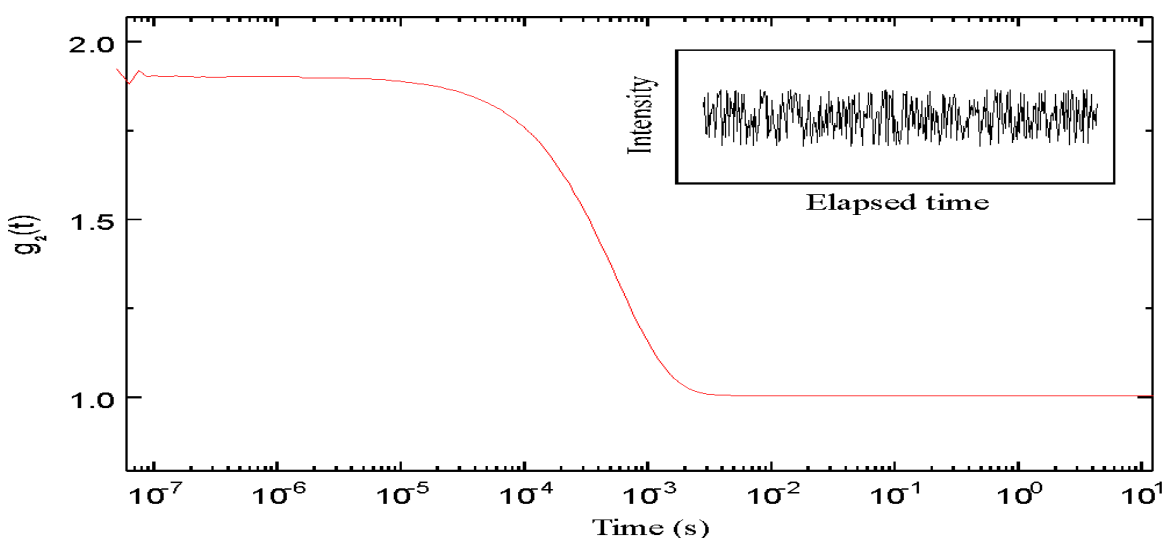
5 % raztopino kopolimera smo pripravili z raztapljanjem 1000,00 mg polimera v 20,00 mL acetona z uporabo vorteksa in ultrazvočne kadičke. 2,5 % in 0,5 % raztopino kopolimera smo pripravili z redčenjem 5 % raztopine kopolimera v acetonu. Z merilnim valjem smo odmerili 25 mL bidestilirane vode (bd H₂O) v 50,0 mL čašo z ozkim vratom in jo postavili na magnetno mešalo. Z injekcijsko brizgo smo injicirali 1 mL raztopine polimera v acetonu v čašo z bd H₂O oz. v raztopino stabilizatorja med mešanjem z magnetnim mešalom (500 obratov/min). Ob stiku raztopine polimera in vodne faze je aceton oddifundiral v vodni medij, kar je vodilo v desolvacijo in oboritev kopolimera v obliki nanodelcev v vodni fazi. Suspenzijo nanodelcev smo mešali na magnetnem mešalu 24 ur pri hitrosti 500 obratov/minuto, da smo iz sistema odstranili organsko topilo. Nanodelce v 0,5 % raztopini stabilizatorjev PVA in P – 188 smo izdelali po enakem postopku.

Priprava 0,5 % (m/v) raztopine PVA in P -188: V 50,0 mL bd H₂O, ki smo jo segreli na 90 °C smo postopoma med mešanjem na magnetnem mešalu raztopili 2500 mg PVA (500 obratov/minuto. Nato smo 5 % (m/v) raztopino PVA ohladili na sobno temperaturo in nadomestili izparelo vodo. 0,5 % raztopino PVA smo pripravili z desetkratnim redčenjem 5 % raztopine. 0,5 % (m/v) raztopino P – 188 smo pripravili na enak način kot 0,5 % (m/v) raztopino PVA, vendar brez segrevanja bd H₂O na 90 °C.

3.8. MERJENJE VELIKOSTI IN ZETA POTENCIALA NANODELCEV

Velikost in zeta potencial smo merili nanodelcem, ki smo jih izdelali iz 0,5 % in 2,5 % raztopine polimerov v acetonu, na PCS napravi Zetasizer nano ZS. Disperzijo nanodelcev smo s pipeto prenesli v kiveto, ki smo jo nato vstavili v nosilec v merilni celici PCS naprave in izvedli meritve pri ustreznih pogojih sistema (tabela II). Z laserskim žarkom svetimo preko leče na kiveto, ki vsebuje vzorec z dispergiranimi delci. Naprava omogoča

neinvazivno »back scatter« detekcijo sipane svetlobe, ki jo merimo pod kotom 173° . S takšnim pristopom zmanjšamo možnost večkratnega sipanja svetlobe na prisotnih delcih v disperziji. Signal se v zadnji stopnji prenese z detektorja do korelatorja v računalniku. PCS naprava izkorišča tehniko fotonske korelacijske spektroskopije za analiziranje velikosti delcev na podlagi razlik v intenziteti sipane svetlobe v kratkih časovnih intervalih. Rezultat meritve nam predstavlja avtokorelacijska funkcija intenzitete sipane svetlobe v odvisnosti od časovnega zamika korelatorja. Krajši kot je časovni zamik (τ), večja je korelacija v intenziteti sipane svetlobe med meritvami, ki s podaljševanjem časovnega zamika postopoma limitira proti 0 (slika 8).



Slika 8: Korelacija intenzitete sipane svetlobe v odvisnosti od časovnega zamika korelatorja.

Razlika v intenziteti sipane svetlobe delcev je posledica naključnega Brownovega gibanja delcev, ki zaradi trkov z molekulami disperznega medija difundirajo v vzorcu. Hitrost difuzije je odvisna od oblike in velikosti delcev ter kinetične energije in viskoznosti medija, ki sta pogojeni s temperaturo sistema. Manjši delci difundirajo hitreje, zato opazimo hitrejše spreminjanje intenzitete sipane svetlobe in hitrejši padec korelacijske krivulje na ničelno vrednost. Iz difuzijskega koeficienta (D), vektorja sipanja (q) in difuznega časa sipalnega vektorja (τ_d), računalniška programska oprema izračuna hidrodinamski premer sferičnih delcev z uporabo Einstein – Stokesove enačbe (enačba 5), homogenost porazdelitve pa poda v obliki polidisperznega indeksa (PdI). Želene vrednosti PdI so približno enake 0 (0,1 – 0,3), kar nakazuje na unimodalno porazdelitev velikosti hidrodinamskega premera delcev. Višanje PdI proti vrednosti 1, je posledica nehomogene porazdelitve velikosti delcev v preiskovanem vzorcu.

$$D = \frac{k_b * T}{6\pi r \eta} = \frac{1}{\tau_d * q^2}; q = \frac{4\pi \eta}{\lambda} * \sin \frac{\theta}{2}$$

Enačba 5 (Einstein – Stokesova enačba): k_b – Boltzmannova konstanta; T – temperatura (K); r – polmer delca; η – viskoznost disperznega medija; τ_d – čas difuzije sipalnega vektorja; q – vrednost sipalnega vektorja; θ – kot sipane svetlobe; λ – valovna dolžina sipane svetlobe

Meritve zeta potenciala (naboj difuzne plasti električnega dvosloja) temeljijo na merjenju elektroforezne mobilnosti nanodelcev proti nasprotno nabiti elektrodi v električnem polju. Elektroforezna mobilnost delcev (v) je odvisna od napetostne razlike med elektrodama, zeta potenciala (ζ) in viskoznosti (η) ter dielektrične konstante medija (ϵ). Določamo jo s tehniko Dopplerjeve laserske anemometrije (M3 tehnika), ki omogoča merjenje hitrosti potovanja delcev znotraj tekočega medija. Laserski žarek se deli preden doseže kiveto na dva dela: referenčni, ki poteka neposredno do detektorja ter žarek, ki poteka skozi vzorec ter povzroči sipanje svetlobe delcev v nanodisperziji. Žarek sipane svetlobe pod kotom 17^0 se združi z referenčnim in skupaj prispeta do detektorja. Hitrosti sprememb v intenziteti sipane svetlobe so direktno proporcionalne elektroforezni mobilnosti nabitih delcev, preko katere izračunamo zeta potencial z uporabo Henryjeve enačbe (enačba 6).

$$\zeta = \frac{3 * v * \eta}{2 * \epsilon * f(Ka)}$$

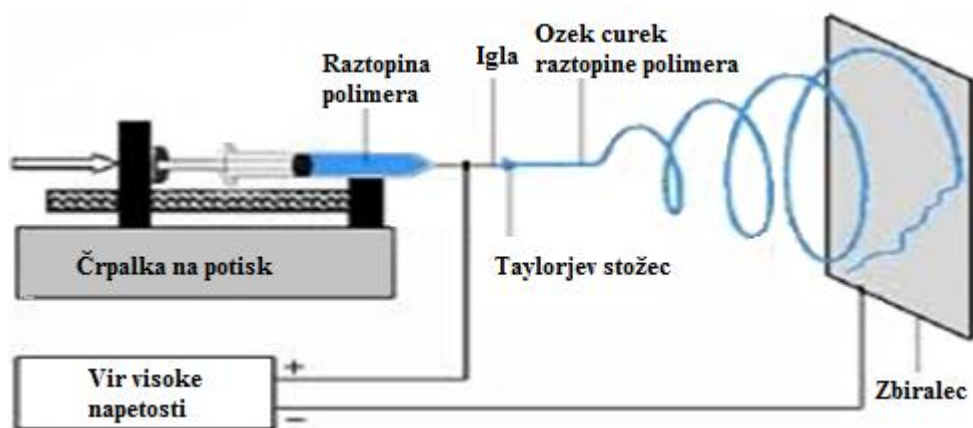
Enačba 6: ζ – zeta potencial; v – elektroforezna mobilnost; η – viskoznost medija; ϵ - dielektrična konstanta; $f(Ka)$ je Henryjeva funkcija z vrednostjo 1,5 za vodni medij (aproximacija Smoluchowsky - jevega).

Tabela II: Ekserimentalni pogoji meritve velikosti in zeta potenciala z aparaturom Zetasizer ZS ZEN 3600

	MERJENJE VELIKOSTI	MERJENJE ZETA POTENCIALA
Temperatura	25 ⁰ C	25 ⁰ C
Čas meritve	Avtomatski	Avtomatski
Število ponovitev	3	3
Viskoznost medija (η)	0,89 cP	0,89 cP
Valovna dolžina (λ)- Ne – He laser	633 nm	–
Kot merjenja (θ)	17 ⁰	17 ⁰
Lomni količnik	1,330	–

3.9. ELEKTORAZPRŠEVANJE RAZTOPINE KOPOLIMEROV V ACETONU

Z metodo elektrorazprševanja običajno izdelujemo nanovlakna pod vplivom električnega polja, ki ga ustvarja vir visoke napetosti (nekaj kV). Najprej smo pričvrstili injekcijsko brizgo, ki vsebuje nasičeno raztopino polimera v acetonu, na avtomatsko črpalko na potisk, ki ustvarja konstanten pretok raztopine skozi injekcijsko iglo. Vir visoke napetosti smo priključili z elektrodo na konico injekcijske igle in na ustrezni razdalji postavili zbiralec (kovinska folija) priključen na ozemljitev (slika 9).



Slika 9: Shematski prikaz procesa elektrorazprševanja in zbiranje nanovlaken na zbiralcu.

Ekserimentalni pogoji izdelave nanovlaken z elektrorazprševanjem :

- čas razprševanja : 15 minut
- električni tok : 2–3 mV
- koncentracija raztopine polimera : nasičena raztopina
- napetost : 15000 V
- premer igle : 0,8 mm
- pretok raztopine polimera : 1,41 mL/uro
- razdalja do zbiralca : 12 cm
- topilo : aceton

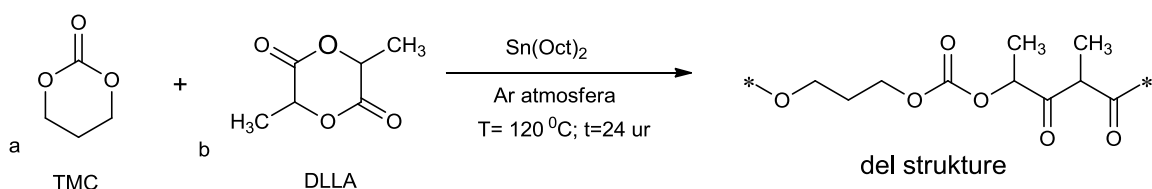
Po 15 minutah razprševanja smo aluminjasto folijo z vzorci odstranili iz plošče zbiralca. Vzorce smo sušili pri sobni temperaturi 24 ur in nato izrezali del vzorca skupaj s folijo, kar smo uporabili za SEM analize.

3.10. VREDNOTENJE VZORCEV ELEKTORAZPRŠEVANJA Z VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO (SEM)

Morfologijo vzorca, ki smo ga pripravili z elektrorazprševanjem, smo ovrednotili s SEM. Izrezan del aluminjaste folije z vzorcem smo pritrdili na kovinske nosilce z dvostranskim prevodnim ogljikovim trakom (premer 12 mm, Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija) in jih opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35 VP (Oberkochen, Zeiss, Nemčija) s pospeševalno napetostjo 1,00 kV in z uporabo sekundarnega detektorja.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

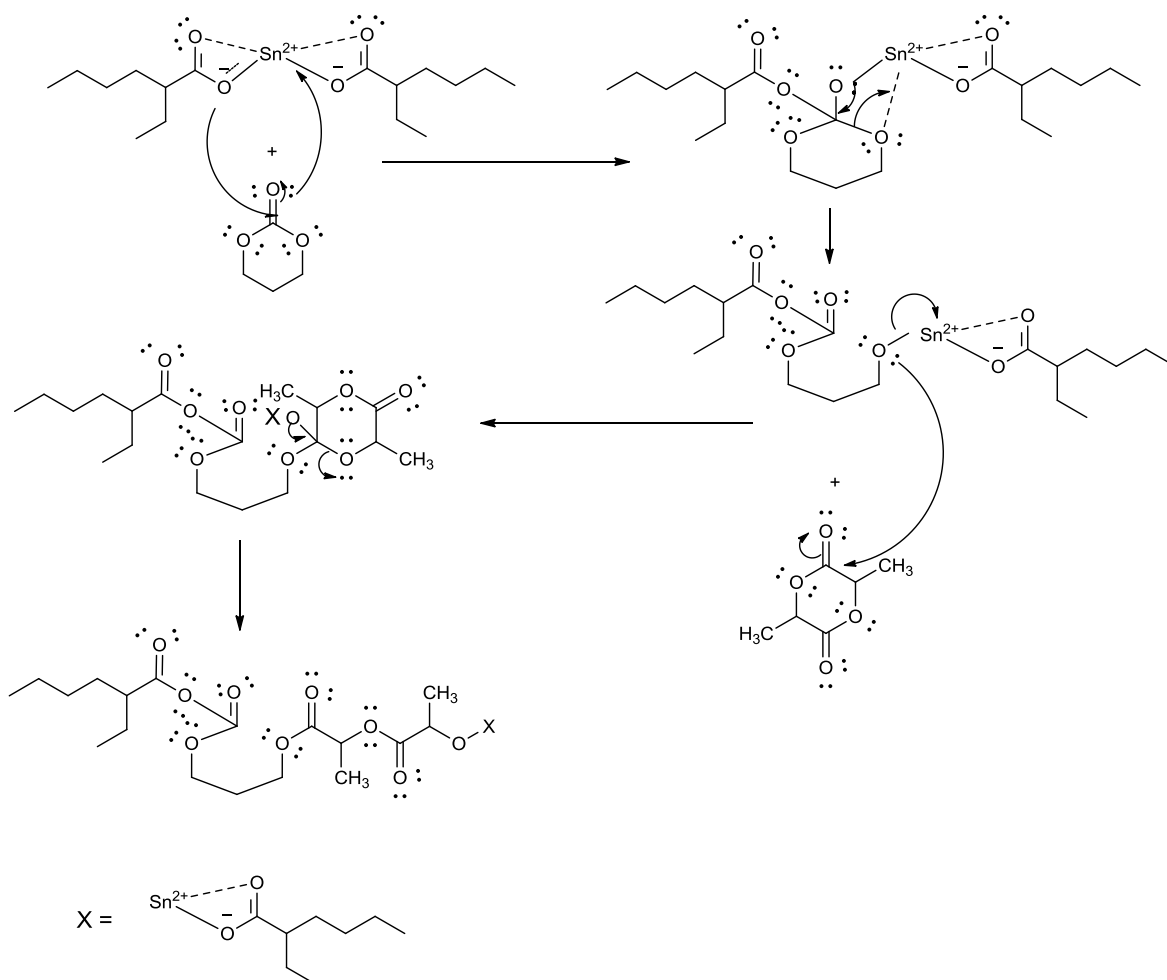
4.1. SINTEZA KOPOLIMEROV



Slika 10: Sintezna reakcija kopolimera TMC – DLLA iz monomerov trimetilenkarbonata (TMC) in laktida (DLLA) v atmosferi argona (Ar) in prisotnosti katalizatorja $\text{Sn}(\text{Oct})_2$; a = množina monomera TMC; b = množina monomera DLLA

Sintezo kopolimerov TMC – DLLA smo izvedli v prisotnosti katalizatorja $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ se uporablja v sintezah mnogih biorazgradljivih polimerov zaradi relativne netoksičnosti, dobre kontrole nad polimerizacijskim procesom in visoke stopnje pretvorbe monomerov, kar omogoča sintezo polimerov visokih molekulskih mas (38). Polimerizacija poteka preko koordinativnega insercijskega mehanizma z odpiranjem obroča. Kovinski center katalizatorja (kositer; Sn) deluje kot Lewisova kislina (elektron akceptor), ki tvori koordinativno vez s kisikom karbonilne skupine estera DLLA in karbonatne skupine TMC. Kisikov atom donira prost elektronski par v nastalo koordinativno vez, kar poveča elektropozitivnost ogljika (δ^+) v karbonilni skupini in omogoči nukleofilni napad (adicija s sledečo eliminacijo) oktanoatne skupine katalizatorja. Adicija oktanoatne skupine povzroči odpiranje obroča DLLA oz. TMC in intramolekularno premestitev Sn na prosto hidroksilno skupino, kar vodi v nastanek novega nukleofila. Inicijacija sinteze kopolimerov TMC-DLLA poteka po dveh možnih mehanizmih:

- kjer $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ v prvi stopnji omogoči aktivacijo estrske skupine monomera DLLA
- kjer $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ v prvi stopnji omogoči aktivacijo karbonatne skupine monomera TMC (slika 11).



Slika 11: Mehanizem polimerizacije z odpiranjem obroča pri sintezi kopolimera TMC – DLLA, kjer v prvi stopnji poteče aktivacija monomera TMC v prisotnosti katalizatorja $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. V drugi stopnji je prikazan nukleofilni napad aktiviranega monomera TMC na molekulo D,L–laktida in nastanek dimera TMC – DLLA.

Mehanizem poteka sinteze težko pojasnimo, vendar predvidevamo, da katalizator $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ v prvi stopnji omogoči aktivacijo monomera TMC, saj je karbonatna skupina bolj dovzetna za nukleofilni napad (večji δ^+ ogljikovega atoma) v primerjavi z estrsko skupino. Z odpiranjem obroča TMC nastane aktivirana hidroksilna skupina, ki reagira z elektrofilnimi centri cikličnih monomerov DLLA in TMC (faza propagacije). Terminacijo sinteze

opazimo, kadar v reakcijski zmesi zmanjka monomerov ali katalizatorja $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, oziroma velika količina produktov ustavi potek polimerizacije. Na terminalnem koncu polimerne verige nastane z adicijo oktanoatne skupine visokoenergijska anhidridna skupina, ki v prisotnosti vode hidrolizira, torej nastaneta prosti hidroksilna in karboksilna skupina, ki daje kopolimerom naboj.

$\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ni edini katalizator, ki omogoči iniciacijo sinteze kopolimerov TMC-DLLA. Monomer DLLA in katalizator $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ sta higroskopni substanci in običajno vsebujeta rezidualno vodo, ki izvira iz njune sinteze (38). Adsorbirana vlaga povzroči hidrolizo $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ in nastanek *in situ* katalizatorja oktanoil kositrovega(II) hidroksida, ki ima sinergističen učinek na sintezo kot $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, vendar se pri temperaturah višjih od 120 °C obarja v obliki SnO , kar vodi v pomanjkanje obeh katalizatorjev in premik ravnotežja sinteze v smer reaktantov ter k nižjim izkoristkom sinteze. V literaturi zasledimo, da omogočajo koiniciacijo sinteze tudi 2-etilheksanojska kislina, ki predstavlja nečistoto v katalizatorju $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ in laktoil kositrov(II) hidroksid (38, 39). Sintezo kopolimerov bi lahko izvedli tudi v prisotnosti različnih bazičnih alkoksidov (npr. kovinski tercbutiloksid), ki delujejo kot anionski katalizatorji. Le-ti v splošnem omogočajo hitrejšo inicijacijo sinteze in fazo propagacije kot $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, vendar proces polimerizacije težje kontroliramo, kar privede do nastanka večjega deleža stranskih produktov zaradi transesterifikacije. Dodatno so anionski katalizatorji zmožni odcepiti kisel vodik z metinske skupine DLLA. Odcep vodika bi privedel do epimerizacije (nastanek R,S–mezolaktida), zato je izbira neionskega katalizatorja $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ primerna rešitev (38). Čeprav veljajo kositrovi(II) katalizatorji za relativno netoksične, se lahko v organizmu izlužijo iz kopolimerov in hidrolizirajo v bazične hidrokside, ki delujejo iritantno. V kolikor katalizatorja $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ne bi bili zmožni v zadostni meri odstraniti iz kopolimerov, bi sintezo lahko izvedli z uporabo organokatalitičnih iniciatorjev npr. tiosečnin, gvanidinov, N-heterocikličnih karbenov v prisotnosti alkoholov (38).

Sintetizirane kopolimere s predvidenim deležem DLLA med 20 % in 80 % v polimerni verigi smo strukturno ovrednotili z ^1H – NMR spektrometrijo (tabela III).

Tabela III: Množinski delež monomera DLLA v kopolimeru z navedenimi izkoristki polimerizacije v prisotnosti katalizatorja Sn(Oct)₂.

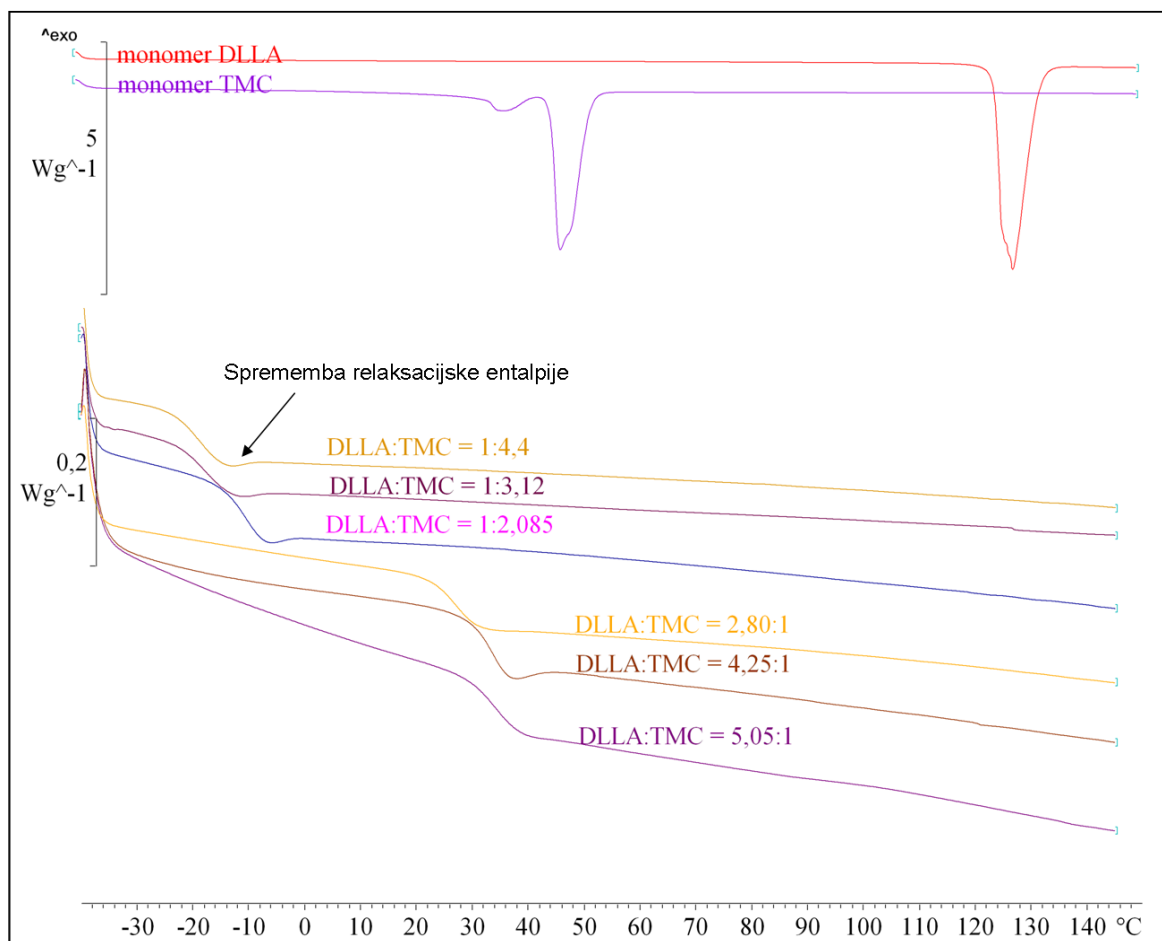
Oznaka vzorcev	Predviden množinski delež (%) monomera DLLA v ko-polimeru	Množinski delež monomera DLLA (%) v ko-polimeru (iz ¹ H - NMR spektra)	Izkoristek sinteze (%)
DLLA 19	20	18,5	90,09
DLLA 24	25	24,3	88,81
DLLA 32	33,3	32,4	87,51
DLLA 68	66,7	68,4	91,28
DLLA 74	71,8	73,7	92,10
DLLA 77	75	77,1	92,88
DLLA 81	75	81	93,12
DLLA 84	80	83,5	98,58

V ¹H–NMR spektru kopolimerov vidimo pet signalov: dva signala pripadata vodikom TMC in dva signala vodikom DLLA ter signal acetona ($\delta_t = 2,18$ ppm; s; 6H), ki ga kljub odparevanju pri znižanem tlaku iz produkta nismo uspeli popolnoma odstraniti. Signal z najnižjim kemijskim premikom v spektru kopolimerov predstavlja metilni skupini DLLA nega dela ($\delta_1 = 1,42$ - $1,64$ ppm; m; 6H), medtem ko imata kislavodika -CH- skupine DLLA nega dela v spektru najvišji premik ($\delta_4 = 4,98$ - $5,24$ ppm; m; 2H). Signal dveh -CH₂-skupin TMC (ob karbonatni skupini) vidimo pri premiku $\delta_3 = 4,19$ - $4,30$ ppm (m, 4H) in signal pri premiku $\delta_2 = 2,02$ - $2,10$ (m, 2H) pripada preostali -CH₂-skupini TMC. Signali vodikov v kopolimerih imajo nekoliko drugačne premike v primerjavi z monomeroma TMC in DLLA (priloge 1, 2 in 3). Vsi imajo obliko multiplata. Iz spektrov kopolimerov razberemo, da le-ti ne vsebujejo nezreagiranih vhodnih monomerov TMC in DLLA. Multiplati nastanejo zaradi različne okolice vodikov monomerov v kopolimeru, kar vpliva

na spremembo kemijskega premika. Vodiki metilenskih skupin fragmenta, ki ustreza TMC imajo rahlo spremenjene kemijske premike, če se nahajajo v zaporedju TMC–TMC–TMC, kot v zaporedju DLLA–TMC–DLLA oziroma TMC–TMC–DLLA. Enaka teorija velja tudi za premike vodikov DLLA nega dela v kopolimeru. S primerjavo vrednosti integralov med premikoma δ_1 in δ_2 ter δ_3 in δ_4 smo določili dejansko množinsko razmerje TMC in DLLA v seriji kopolimerov (enačba 2 in 3). Kopolimeri z večjim deležem TMC imajo razmerje monomerov v kopolimeru zelo podobno predvidenemu množinskemu razmerju (tabela 5). Večja odstopanja v sestavi kopolimera zasledimo pri kopolimerih z visoko vsebnostjo DLLA (81-84 %). Izkoristki sinteze so veliki, saj se njihove vrednosti gibajo med 87,5 % in 98,5 %. Največje izkoristke sinteze dobimo pri kopolimerih z velikim deležem monomera TMC (DLLA 19) ali DLLA (DLLA 81, DLLA 84) v polimerni verigi.

4.2. DSC ANALIZA KOPOLIMEROV TMC – DLLA

Z DSC analizo smo vrednotili termične lastnosti in čistost sintetiziranih kopolimerov TMC – DLLA. Na DSC krivuljah sintetiziranih kopolimerov vidimo endotermno spremembo z obliko prevoja (temperatura steklastega prehoda, T_g), kjer naraste specifična toplota vzorca (slika 12). Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da so vsi sintetizirani kopolimeri amorfni ne glede na razmerje monomerov v polimerni verigi. Sprememba specifične toplote je značilnost amorfni snovi in predstavlja termično spremembo drugega reda. Spremembi prvega reda predstavljata kristalizacija in taljenje, kjer se v določeni izotermni točki spremeni notranja energija vzorca. Volumna trdne snovi in taline se ne razlikujeta dosti in posledično je sprememba notranje energije pri konstantem tlaku enaka spremembi entalpije, ki jo z DSC aparatom zaznavamo kot razliko v toplotnem toku skozi vzorec.



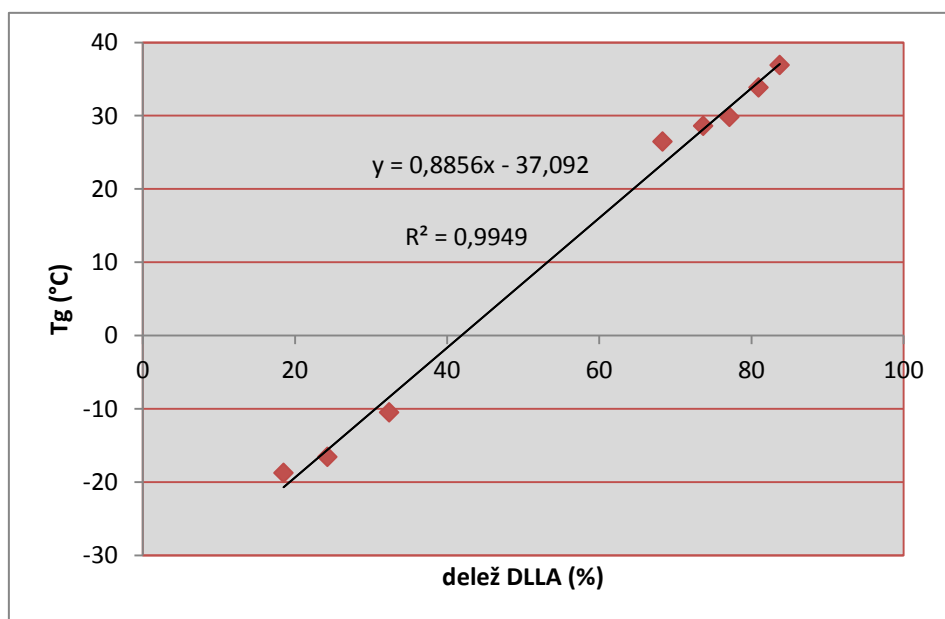
Slika 12: DSC termogram izbranih kopolimerov TMC – DLLA in referenčna spektra monomerov TMC in DLLA. Sprememba relaksacijske entalpije je označena s puščico. DLLA 19 (DLLA:TMC=1:4,4); DLLA 24 (DLLA:TMC=1,3,12); DLLA 32 (DLLA:TMC=1:2,085); DLLA 74 (DLLA:TMC=2,80:1); DLLA 81 (DLLA:TMC=4,25:1); DLLA 84 (DLLA:TMC=5,05:1)

DSC krivulji monomerov TMC in DLLA, ki smo jih uporabili za sintezo kopolimerov, kažeta endotermna pika, ki predstavlja proces taljenja (T_m) vzorca. To potrjuje, da sta monomera kristalinična. Na DSC krivulji monomera TMC opazimo pred T_m majhen endotermen pik ($T = 47 \text{ }^\circ\text{C}$), ki nakazuje na spremembo kristalne rešetke (transformacija trdno – trdno). T_g kopolimerov je močno odvisen od razmerja monomerov TMC in DLLA v polimerni verigi (tabela IV). Večji kot je delež TMC v kopolimeru, nižja je T_g , kar je posledica višje konformacijske entropije kopolimera, zaradi večje fleksibilnosti TMC zaporedij v polimerni verigi. Poleg fleksibilnosti verig kopolimerov vpliva na T_g tudi molekulska masa kopolimera, ki je ob predpostavki enotne polimerizacijske stopnje za vse molekule kopolimerov večja za kopolimere z večjim deležem DLLA, kar se kaže v višjih vrednostih T_g . V končni točki steklastega prehoda kopolimerov vidimo majhno endotermno spremembo, ki nakazuje na spremembo relaksacijske entalpije vzorca.

Sprememba relaksacijske entalpije nastane zaradi napetosti med verigami kopolimera, ki se ustvari pri staranju vzorca; z dovajanje toplotnega toka v vzorec pa se verige relaksirajo. Na DSC krivuljah kopolimerov ne vidimo specifičnih pikov karakterističnih za monomera DLLA in TMC. Iz tega razloga sklepamo, da serija kopolimerov TMC – DLLA ne vsebuje nezreagiranih reaktantov. Rezultati DSC analize kažejo torej komplementarne rezultate rezultatom NMR analize, torej lahko trdimo, da smo sintetizirali kopolimere TMC – DLLA ustrezne čistote.

Tabela IV: Temperatura steklastega prehoda sintetiziranih kopolimerov v odvisnosti od množinskega deleža D,L–laktida v kopolimeru

Oznaka vzorca	T _g (°C)
DLLA 19	- 18,75
DLLA 24	- 16,57
DLLA 32	- 10,50
DLLA 68	26,46
DLLA 74	28,59
DLLA 77	29,84
DLLA 81	33,85
DLLA 84	36,89



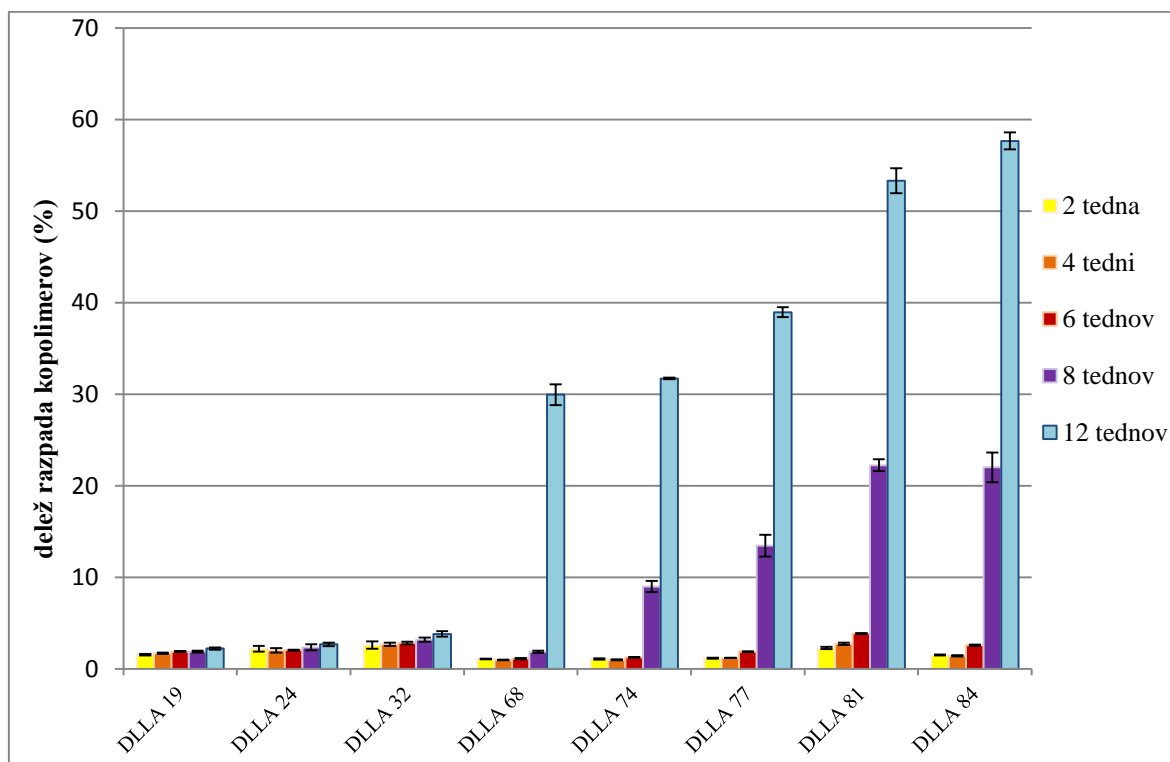
Slika 13: Odvisnost temperature steklastega prehoda kopolimerov TMC – DLLA od deleža D,L–laktida v polimerni verigi.

Temperatura steklastega prehoda kopolimerov TMC – DLLA linearno narašča z deležem DLLA v polimerni verigi (slika 13). Kopolimeri, v katerih prevladuje delež TMC so pri sobni temperaturi zelo viskozne tekočine (zmehčano stanje), medtem ko so kopolimeri z večjim deležem DLLA pri sobni temperaturi trdni (steklasto stanje). Celotna serija sintetiziranih kopolimerov TMC – DLLA kaže možnost uporabe na področju izdelave nanodostavnih sistemov. Primerni kandidati za medicinsko uporabo so kopolimeri, ki vsebujejo delež DLLA višji od 70 %, saj imajo le-ti T_g nad $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Materiali, ki so predvideni za uporabo v kirurgiji, morajo imeti T_g nad sobno temperaturo, saj steklasto stanje amorfni polimerov omogoča lažje rokovanje z materialom. Kopolimera DLLA 74 ($T_g = 28,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) in DLLA 81 ($T_g = 33,85\text{ }^{\circ}\text{C}$) bi lahko uporabili za površinsko prekrivanje ran in opeklin (npr. kirurških gaze) telesnih okončin, kjer je telesna temperatura med $25\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Površinska aplikacija bi kopolimeru omogočila, da obdrži prvotno steklasto stanje in strukturno integriteto. Zavedati se moramo, da prisotnost fizioloških tekočin deluje kot mehčalo, ki zniža T_g kopolimerom. Posebno pozornost lahko namenimo kopolimeru DLLA 74, ki v fizioloških pogojih preide iz steklastega v zmehčano stanje, kar mu zniža Youngov modul in natezno trdnost ter spremeni strukturne lastnosti (40). Kopolimer DLLA 84 ($T_g = 36,89\text{ }^{\circ}\text{C}$) ima T_g pri telesni temperaturi in izkazuje najprimernejše mehanske lastnosti za izdelavo kirurških materialov za uporabo v notranjih telesnih votlinah kot so kirurška nitja, fiksacijske naprave pri kostnih zlomih in porozna 3–D ogrodja za regeneracijo mehkih tkiv ali kot nadomestek pri transplantaciji organov. Iz navedenih razlogov sklepamo, da potrebujemo za izdelavo stabilnega dostavnega sistema, ki omogoča podaljšano sproščanje lipofilnih zdravilnih učinkovin iz ogrodja, kopolimere z vsebnostjo DLLA višjo od 85 % ($T_g = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), saj tako dosežemo, da se struktura polimernega ogrodja pri vnosu v organizem ne spremeni.

4.3. *IN VITRO* RAZPADNOST KOPOLIMEROV TMC – DLLA

Slika 14 predstavlja *in vitro* razpadnost celotne serije sintetiziranih kopolimerov TMC – DLLA v času treh mesecev (priloga 4). Hidrolipofilne lastnosti, hitrost in mehanizem razgradnje polimerne verige so odvisni od vsebnosti monomerov TMC in DLLA v polimeru. Večja kot je vsebnost DLLA v polimeru, bolj je polimer hidrofilen, kar posledično omogoča lažji dostop molekulam vode in hitrejšo prodiranje vode v globino kopolimernega filma. Iz grafikona vidimo, da kopolimeri z največjo vsebnostjo TMC (68–81 %) razpadajo izredno počasi. V treh mesecih izgubijo manj kot 4 % in kažejo linearno

izgubo mase s časom. Kopolimeri z zelo velikimi deleži DLLA v polimerni verigi (68–84 %) izgubijo v treh mesecih med 30–55 % začetne mase; izguba mase je do šestega tedna razpada minimalna, nato pa zelo hitro naraste.



Slika 14: *In vitro* razpad kopolimerov TMC – DLLA v času treh mesecev v odvisnosti od množinskega deleža D,L–laktida v kopolimeru.

Razgradnja hidrofobnih kopolimerov TMC – DLLA poteka s hidrolizno cepitvijo estrskih in karbonatnih vezi, kar vodi v nastajanje monomerov TMC in DLLA in oligomernih razgradnih produktov. Kopolimeri z večjim deležem DLLA vsebujejo v svoji strukturi daljša DLLA–DLLA zaporedja med sekvencami TMC (40). Prednostno poteka hidroliza kovalentne estrske vezi v DLLA zaporedjih in izplavljanje oligomernih fragmentov iz kopolimernga matriksa, zato se v polimernem ogrodju posledično večja vsebnosti TMC med procesom razgradnje (41).

Po dodatku medija (prečiščene vode) polimernim filmom smo opazili, da se le-ti različno obnašajo, kar je bilo odvisno od razmerja monomerov v polimeru. Kopolimeri z visoko vsebnostjo DLLA v vodi nabrekajo, medtem ko kopolimeri z večjim deležem TMC tvorijo obliko kepice. Nabrekanje je posledica hitre difuzije molekul vode v kopolimerni matriks preko hidrofilnejših DLLA zaporedij v kopolimeru TMC – DLLA, kar omogoča proces erozije preko celotnega volumna (globinske) kopolimerov z visokim deležem DLLA. Po

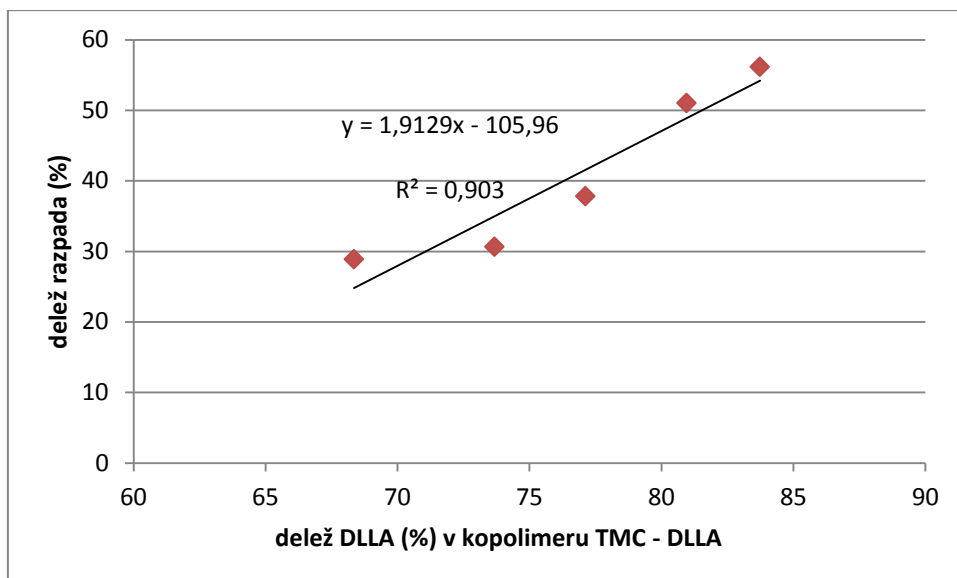
dveh tednih vidimo, da kopolimeri z velikim deležem TMC (68-91%) razpadejo v nekoliko večjem obsegu ($\approx 2\%$) kot tisti z večjo vsebnostjo DLLA, čeprav v naslednjih 10 tednih izgubijo le dodaten 1 % začetne mase vzorca. Ta ugotovitev zelo verjetno nakazuje na storjeno eksperimentalno napako pri sušenju vzorcev, kjer nismo popolnoma odstranili acetona, ki smo ga uporabili kot topilo za pripravo filmov iz kopolimerov TMC – DLLA, zato se je masa polimernega filma v prvih dveh tednih navidezno zmanjšala za 2 %.

V prvih šestih tednih opazimo minimalno izgubo mase celotne serije kopolimerov TMC – DLLA. Kopolimeri z velikim deležem TMC (DLLA 19-DLLA 32) izgubijo le dodatnih 0,25 % mase v primerjavi z meritvijo po 14 dneh. Hidrofobni TMC segmenti onemogočajo prodiranje molekulam vode v globino polimernega ogrodja, zato le-ti zapadejo procesu površinske erozije. Površinska erozija nastopi kot posledica počasne difuzije molekul vode v kopolimerno ogrodje v primerjavi s hitrostjo cepitve labilnih vezi v kopolimerni verigi in jo pogosto opazimo pri zelo lipofilnih kopolimerih. Največjo izgubo mase (3–4 %) smo opazili pri kopolimerih z najvišjim deležem hidrofilnega DLLA (DLLA 81 in DLLA 84). Ta dva polimera zapadeta procesu globinske erozije. Erozija poteka v ogrodju postopoma od notranjih k zunanjim plastem kopolimernega filma. Obsežne izgube mase ne opazimo, ker površina ogrodja ni prizadeta v tolikšni meri, da bi se v njej tvorile reže in razpoke, ki bi omogočile odplavljanje oligomernih fragmentov kopolimera iz notranjosti ogrodja v vodni medij. Proces globinske erozije avtokatalizirajo kisli produkti hidrolize (mlečna kislina in fragmenti s končnimi kislimi skupinami). Višja koncentracija mlečne kisline vpliva na nižji pH kopolimernega filma, kjer esterske vezi hidrolizirajo hitreje kot v nevtralnem mediju. Pri hidrolizi TMC segmentov nastaja kot razpadni produkt CO_2 . CO_2 je prešibka kislina, ki bi povzročala avtokatalizo, torej kopolimeri z velikim delež TMC razpadajo bistveno počasneje v primerjavi s kopolimeri s prevladujočo vsebnostjo DLLA v polimerni verigi (42).

Vpliv vsebnosti monomerov TMC in DLLA v kopolimerih na hitrost in vrsto erozije se izrazito odraža v časovnem obdobju med 6. in 8. tednom. Delež TMC večji od 70 %, kopolimeru omogoča minimalen razpad in ohranjanje skoraj konstantne mase, medtem ko kopolimera z vsebnostjo DLLA višjo od 80 % izgubita več kot 22 % začetne mase. V tem časovnem obdobju vidimo, da že majhna sprememba vsebnosti DLLA med kopolimeroma DLLA 68 in DLLA 84 izrazito vpliva na delež razpada kopolimera (slika 14). Kopolimeri z visoko vsebnostjo DLLA dosežejo kritično molekulsko maso, zato kopolimerno ogrodje

izgubi strukturno integriteto. Dolžina verige kopolimera se zaradi razgradnje skrajša, kar vodi v manjše število interakcij med verigami in povečanje prostega volumna polimernega ogrodja. Na površini ogrodja se polimerne verige razpletejo in skupaj z razpadlimi fragmenti iz notranjosti ogrodja odplavljajo v okoliški medij, kar je vzrok za obsežno izgubo mase kopolimerov s prevladujočo vsebnostjo DLLA v polimerni verigi. Po 3 mesecih vidimo enak trend kot po 8 tednih, le da so razlike v deležih razpada kopolimerov TMC – DLLA očitnejše zaradi stopnjevanja hitrosti avtokatalizirane globinske erozije in popolne izgube strukturne enovitosti kopolimernih filmov z velikimi deleži DLLA. Nasprotno pa so kopolimeri s prevladujočo vsebnostjo TMC v vodnem mediju izredno stabilni. Sprememba vsebnosti TMC (19–32 %) v kopolimerih, ki zapadejo procesu površinske erozije, nima takšnega vpliva na povečanje kinetike razpada kot sprememba vsebnosti DLLA v kopolimerih, za katere je značilna globinska erozija. Delež razpadle mase med 2. in 12. tednom znaša za kopolimer DLLA 19 0,67 % in za DLLA 32 1,22 %. Ugotovitve kažejo na dejstvo, da je karbonatna vez minimalno dovzetna za proces hidrolize, verjetno pa se masa kopolimerov z velikim deležem TMC zmanjšuje kot posledica razpada kratkih DLLA segmentov v verigah TMC – DLLA.

Na sliki 15 vidimo, da kopolimeri z vsebnostjo DLLA med 68 % in 84 % zapadejo enakemu trendu razpada in sicer globinski eroziji, ki je značilnost kopolimerov TMC – DLLA z vsebnostjo DLLA večjo od 40 % DLLA. Potrdimo lahko, da so rezultati našega 3 mesečnega *in vitro* testa razpadnosti skladni z ugotovitvami predhodno izvedenih raziskav (42). Delež razpada je linearno odvisen od vsebnosti DLLA v kopolimeru (slika 15), kar nam omogoča napovedovanje deleža razpada kopolimerov s spremenljivo vsebnostjo DLLA (40–100 %). Vsebnost hidrofilnega monomera DLLA izrazito vpliva na hitrost in delež končnega razpada kopolimerov, ki so pod vplivom globinske erozije. Kopolimer DLLA 68 med 2. in 12. tednom izgubi 29 % začetne mase, medtem ko v enakem časovnem obdobju razpade 58 % kopolimera DLLA 84. Rezultat nakazuje na enkrat hitrejšo razgradnjo DLLA 84 kot posledico avtokatalizirane globinske erozije zaradi višje koncentracije razpadnih produktov mlečne kisline in fragmentov s kislimi končnimi skupinami.



Slika 15: Delež razpada kopolimerov TMC – DLLA med 2. in 12. tednom v odvisnosti od vsebnosti D,L–laktida v kopolimeru.

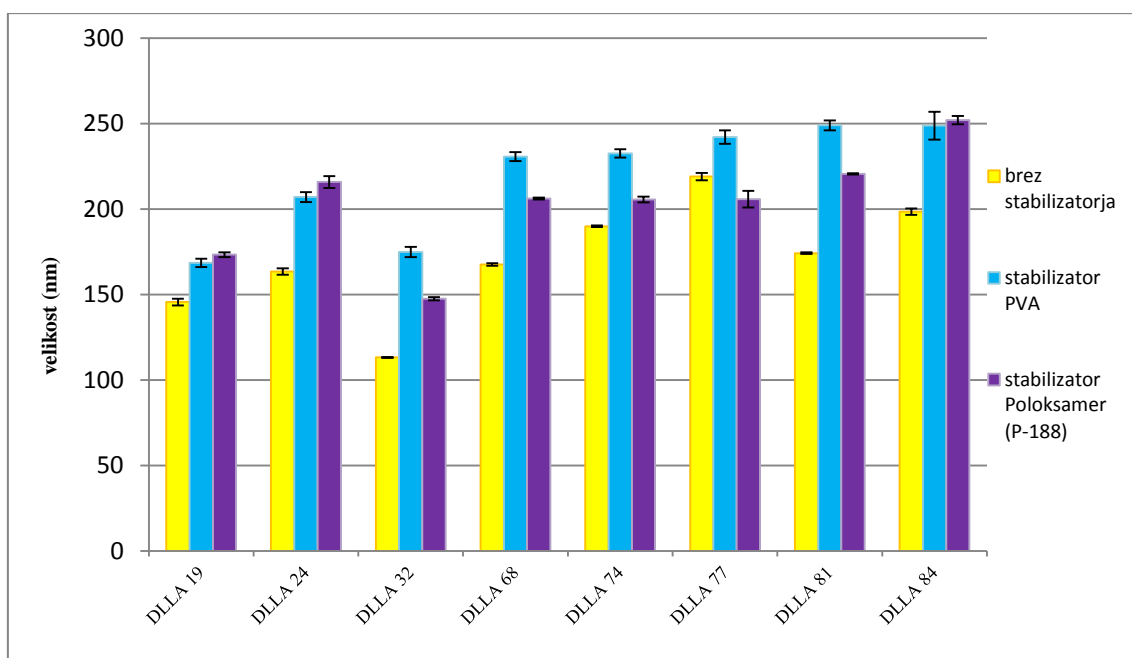
Iz navedenih rezultatov lahko povzamemo, da z razmerjem monomerov TMC in DLLA v produktu vplivamo na vrsto in kinetiko razpada ter na obseg avtokatalize, kar posledično pomeni razlike v razpolovnih časih kopolimerov TMC – DLLA. Sintetizirani kopolimeri TMC – DLLA so glede na literaturne podatke varni, saj sta produkta popolne razgradnje mlečna kislina in CO₂, netoksična in se iz telesa odstranjujeta s fiziološkim procesom dihanja in z metabolizmom v Krebsovem ciklu (11). Za uporabo v medicinske namene so primernejši kandidati kopolimeri z večjo vsebnostjo DLLA (68–84 %), saj lahko z izbiro ustreznega razmerja med monomernimi enotami v polimeru bolj vplivamo na čas razgradnje kot pri kopolimerih z večjo vsebnostjo TMC. Globinska erozija teh kopolimerov omogoča hitro resorbcijo z mesta implantacije, ko pride zaradi razgradnje do izgube mehanske trdnosti, kar zmanjša možnost pojava zakasnele imunske reakcije v tkivu. Pred uporabo bi morali preveriti njihovo biokompatibilnost ter preučiti mehanske lastnosti (natezna trdnost, Youngov modul) glede na specifične lastnosti posamezne aplikacije. Kopolimeri z vsebnostjo DLLA med 50 % in 90 % so relativno močni elastomeri, ki ohranjajo svoje mehanske lastnosti v *in vitro* okolju do 3 mesece, kar omogoča njihovo uporabo na področju fiksacijskih naprav pri zlomih kosti (ploščice, vijaki) ter za izdelavo 3–D ogrodij v tkivnem inženirstvu različnih tkiv kot npr. ledvic, srca in živčnih kanalov (43).

4.4. IZDELAVA NANODELCEV

Iz biorazgradljivih kopolimerov TMC – DLLA smo izdelali nanodelce z uporabo metode difuzije topila (angl. solvent displacement method). Metodo smo izbrali glede na lastnosti kopolimerov; poleg tega je metoda hitra in enostavna, saj se celoten postopek izvede v enem koraku. Pri injiciranju raztopine kopolimera v acetonu v bidestilirano vodo (z ali brez stabilizatorja) pride do hitre difuzije molekul acetona v disperzni medij in zato nastopi desolvatacija kopolimera. Le–ta se obori v obliki nanodelcev, saj pride do turbulenc na medfazi ob stiku acetona in disperznega medija. Te turbulence nastopijo zaradi razlik v površinski napetosti obeh tekočin, kar povzroči tok topila (acetona) z območja nižje površinske napetosti v območje višje površinske napetosti (disperzni medij) ter nastanek vrtincev na medfazi (Gibbs – Marangonijev učinek). Najprej smo poskusili izdelati nanodelce iz 5 % (m/v) raztopine kopolimera v acetonu, vendar niso nastali nanodelci, ampak je polimer izpadel iz disperznega medija v obliki oborine. Disperzije kopolimerov z višjo vsebnostjo TMC so bile na videz mlečne, medtem ko so bili vzorci z večjim delež DLLA (68–84 %) na videz opalescentni, kopolimer pa se je oboril tudi v obliki kepice in večjih agregatov, ki so flotirali na gladini vzorca. Nato smo izdelali nanodelce iz raztopin s pol manjšo koncentracijo kopolimerov tj. 2,5 % (m/v). Vzorci so bili ponovno na videz mlečni z oborino, vendar je bila le–ta prisotna v veliko manjši meri. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo še bolj razredčili osnovno raztopino in pripravili nanodelce iz 0,5 % (m/v) raztopine kopolimerov v acetonu. V tem primeru smo dobili opalescentne disperzije brez prisotnih vidnih delcev oborine.

4.5. MERJENJE VELIKOSTI NANODELCEV

Nanodelcem, ki smo jih pripravili iz 2,5 % (m/v) raztopine kopolimerov TMC – DLLA v odsotnosti ali prisotnosti stabilizatorja (PVA, poloksamer 188(P – 188)) smo izmerili velikost delcev, saj smo želeli ugotoviti ali razmerje monomerov v polimerni verigi vpliva na velikost izdelanih nanodelcev (slika 16 in priloga 5).

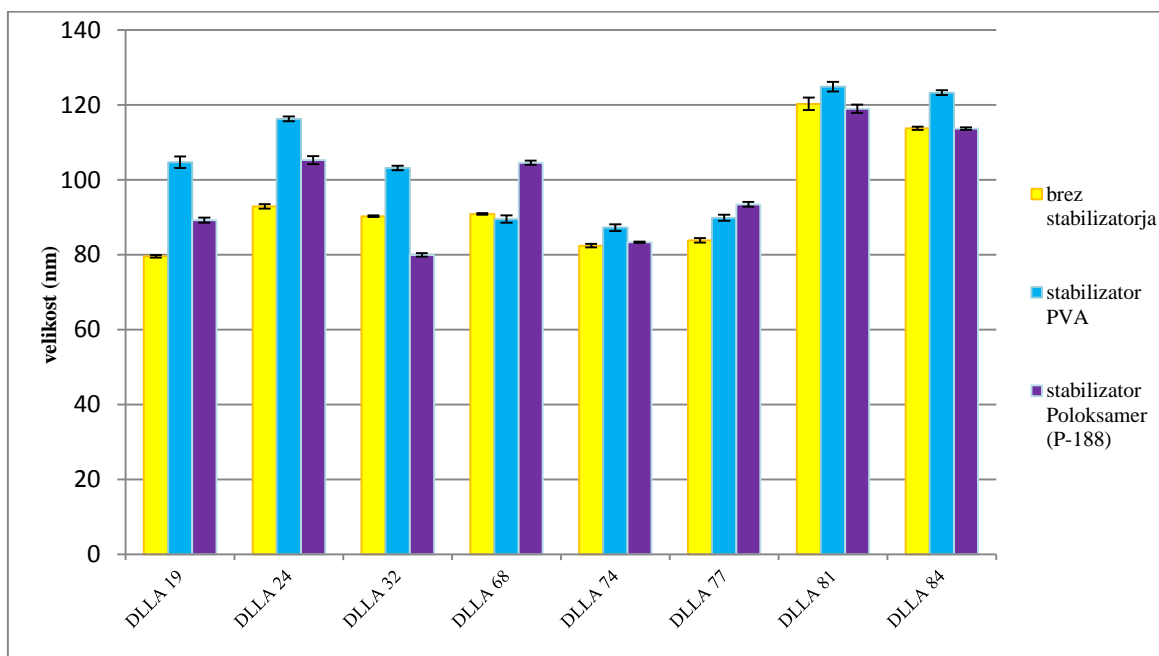


Slika 16: Velikost nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 2,5 % raztopine kopolimerov, v odvisnosti od deleža D,L–laktida v kopolimeru ter vpliv prisotnosti/odsotnosti stabilizatorja (PVA, Poloksamer 188 (P 188)). Meritve smo izvedli 24 h po izdelavi nanodelcev, ko je iz sistema izhlapel acetone.

Iz slike 16 razberemo, da smo najmanjše nanodelce izdelali v mediju brez stabilizatorja. Rezultat analize je v skladu z našimi pričakovanji, saj adsorpcija stabilizatorjev PVA in P – 188 na površino nanodelcev poveča njihov hidrodinamski premer. Velikost nanodelcev brez stabilizatorja je v območju 113 – 219 nm, kar nakazuje na vpliv sestave kopolimera na velikost izdelanih nanodelcev. Manjše nanodelce smo izdelali iz kopolimerov z večjo vsebnostjo TMC, zaradi hitrejše difuzije molekul topila v disperzni medij. Hitrost difuzije je pri konstantnih procesnih parametrih (hitrost mešanja in injiciranja, temperatura, koncentracija kopolimera, volumsko razmerje sistema organsko topilo/disperzni medij) funkcija interakcijskega parametra organsko topilo – kopolimer (χ). Molekule acetona imajo manjšo afiniteto do daljših in lipofilnejših TMC zaporedij ($\uparrow\chi$) v kopolimeru, kar vodi v hitrejšo difuzijo organskega topila s teh področij in večjo medfazno turbolenco ter obarvanje kopolimera v obliki nanodelcev z manjšim premerom (44). Iz enakega razloga vidimo, da se največji nanodelci oborijo v primeru kopolimerov z deležem DLLA 77 % (219 nm) in 84 % (199 nm) v polimerni verigi. S stabilizatorjema PVA in P - 188 smo izdelali nanodelce z velikostjo 169 – 249 nm in 173 – 252 nm. Največje nanodelce s PVA in P – 188 dobimo iz kopolimerov z deležem DLLA večjim od 80 %, medtem ko najmanjši nanodelci nastanejo iz kopolimerov DLLA 19 in DLLA 32. Na podlagi grafikona 16 lahko sklepamo, da ima PVA večjo afiniteto za adsorpcijo na površino delcev iz kopolimerov s

prevladujočim deležem DLLA (68–84 %) v primerjavi s P – 188, medtem ko sta afiniteti stabilizatorjev do nanodelcev iz kopolimerov z deležem DLLA 19 % in 24 % zelo podobni, saj se oborijo nanodelci praktično enakih velikosti. V prisotnosti stabilizatorja PVA nastanejo nanodelci podobnih velikost ne glede na razmerje monomerov v kopolimeru, kar je posebno opazno v primeru kopolimerov DLLA 68– DLLA 84.

V prilogi 5 vidimo vrednosti PdI nanodelcev izdelanih brez stabilizatorja in s stabilizatorjema PVA in P – 188. Vrednosti PdI so za vse disperzije manjše od 0,30, kar pomeni, da so izdelani nanodelci dokaj enotni po velikosti tj. nimamo zelo široke porazdelitve velikosti delcev v vzorcu. Najnižje vrednosti PdI smo dobili pri nanodelcih, ki smo jih izdelali v odsotnosti stabilizatorja (0,07–0,19), nato so sledili vzorci, ki smo jih izdelali v prisotnosti P – 188 (0,07–0,22) in največje za tisti, ki smo jih stabilizirali s PVA (0,09–0,28). V vseh primerih so imele disperzije nanodelcev iz kopolimerov s prevladujočo vsebnostjo TMC nižje vrednosti PdI in sicer najnižjo vrednost za nanodelce iz polimera z najvišjo vsebnostjo monomera TMC (DLLA 19) v polimerni verigi (0,07–0,09). Tako nizka vrednost PdI kaže, da je bila v tem vzorcu prisotna populacija nanodelcev zelo enotne velikosti.



Slika 17: Velikost nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 0,5 % raztopine kopolimerov, v odvisnosti od množinskega deleža D,L–laktida v kopolimeru ter vpliv prisotnosti/odsotnosti stabilizatorja (PVA, Poloksamer 188 (P 188)). Meritve smo izvedli 24 h po izdelavi nanodelcev, ko je iz sistema izhlapel aceton.

Pri izdelavi nanodelcev iz 0,5 % (m/v) raztopine kopolimerov v acetonu vidimo manjšo povprečno velikost nanodelcev kot pri nanodelcih, ki smo jih izdelali iz 2,5 % (m/v) raztopine; neodvisno od prisotnosti stabilizatorja (Slika 17; priloga 6). Rezultat je pričakovan, saj imajo raztopine z nižjo koncentracijo kopolimera manjšo viskoznost, kar vodi v hitrejšo difuzijo organskega topila v disperzni medij (večja medfazna turbolenca) in tvorbo nanodelcev manjših velikosti (30).

Nanodelci izdelani iz 0,5 % (m/v) raztopine kopolimerov brez stabilizatorja izkazujejo enak trend kot ga opazimo pri nanodelcih izdelanih iz 2,5 % (m/v) raztopine kopolimerov. Večji kot je delež hidrofilnega dela v kopolimeru (tj. segmenti DLLA) večja je možnost, da polimer vstopa preko vodikovih vezi v interakcije s topilom. Posledično nižja hitrost difuzije topila v disperzni medij prispeva k obarjanju večjih nanodelcev kot pri kopolimerih s prevladujočim deležem TMC v polimerni verigi. Velikost nanodelcev brez stabilizatorja je v območju 80–120 nm. Najmanjši nanodelci nastanejo v primeru kopolimera DLLA 19, medtem ko največje nanodelce dobimo iz kopolimerov z deležem DLLA večjim od 80 %; povprečna velikost le-teh je večja od 110 nm. Vmesna razmerja monomerov TMC in DLLA dajejo izredno nanodelce zelo podobnih velikosti nanodelce tj. v območju 83–93 nm.

V prisotnosti stabilizatorja PVA so nastali nanodelci s povprečno velikostjo v območju 87–125 nm. Najmanjši nanodelci so v tem primeru nastali iz polimerov z množinskim deležem DLLA 74–77 %. Ti nanodelci so se med seboj le minimalno razlikovali po velikosti. Pri teh kopolimerih lahko sklepamo, da je učinek stabilizacije s PVA minimalen, saj so razlike v povprečni velikosti teh nanodelcev in nanodelcev, ki smo jih izdelali v odsotnosti stabilizatorja, skoraj neznatne (0–5 nm). Nanodelci z največjim premerom so nastali iz kopolimerov DLLA 81 in DLLA 84. Povprečna velikost le-teh je večja od 120 nm. Stabilizator PVA ima večjo afiniteto do površine nanodelcev iz kopolimerov z vsebnostjo TMC večjo od 68 %.

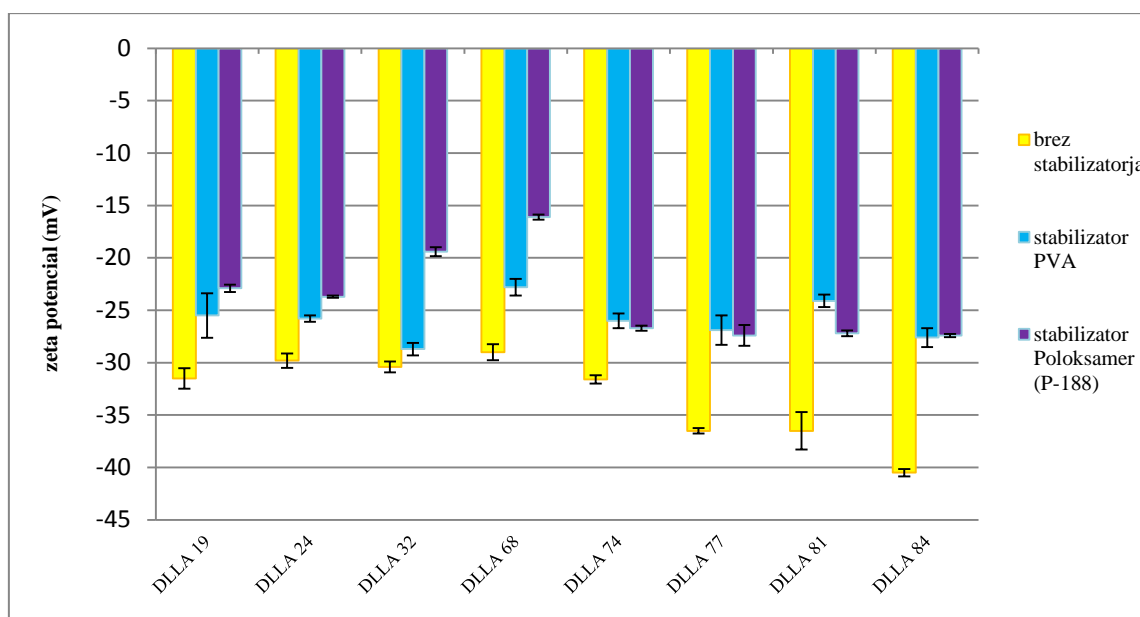
Velikost nanodelcev s stabilizatorjem P–188 je v območju 83–119 nm. Nanodelce z največjim premerom smo izdelali iz kopolimerov z deležem DLLA v polimerni verigi večjim od 80 %, najmanjše pa iz kopolimerov DLLA 32 in DLLA 74. Pri teh razmerjih vidimo minimalni učinek prisotnosti stabilizatorja P – 188 na povprečno velikost nanodelcev, saj so velikosti nanodelcev primerljive z velikostmi nanodelcev, ki smo jih

izdelali brez stabilizatorja. Največji učinek ima prisotnost amfifilnega P – 188 na velikost nanodelcev, ki smo jih izdelali v prisotnosti kopolimerov z deležem TMC večjim od 75 %, kar si razlagamo z večjo afiniteto hidrofobnega propilenoksidnega bloka P – 188 do TMC zaporedij v kopolimeru, zato je sterična stabilizacija bolj učinkovita.

V prilogi 6 vidimo PDI vrednosti izdelanih nanodelcev iz 0,5 % raztopine kopolimerov TMC – DLLA brez stabilizatorja in s stabilizatorjema PVA in P – 188. Najnižje vrednosti PDI so imele disperzije nanodelcev, ki smo jih izdelali v prisotnosti stabilizatorja P – 188 (0,094– 0,126), nato tiste izdelane brez stabilizatorja (0,1–0,136) in največje tiste, ki smo jih izdelali v prisotnosti PVA (0,130–0,248). Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da lahko s koncentracijo raztopine polimera vplivamo na polidisperznost izdelanih nanodelcev. Torej, PDI vrednosti za disperzije nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 0,5 % raztopine so nižje kot pri izdelavi nanodelcev iz 2,5 % raztopine kopolimerov, kar nakazuje na večjo homogenost nanodelcev, ki smo jih izdelali iz raztopin z nižjo koncentracijo kopolimerov. Na podlagi eksperimentalnih rezultatov izdelave nanodelcev v odsotnosti stabilizatorja lahko zaključimo, da lahko vplivamo na velikost izdelanih nanodelcev s spreminjanjem koncentracije kopolimera v topilu in razmerja monomerov TMC in DLLA v kopolimeru. Pri izdelavi nanodelcev iz 0,5 % in 2,5 % raztopine kopolimerov so imele izdelane disperzije nanodelcev vrednost PDI < 0,3, kar nakazuje na dokaj homogeno velikost delcev v vzorcu. Stabilizatorja PVA in P – 188 nimata bistvenega vpliva na poenotenje velikosti nanodelcev. Nanodelci s P – 188 imajo izredno podobne vrednosti PDI kot nanodelci izdelani brez stabilizatorja, medtem ko prisotnost stabilizatorja PVA celo nekoliko poveča polidisperznost vzorcev. Smiselnost uporabe stabilizatorjev PVA in P – 188 bi morali še dodatno ovrednotiti s spremljanjem velikosti nanodelcev med procesom shranjevanja vzorcev v daljšem časovnem obdobju in s tem preučiti sterični vpliv na stabilnost izdelanih disperzij nanodelcev.

4.6. MERJENJE ZETA POTENCIALA NANODELCEV

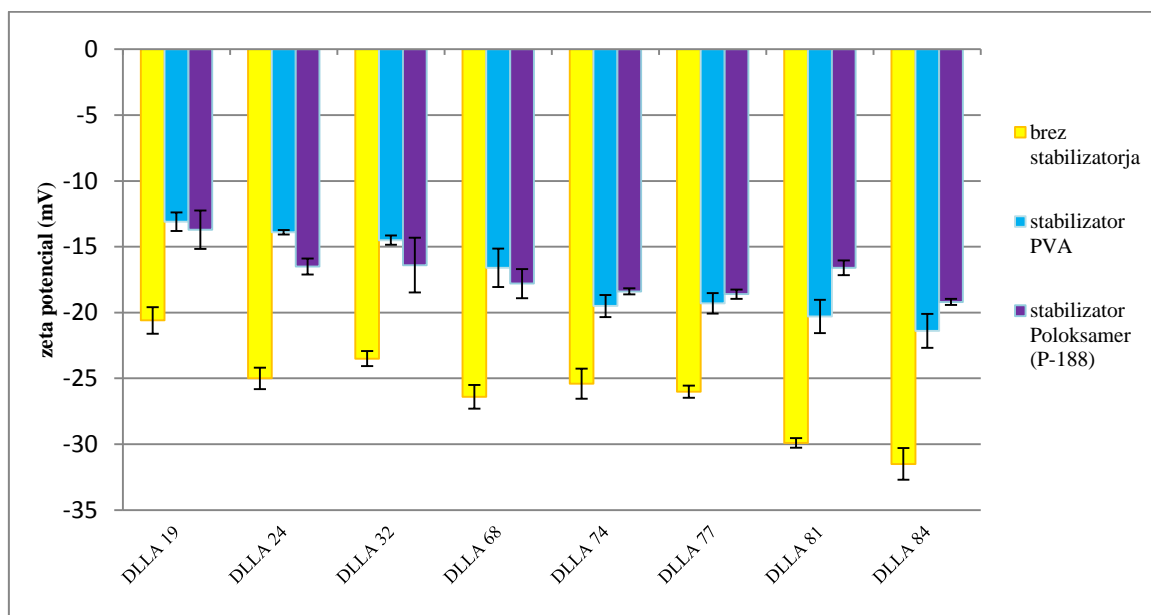
Nanodelcem, ki smo jih izdelali iz 2,5 % raztopine kopolimerov brez stabilizatorja, s stabilizatorjema PVA in P – 188 v acetonu, smo izmerili zeta potencial dan po izdelavi, da bi ugotovili, ali je vrednost zeta potenciala odvisna od razmerja monomerov TMC in DLLA v kopolimeru (slika 18, priloga 5).



Slika 18: Zeta potencial nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 2,5 % raztopine kopolimerov, v odvisnosti od deleža DLLA v kopolimeru ter vpliv prisotnosti/odsotnosti stabilizatorja (PVA, Poloksamer 188 (P 188)). Meritve smo izvedli 24 h po izdelavi nanodelcev, ko je iz sistema izhlapel aceton.

Nanodelci izdelani v disperznem mediju brez stabilizatorja imajo večjo negativno vrednost zeta potenciala, ki narašča z vsebnostjo DLLA v kopolimeru in se giblje od -30 mV do -41 mV (slika 18). Kopolimeri TMC – DLLA vsebujejo na koncu verige proste karboksilne ali hidroksilne skupine. Negativni zeta potencial nanodelcev izvira iz prisotnosti prostih končnih karboksilnih skupin v verigah kopolimerov. Te proste končne karboksilne skupine so prisotne pri vseh razmerjih monomerov TMC in DLLA. Večji delež DLLA v kopolimeru poveča verjetnost, da se na koncu verige pojavi prosta karboksilna skupina, kar ima za rezultat večji negativni zeta potencial nanodelcev. Z uporabo stabilizatorjev PVA in P – 188 se zeta potencial zniža v povprečju za 10–15 mV. Pri PVA in P – 188 vidimo minimalne razlike v vrednosti zeta potenciala, kar nakazuje na podobno afiniteto stabilizatorjev do kopolimerov TMC – DLLA. V prisotnosti stabilizatorjev PVA in P – 188 je vrednost zeta potenciala nanodelcev iz kopolimerov z deležem DLLA večjim od 74 % precej podobna (24 mV–27 mV). Pri nanodelcih iz kopolimerov DLLA 68, DLLA 81 in DLLA 84 vidimo največje razlike zeta potenciala v primerjavi z nanodelci izdelanimi brez stabilizatorja. Rezultat je verjetno posledica učinkovite adsorpcije PVA in P – 188 na površino nanodelcev, saj je pri teh razmerjih največja razlika v velikost nanodelcev v primerjavi z disperzijami nanodelcev brez stabilizatorja (slika 16).

Primerjali smo tudi zeta potencial nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 0,5 % raztopine kopolimerov TMC – DLLA v acetonu: brez stabilizatorja, s stabilizatorjema PVA in P – 188 dan po izdelavi (slika 19, priloga 6).



Slika 19: Zeta potencial nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 0,5 % raztopine kopolimerov, v odvisnosti od deleža DLLA v kopolimeru ter vpliv prisotnosti/odsotnosti stabilizatorja (PVA, poloksamer 188 (P 188)). Meritve smo izvedli 24 h po izdelavi nanodelcev, ko je iz sistema izhlapel aceton.

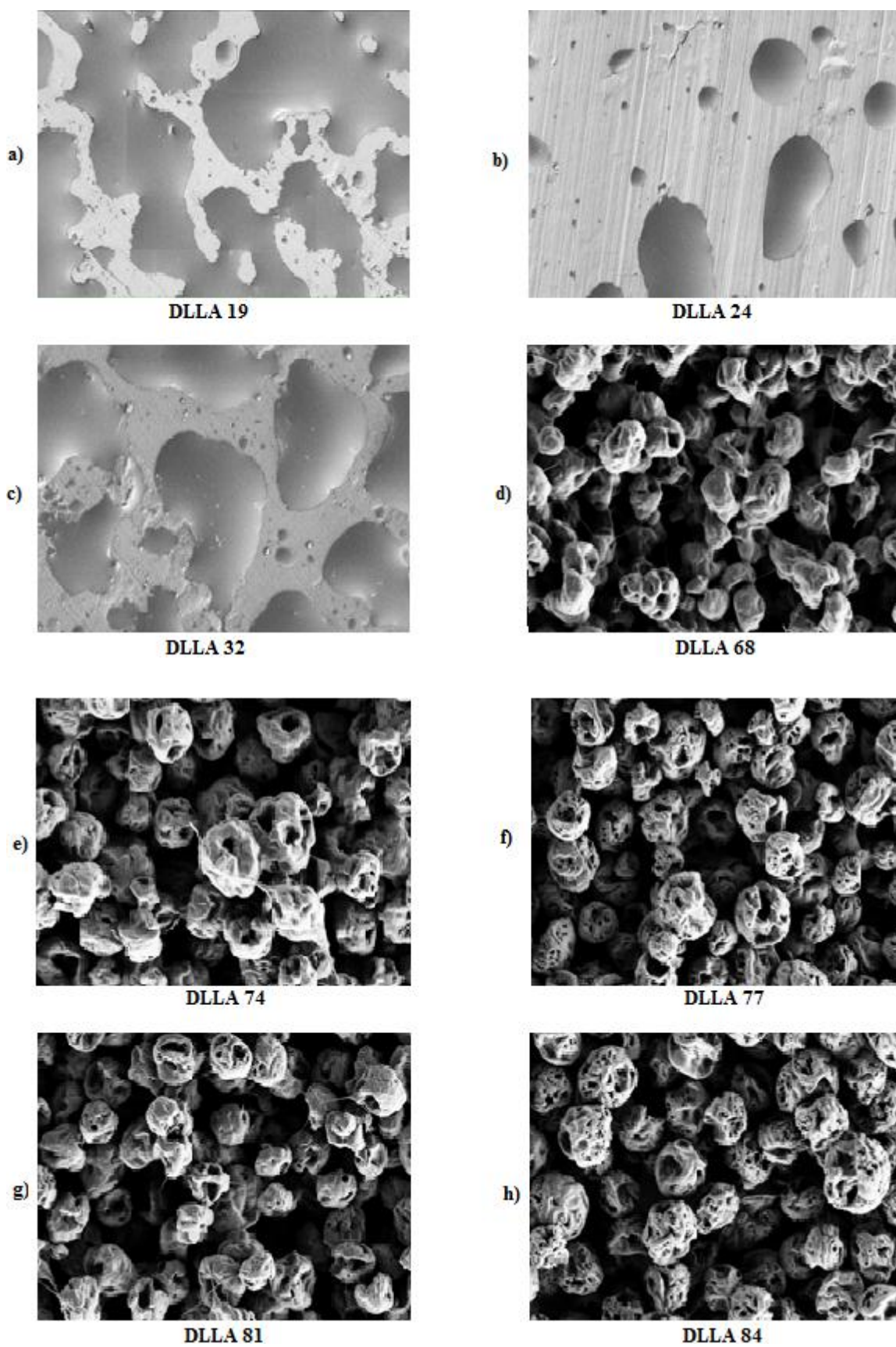
Pri nanodelcih izdelanih iz 0,5 % raztopine kopolimerov v odsotnosti stabilizatorja vidimo enak trend kot pri nanodelcih, ki smo jih izdelali iz 2,5 % raztopine kopolimerov v acetonu tj. naraščanje negativne vrednosti zeta potenciala z večanjem vsebnosti DLLA v kopolimeru (slika 19). Vrednosti zeta potenciala nanodelcev brez stabilizatorja so v območju od -21 do -31 mV. V prisotnosti stabilizatorjev P – 188 in PVA imajo nanodelci zeta potencial v območju od -14 do -19 mV in od -13 do -21 mV, kar nakazuje na podobno afiniteto obeh stabilizatorjev do nanodelcev. V prisotnosti stabilizatorjev opazimo, da je zeta potencial skoraj neodvisen od vrste kopolimera. Iz tega sklepamo, da že tanek film stabilizatorja učinkovito zasenči naboj same površine nanodelcev. Pri nanodelcih z majhnim deležem TMC (DLLA 81 in DLLA 84) v kopolimeru vidimo največje razlike vrednosti zeta potenciala v primerjavi z nanodelci, ki smo jih izdelali v odsotnosti stabilizatorja (10–12 mV).

Meritve zeta potenciala smo izvedli z namenom, da bi ugotovili, ali so izdelane disperzije nanodelcev fizikalno stabilne. Koloidni sistemi z absolutno vrednostjo zeta potenciala

večjo od 30 mV smatramo za stabilne. V tem območju zeta potenciala delujejo na delce močne elektrostatske odbojne sile, ki omogočajo ohranjanje ustrezne razdalje med delci in preprečujejo njihovo agregacijo, kar zagotavlja stabilnost nanodisperznega sistema. Za koloidne sisteme, ki so poleg elektrostatske, stabilizirani tudi s steričnimi stabilizatorji, se za stabilne sisteme smatra absolutna vrednost zeta potenciala večja od 20 mV, saj se stabilnost sistema doseže s kombinacijo elektrostatskega in steričnega učinka. Iz zgoraj navedenih rezultatov meritev zeta potenciala vidimo, da imajo nanodelci izdelani iz 0,5 % raztopine kopolimerov, ki imajo v verigi večji delež TMC, vrednost zeta potenciala manjšo od -25 mV. Ta naboj je premajhen, da bi bile te disperzije dolgotrajno fizikalno stabilne. Stabilne nanodelce brez stabilizatorja in s stabilizatorjema PVA ter P – 188 je možno izdelati le iz kopolimerov z vsebnostjo DLLA večjo od 80 %, kjer z dovolj velikim deležem prostih karboksilnih skupin zagotovimo zadosten elektrostatski odboj med delci. Nanodelci, ki smo jih izdelali iz 2,5 % raztopine kopolimerov TMC – DLLA brez stabilizatorja izkazujejo vrednosti zeta potenciala manjše od -30 mV in jih smatramo za stabilne neodvisno od razmerja DLLA in TMC v kopolimeru. Zeta potencial nanodelcev s stabilizatorjema PVA in P – 188 je v območju od -20 do -28 mV, kar pomeni, da so te disperzije ustrezno stabilizirane s kombinacijo elektrostatske in sterične stabilizacije. Za izdelavo nanodelcev (brez stabilizatorja, PVA, P – 188) bi bilo smiselno uporabiti kopolimere s prevladujočo vsebnostjo DLLA oz. večjo od 68 %, saj z večjo negativno vrednostjo zeta potenciala povečamo stabilnost nanodisperznega sistema v smislu preprečevanja agregiranja nanodelcev. V tehnologiji predstavljajo hidrofobni negativno nabiti nanodelci na osnovi TMC - DLLA obetavne kandidate za vnos lipofilnih nenabitih ali kationskih učinkovin. V primeru kationskih učinkovin pride do elektrostatskih interakcij med učinkovino in kopolimerom, kar lahko pripomore k učinkovitemu vgrajevanju učinkovin v polimerno ogrodje nanodelcev.

4.7. MORFOLOGIJA VZORCEV ELEKTROAZPRŠEVANJA

Z vrednotenjem morfologije vzorcev s SEM smo ugotovimo, da z elektrorazprševanjem raztopine kopolimerov v acetonu pri izbranih eksperimentalnih pogojih niso nastala nanovlakna, ampak polimerni filmi in mikrodenci (slika 20:a-h).



Slika 20 (a–h): Morfologija vzorcev elektrorazprševanja nasičene raztopine ko-polimerov TMC-DLLA v odvisnosti od deleža DLLA v kopolimeru. Slike so posnete z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35 VP pri 10000 kratni povečavi.

Proces elektrorazprševanja poteka tako, da z visoko napetostjo na konici injekcijske igle ustvarimo ustrezen naboj raztopine, ki jo razpršujemo, kar omogoči, da Columbove odbojne sile (elektrostatske sile) raztopine premagajo njeno površinsko napetost. Takrat se hemisferična oblika kapljice preoblikuje v koničasto obliko, t.i. Taylorjev stožec, kjer se inducira popoln razpad kapljice na nanometrsko velikost, napetostna razlika med injekcijsko iglo in zbiralcem pa omogoči prenos raztopine v smeri nižje napetosti, torej proti zbiralcu. Polimerni filmi so nastali iz kopolimerov TMC-DLLA z deležem TMC večjim od 70 % v polimerni verigi (slika 20 a–c), kar je posledica nizke temperature steklastega prehoda teh kopolimerov (od $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$), torej so med procesom elektrorazprševanja v amorfne zmečkanem stanju (viskozne tekočine). Z večanjem izvorne napetosti smo opazili nastanek Taylorjevega stožca, iz katerega izhaja ozek curek raztopine, ki potuje proti zbiralcu, vendar se posamične kapljice kopolimera na zbiralcu združujejo, kar vodi v tvorbo polimernih filmov. Z elektrorazprševanjem raztopin kopolimerov, ki so pri sobni temperaturi v steklasti amorfni obliki (DLLA 68–DLLA 84), smo izdelali mikrodolge s porozno strukturo (slika 20 d–h). Iz kopolimerov z velikim deležem DLLA bi teoretično lahko izdelali polimerna nanovlakna, vendar bi morali procesne parametre elektrorazprševanja optimizirati (npr. izvorno napetost, razdaljo do zbiralca, koncentracijo in hitrost pretoka raztopine). Na možnost izdelave nanovlaken ima poleg procesnih parametrov zelo velik vpliv viskoznost raztopine kopolimera, ki jo razpršujemo. Željeno je, da polimere raztopimo v organskem topilu, v katerem imajo polimeri veliko topnost, saj tako dosežemo ustrezno viskoznost raztopine. Visoka koncentracija polimera omogoča učinkovito prepletanje polimernih verig med raztezanjem viskozne tekočine v električnem polju, kar omogoči nastanek nanovlaken. Predvidevamo, da je ravno nizka viskoznost raztopine kopolimerov TMC–DLLA ključen vzrok, da z elektrorazprševanjem niso nastala nanovlakna, vendar koncentracije raztopine kopolimera nismo mogli zvečati, saj smo elektrorazprševanje izvedli z nasičeno raztopino kopolimera v acetonu. Iz rezultatov predhodno izvedenih analiz ugotovimo, da je polimerna nanovlakna možno izdelati iz 14 % (m/v %) raztopine kopolimera na osnovi TMC (15 %) in L–laktida (85 %) v zmesi diklorometan/dimetilformamid (5), medtem ko v literaturi podatka o izdelavi nanovlaken iz kopolimera TMC–DLLA nismo zasledili.

5. SKLEP

- Kopolimere TMC – DLLA z deležem DLLA med 19 % in 84 % smo sintetizirali z uporabo katalizatorja kositrovega(II) 2–etilheksanoata. Izkoristki sinteze so bili v območju med 87,5 % in 98,5 %. Mehanizem polimerizacije je koordinativno insercijski z odpiranjem obroča. Potek sinteze smo skrajšali za 24 ur v primerjavi z literaturnimi podatki, kar je dodana vrednost naše sinteze.
- Iz NMR spektrov smo določili razmerje monomerov v kopolimerih. Kopolimeri niso vsebovali nezreagiranih monomerov; torej smo z ustrezno načrtovano sintezo in metodo izolacije pripravili kopolimere ustrezne čistote.
- Z DSC analizo smo ugotovili, da so bili vsi kopolimeri amorfni, neodvisno od razmerja monomerov v polimerni verigi. Temperatura steklastega prehoda linearno narašča z deležem DLLA v kopolimeru. Kopolimeri z velikim deležem TMC so pri sobni temperaturi v zmehčanem amorfem stanju, medtem ko so kopolimeri z vsebnostjo DLLA večjo od 68 % v steklasti amorfni obliki. Steklasto stanje kopolimerov z deležem DLLA večjim od 80 % se ohrani tudi pri telesni temperaturi, torej so le–ti primernejši za uporabo v medicinske namene.
- Iz rezultatov *in vitro* testa razpadnosti smo ugotovili, da lahko z razmerjem monomerov TMC in DLLA v kopolimeru vplivamo na hitrost in vrsto erozijskega procesa ter posledično na razpolovni čas kopolimerov. Ugotovili smo, da hidrofoben značaj kopolimerov narašča z deležem TMC v polimerni verigi. Visoka vsebnost monomera TMC preprečuje prodiranje molekul vode v polimerno ogrodje, torej se ti kopolimeri razgrajujejo s površinsko erozijo in izgubljajo maso linearno s časom. Kopolimeri z deležem DLLA večjim od 68 % se razgrajujejo z globinsko erozijo, ki jo avtokatalizirajo kisli produkti razpada, zato le–ti razpadajo bistveno hitreje kot kopolimeri s prevladujočo vsebnostjo TMC v polimerni verigi. Po treh mesecih razpada vidimo, da so kopolimeri s prevladujočo vsebnostjo DLLA izgubili med 30–55 % začetne mase, medtem ko kopolimeri z velikim deležem TMC razpadejo manj kot 4 %. Kopolimeri z velikim deležem DLLA so primernejši za izdelavo medicinskih vsadkov, saj vzdržujejo strukturo polimernega ogrodja v vodnem mediju do osem tednov.
- Z metodo elektrorazprševanja smo izdelali polimerne mikrodcelce le iz kopolimerov z deležem DLLA večjim od 68 %, saj so le–ti pri sobni temperaturi v steklastem amorfem stanju.

- Iz kopolimerov smo z metodo nanoprecipitacije izdelali nanodelce s povprečno velikostjo delcev od 80 do 252 nm in z zeta potencialom od – 13 do – 41 mv. Ugotovili smo, da velikost nanodelcev in absolutna vrednost zeta potenciala naraščata z deležem DLLA v kopolimeru in s koncentracijo kopolimera v organskem topilu. Nanodisperzije izdelane iz 2,5 % raztopine kopolimerov so fizikalno stabilne, v smislu preprečevanja agregacije nanodelcev, medtem ko iz 0,5 % raztopine kopolimerov lahko izdelamo stabilen koloiden sistem (zeta potencial manjši od - 30 mV) le iz kopolimerov z deležem DLLA večjim od 80 %. Povzamemo lahko, da smo izdelali dokaj homogene disperzije nanodelcev, saj je vrednost polidisperznega indeksa vseh vzorcev manjša od 0,3. Nanodelci zelo enotne velikosti nastanejo iz kopolimerov z vsebnostjo TMC večjo od 68 % v polimerni verigi. Pri izdelavi nanodelcev v prisotnosti polivinilalkohola in poloksamera 188 smo ugotovili, da prisotnost stabilizatorjev nimata bistvenega vpliva na poenotenje velikosti nanodelcev.

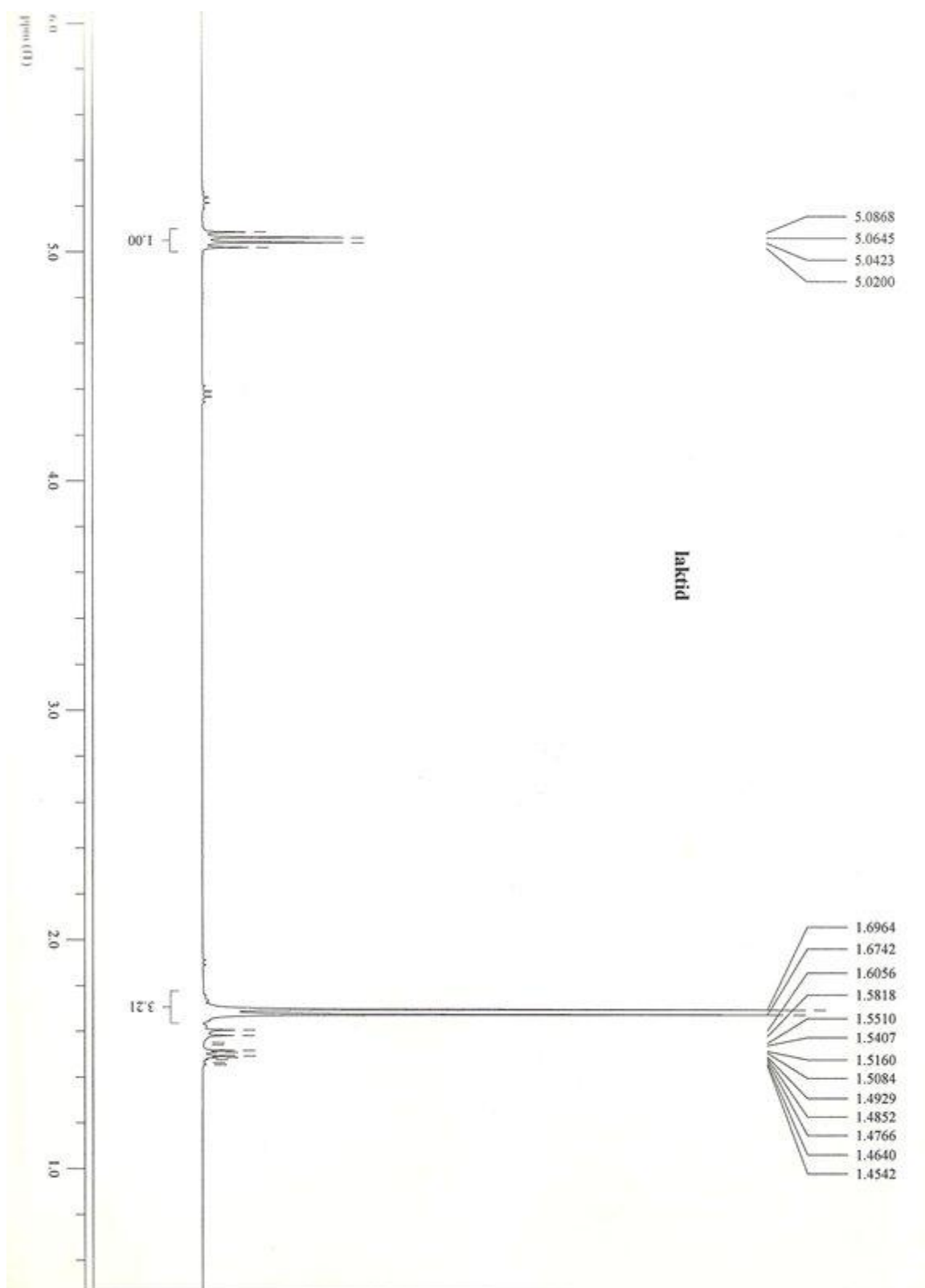
6. LITERATURA

- 1) Qiu L K, Bae Y H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* 2006; **23**: 1-30
- 2) Dailey L A, Wittmar M, Kissel T. The role of branched polyesters and their modification in the development of modern drug delivery vehicles. *J. Controlled Release* 2005; **101**: 137-149
- 3) Vroman I, Tighzert L. Biodegradable polymers. *Materials* 2009; **2**: 307-344
- 4) Nair L S, Laurencin C T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progr. Polym. Sci.* 2007; **32**: 762-798
- 5) Ji L J, Lai K L, He B, Wang G, Song L Q, Wu Y, Gu Z W. Study on poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate): synthesis and cell compatibility of electrospun film. *Biomed. Mater.* 2010; **5**: 45009-45017
- 6) Zhang Z, Kuijter R, Bulstra S K, Grijpma D W, Feijen J. The in vivo and in vitro degradation behaviour of poly(trimethylene carbonate). *Biomaterials* 2006; **27**: 1741-1748
- 7) Ikada Y, Tsuji H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.* 2000; **21**: 117-132
- 8) Tormala P, Pohjonen T, Rokkanen P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc Instn Mech Engrs.* 1998; **212**: 101-111
- 9) Neuendorf R E, Saiz E, Tomsia A P, Ritchie R O. Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds. *Acta Biomaterialia* 2008; **4**: 1288-1296
- 10) Sabir M I, Xiaoxue X, Li L. A review on biodegradable polymeric material for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci* 2009; **44**: 5713-5724
- 11) Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromol. Biosci.* 2002; **2**: 67-77
- 12) Folliguet T A, Rucker-Martin C, Pavoine C, Deroubaix E, Henaff M, Mercaider J J. Adult cardiac myocytes survive and remain excitable during long-term culture on synthetic supports. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; **121**: 510-519
- 13) Bos R R M, Rozema F B, Boering G, Nijenhuis A J, Pennings A J, Verwey A B, Jansen H W B. Degradation of and tissue reaction to biodegradable poly(L-lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats. *Biomaterials* 1991; **12**: 32-36
- 14) Sundback C, Hadlock T, Cheney M, Vacanti J. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials* 2003; **24**: 819-830
- 15) Ratner B D. *Biomaterial science: An introduction to materials in medicine* 2nd ed., Elsevier, San Diego, 2004: 121-126
- 16) Gunatillake P A, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European cells and materials.* 2003; **5**: 1-16

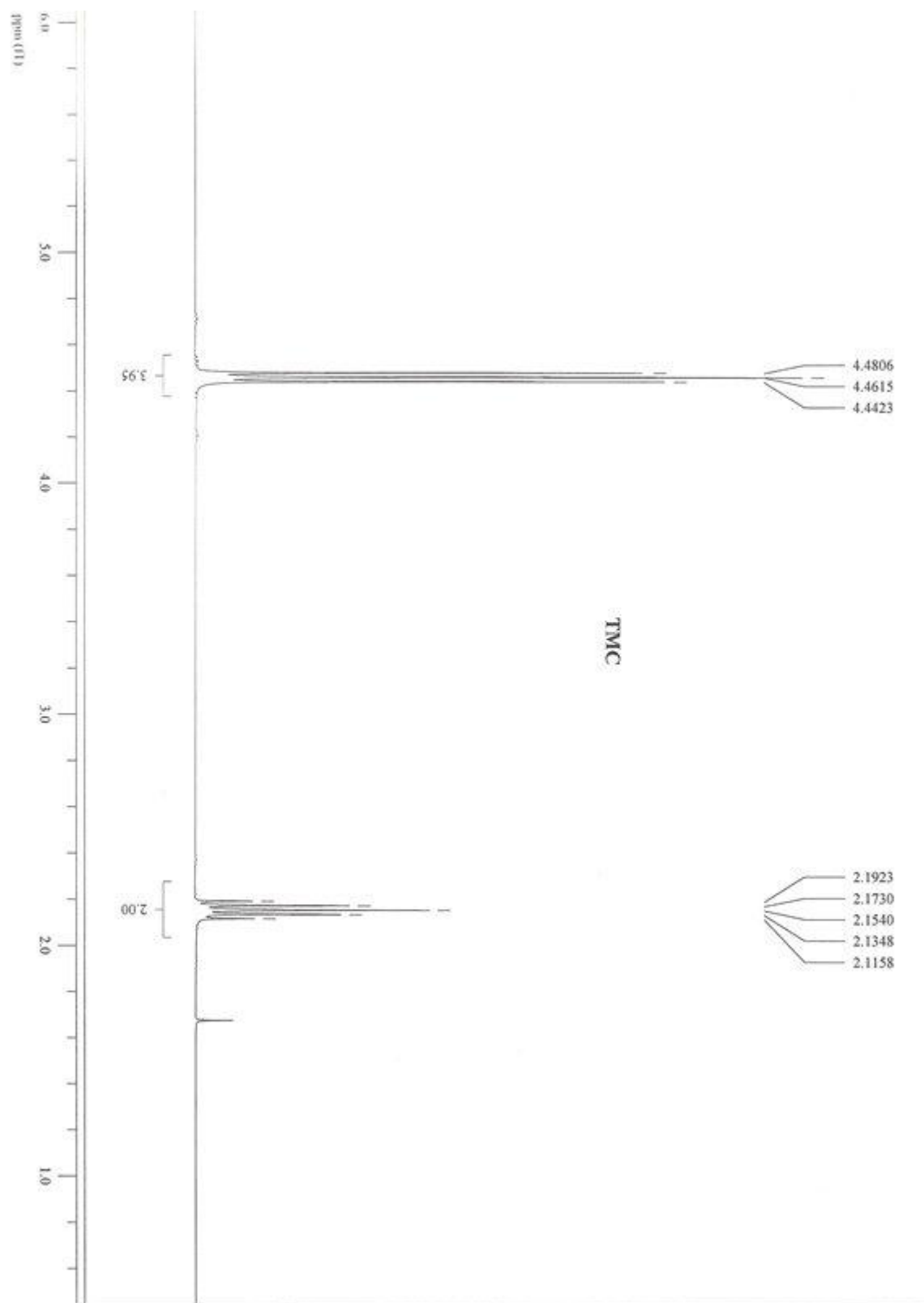
- 17) Maharana T, Mohanty B, Negi Y S. Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability. *Progr. Polym. Sci.* 2009; 34: 99-124
- 18) Kumar N, Langer R S, Domb A J. Polyanhydrides: An overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54: 899-910
- 19) Lucas N, Bienaime C, Belloy C, Queuneudec M, Silvestre F, Nava J E. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere* 2008; 73: 429-442
- 20) Torchilin V P: *Nanoparticulates as drug carriers*, Imperial College Press, London, 2006: 651-659
- 21) Huertas M C E, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 385: 113-142
- 22) Dong Y, Feng S S. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 342: 208-214
- 23) McCarthy J R, Perez J M, Brückner C, Weissleder R. Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. *Nano letters* 2005; 5: 2552-2556
- 24) Zhang Y, Zhuo R. Synthesis and drug release behaviour of poly(trimethylene carbonate)-poly(ethylene glycol)-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles. *Biomaterials* 2005; 26: 2089-2094
- 25) Panyam J, Labhasetwar V. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 2004; 1: 77-84
- 26) Patel D, Moon J Y, Chang Y, Kim T J, Lee G H. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, characterisation and in vivo study as MRI contrast agent. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2008; 313-314: 91-94
- 27) Kohane D S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering* 2007; 96: 203-209
- 28) Zeng X M, Martin G P, Marriott C. The controlled delivery of drugs to the lung. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 124: 149-164
- 29) Evans R, Napper D H. Steric stabilization I: Comparison of theories with experiment. *Colloids and polymer science* 1973; 251: 409-414
- 30) Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical sciences* 2005; 24: 67-75
- 31) Chognot D, Léonard M, Six J L, Dellacherie E. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2006; 51: 86-92
- 32) Gupta R B, Kompella U B: *Nanoparticle Technology for drug delivery*, Taylor & Francis Group, New York, 2006: 76-92

- 33) Soppimath K, Aminabhari T M, Kulkarni A R, Rudzinski W E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release* 2001; 70: 1-20
- 34) Wang Y, Yang J, Pfeffer R, Dave R, Michiniak B. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. *Powder technology* 2006; 164: 94-102
- 35) Frenot A, Chronakis I S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current opinion in colloid and interface science* 2003; 8: 64-75
- 36) Papadimitriou S, Bikiaris D, Avgoustakis K, Karavas E, Georgarakis M. Chitosan nanoparticles loaded dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate polymers* 2008; 73: 44-54
- 37) Sarmiento B, Ferreira D, Vega F, Ribero A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate polymers* 2006; 66: 1-7
- 38) Platel R H, Hodgson L M, Williams C K. Biocompatible initiators for lactide polymerisation. *Polymer Reviews* 2008; 48: 11-64
- 39) Schwach G, Coudane J, Engel R, Vert M. Influence of polymerization conditions on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide) polymerized in the presence of stannous octoate or zinc-metal. *Biomaterials* 2002; 23: 993-1002
- 40) Pêgo A P, Poot A A, Grijpma D W, Feijen J. Physical properties of high molecular weight 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide copolymers. *J of material science: Materials in medicine* 2003; 14: 767-773
- 41) Yang J, Liu F, Yang L, Suming L. Hydrolytic and enzymatic degradation of poly(trimethylene carbonate-co-D,L-lactide) random copolymers with shape memory behaviour. *European Polymer Journal of Pharmaceutics* 2010; 385: 113-142
- 42) Jie C, Zhu K J. Preparation, characterisation and biodegradable characteristics of poly(D,L-lactide-co-1,3-trimethylene carbonate). *Polymer International*. 1997; 42: 373-379
- 43) Pêgo A P, Van Luyn M J A, Brouwer L A, Van Wachem P B, Poot A A, Grijpma D W, Feijen J. In vivo behaviour of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers with D,L-lactide or ϵ -caprolactone: Degradation and tissue response. *J Biomed Mater Res* 2003; 67: 1044-1054
- 44) Choi S W, Kwon H Y, Kim W S, Kim J H. Thermodynamic parameters on poly(D,L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2002; 201: 283-289

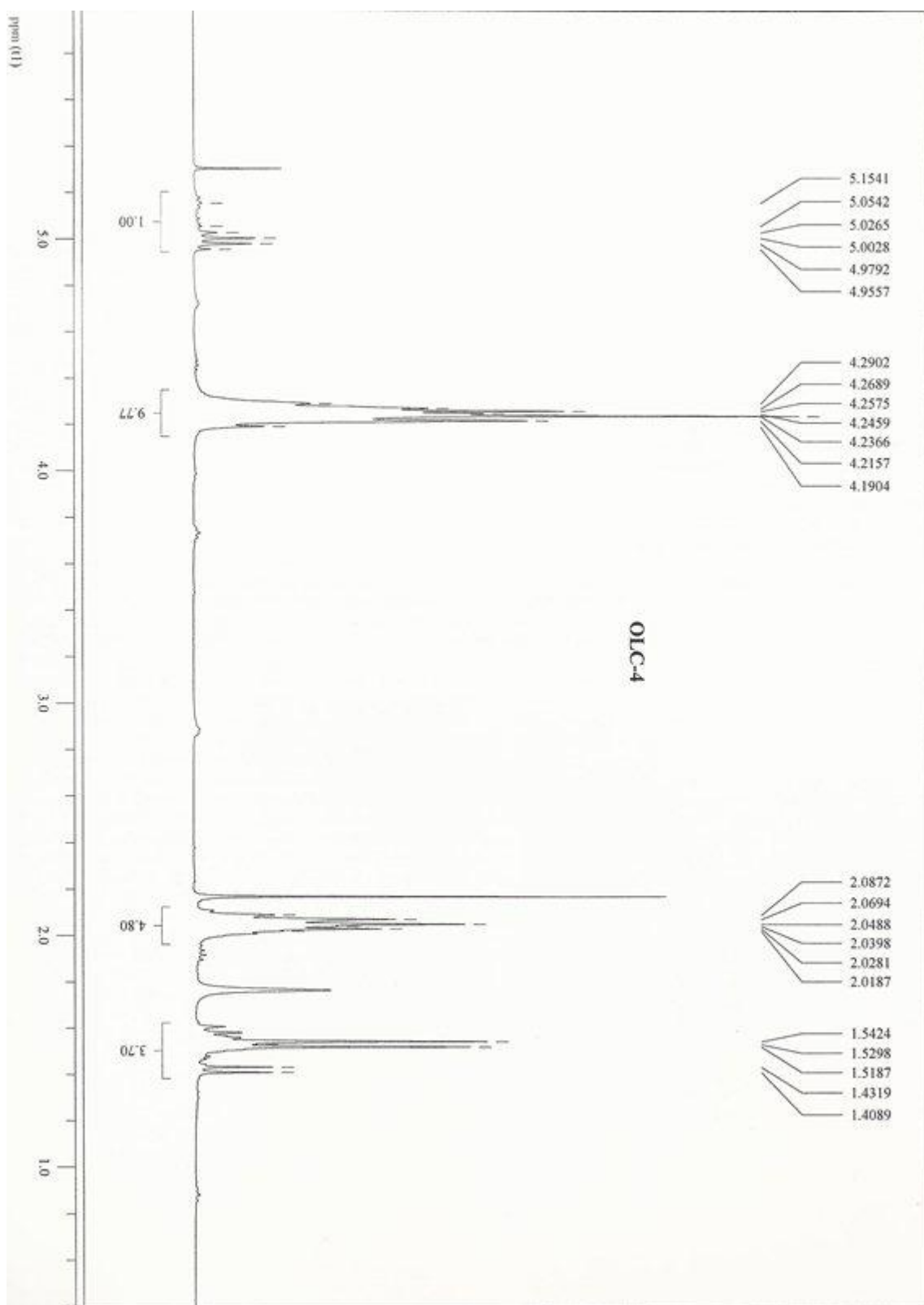
7. PRILOGE



Priloga 1: ^1H – NMR spekter monomera D,L – laktida.



Priloga 2: ^1H – NMR spekter monomera trimetilenkarbonata (TMC).



Priloga 3: ^1H – NMR spekter kopolimera z množinskim razmerjem D,L–laktida in trimetilenkarbonata 19:81 (DLLA 19).

Oznaka kopolimera TMC - DLLA	Delež razpadle mase (%) po določenem času (tedni)				
	2	4	6	8	12
DLLA 19	1,56	1,72	1,90	1,88	2,23
DLLA 24	2,20	2,03	2,05	2,35	2,69
DLLA 32	2,60	2,68	2,83	3,20	3,83
DLLA 68	1,10	0,97	1,12	1,87	29,95
DLLA 74	1,08	0,99	1,27	9,00	31,73
DLLA 77	1,16	1,20	1,89	13,46	38,96
DLLA 81	2,29	2,74	3,87	22,25	53,30
DLLA 84	1,52	1,44	2,60	22,02	57,66
Relativna standardna deviacija (%)					
DLLA 19	0,08	0,08	0,07	0,11	0,12
DLLA 24	0,31	0,24	0,06	0,34	0,20
DLLA 32	0,41	0,19	0,16	0,24	0,30
DLLA 68	0,03	0,03	0,06	0,13	1,61
DLLA 74	0,08	0,06	0,04	0,68	0,14
DLLA 77	0,05	0,02	0,04	1,36	0,90
DLLA 81	0,11	0,13	0,07	0,81	2,91
DLLA 84	0,05	0,06	0,07	2,08	2,20

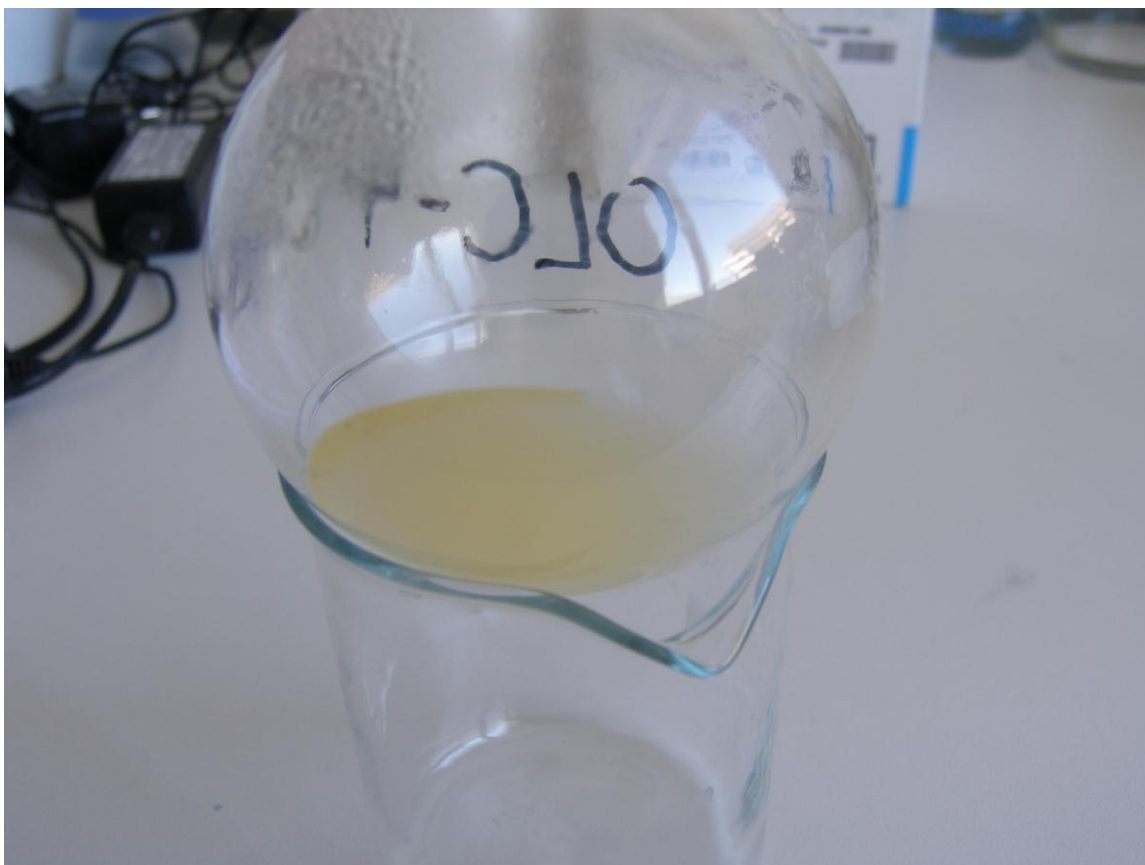
Priloga 4: Rezultati *in vitro* razpada kopolimerov v vodnem mediju v trimesečnem časovnem obdobju po 2, 4, 6, 8 in 12 tednih.

	Brez stabilizatorja	Brez stabilizatorja	Brez stabilizatorja	Stabilizator PVA	Stabilizator PVA	Stabilizator PVA	Stabilizator P-188	Stabilizator P-188	Stabilizator P-188
Oznaka kopolimera	Povprečna velikost delcev (nm)	PdI vrednost nanodelcev	Zeta potencial nanodelcev (mV)	Povprečna velikost delcev (nm)	PdI vrednost nanodelcev	Zeta potencial nanodelcev (mV)	Povprečna velikost delcev (nm)	PdI vrednost nanodelcev	Zeta potencial nanodelcev (mV)
DLLA 19	145,6 ± 1,931	0,074 ± 0,007	- 31,5 ± 0,985	168,5 ± 2,442	0,091 ± 0,034	- 25,5 ± 2,11	173,3 ± 1,447	0,073 ± 0,010	- 22,9 ± 0,351
DLLA 24	163,5 ± 1,858	0,102 ± 0,016	- 29,8 ± 0,681	207,0 ± 2,905	0,170 ± 0,009	- 25,8 ± 0,306	215,8 ± 3,539	0,115 ± 0,026	- 23,7 ± 0,1
DLLA 32	113,2 ± 0,3055	0,126 ± 0,007	- 30,4 ± 0,520	174,8 ± 2,991	0,162 ± 0,020	- 28,7 ± 0,6	147,5 ± 0,8737	0,094 ± 0,006	- 19,4 ± 0,436
DLLA 68	176,6 ± 0,7550	0,137 ± 0,002	- 29 ± 0,757	230,7 ± 2,574	0,167 ± 0,009	- 22,8 ± 0,802	206,1 ± 0,5508	0,173 ± 0,021	- 16,1 ± 0,252
DLLA 74	198,9 ± 0,4583	0,177 ± 0,021	- 31,6 ± 0,393	232,6 ± 2,458	0,111 ± 0,021	- 26 ± 0,709	205,6 ± 1,767	0,229 ± 0,009	- 26,7 ± 0,252
DLLA 77	219,0 ± 2,203	0,188 ± 0,013	- 36,5 ± 0,252	242,1 ± 3,989	0,180 ± 0,006	- 26,9 ± 1,41	205,8 ± 4,892	0,163 ± 0,029	- 27,4 ± 0,985
DLLA 81	174,2 ± 0,5033	0,122 ± 0,014	- 36,5 ± 1,79	249,0 ± 2,909	0,232 ± 0,025	- 24,1 ± 0,586	220,6 ± 0,4041	0,158 ± 0,014	- 27,2 ± 0,283
DLLA 84	198,5 ± 1,852	0,164 ± 0,007	- 40,5 ± 0,351	248,8 ± 8,143	0,283 ± 0,038	- 27,6 ± 0,907	252,0 ± 2,444	0,189 ± 0,003	- 27,4 ± 0,153

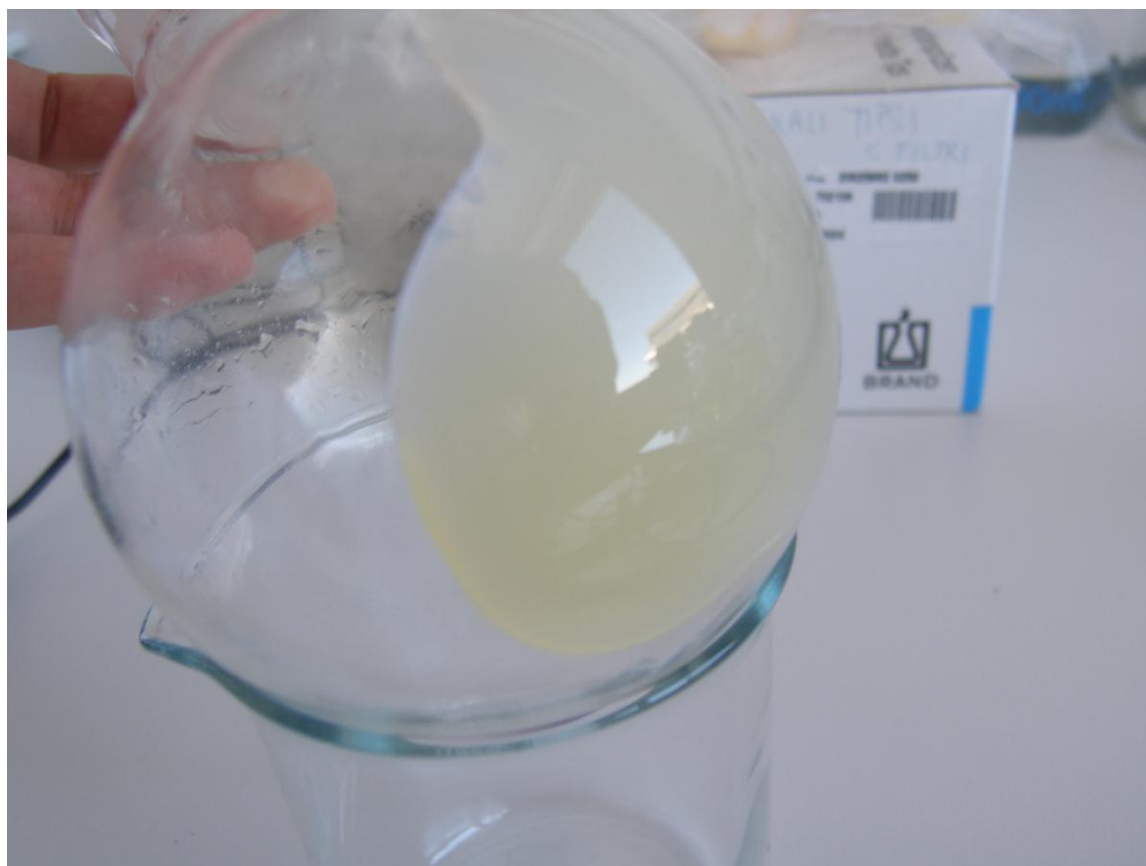
Priloga 5: Meritve velikosti, indeksa polidisperznosti (PdI) in zeta potenciala nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 2,5 % raztopine kopolimerov, v odvisnosti od deleža DLLA v kopolimeru ter vpliv prisotnosti/odsotnosti stabilizatorja (polivinilalkohol (PVA), poloksamer 188 (P 188)). Meritve smo izvedli 24 h po izdelavi nanodelcev.

	Brez stabilizatorja	Brez stabilizatorja	Brez stabilizatorja	Stabilizator PVA	Stabilizator PVA	Stabilizator PVA	Stabilizator P-188	Stabilizator P-188	Stabilizator P-188
Oznaka kopolimera	Povprečna velikost delcev (nm)	PdI vrednost nanodelcev	Zeta potencial nanodelcev (mV)	Povprečna velikost delcev (nm)	PdI vrednost nanodelcev	Zeta potencial nanodelcev (mV)	Povprečna velikost delcev (nm)	PdI vrednost nanodelcev	Zeta potencial nanodelcev (mV)
DLLA 19	79,6 ± 0,3643	0,106 ± 0,013	- 20,6 ± 1,01	104,7 ± 1,531	0,196 ± 0,011	- 13,1 ± 0,702	89,28 ± 0,6861	0,103 ± 0,006	-13,7 ± 1,46
DLLA 24	92,96 ± 0,618	0,136 ± 0,012	- 25 ± 3,82	116,3 ± 0,6429	0,130 ± 0,019	-13,9 ± 0,173	105,3 ± 1,039	0,115 ± 0,005	-16,5 ± 0,611
DLLA 32	90,31 ± 0,2196	0,108 ± 0,003	-23,5 ± 0,569	103,2 ± 0,5686	0,230 ± 0,008	- 14,5 ± 0,351	79,97 ± 0,4744	0,120 ± 0,011	-16,4 ± 2,08
DLLA 68	90,91 ± 0,205	0,103 ± 0,008	-26,4 ± 0,907	89,56 ± 1,016	0,239 ± 0,003	- 16,6 ± 1,45	104,6 ± 0,5686	0,095 ± 0,010	-17,8 ± 1,1
DLLA 74	82,45 ± 0,4524	0,102 ± 0,012	-25,4 ± 1,14	87,26 ± 0,9125	0,153 ± 0,011	- 19,5 ± 0,839	83,4 ± 0,165	0,110 ± 0,010	-18,4 ± 0,231
DLLA 77	83,88 ± 0,6062	0,102 ± 0,010	-26,0 ± 0,462	89,88 ± 0,8173	0,248 ± 0,013	- 19,3 ± 0,778	93,46 ± 0,6493	0,094 ± 0,004	-18,6 ± 0,354
DLLA 81	120,3 ± 1,662	0,126 ± 0,002	-29,9 ± 0,361	124,9 ± 1,258	0,168 ± 0,018	-20,3 ± 1,26	119,0 ± 1,127	0,126 ± 0,011	- 16,6 ± 0,557
DLLA 84	113,8 ± 0,041	0,123 ± 0,007	-31,5 ± 1,21	123,3 ± 0,6364	0,190 ± 0,006	-21,4 ± 1,29	113,7 ± 0,3512	0,118 ± 0,023	- 19,2 ± 0,231

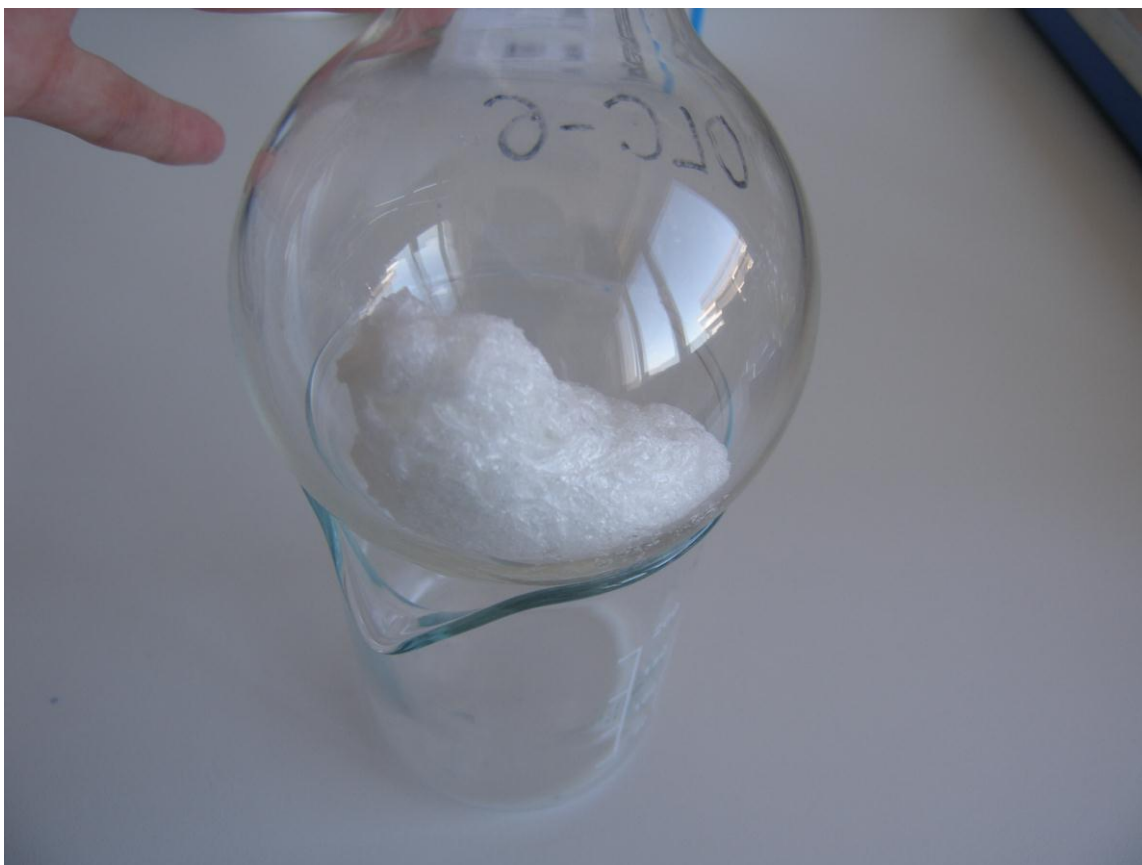
Priloga 6: Meritve velikosti, indeksa polidisperznosti (PdI) in zeta potenciala nanodelcev, ki smo jih izdelali iz 0,5 % raztopine kopolimerov, v odvisnosti od deleža DLLA v kopolimeru ter vpliv prisotnosti/odsotnosti stabilizatorja (polivinilalkohol (PVA), poloksamer 188 (P 188)). Meritve smo izvedli 24 h po izdelavi nanodelcev.



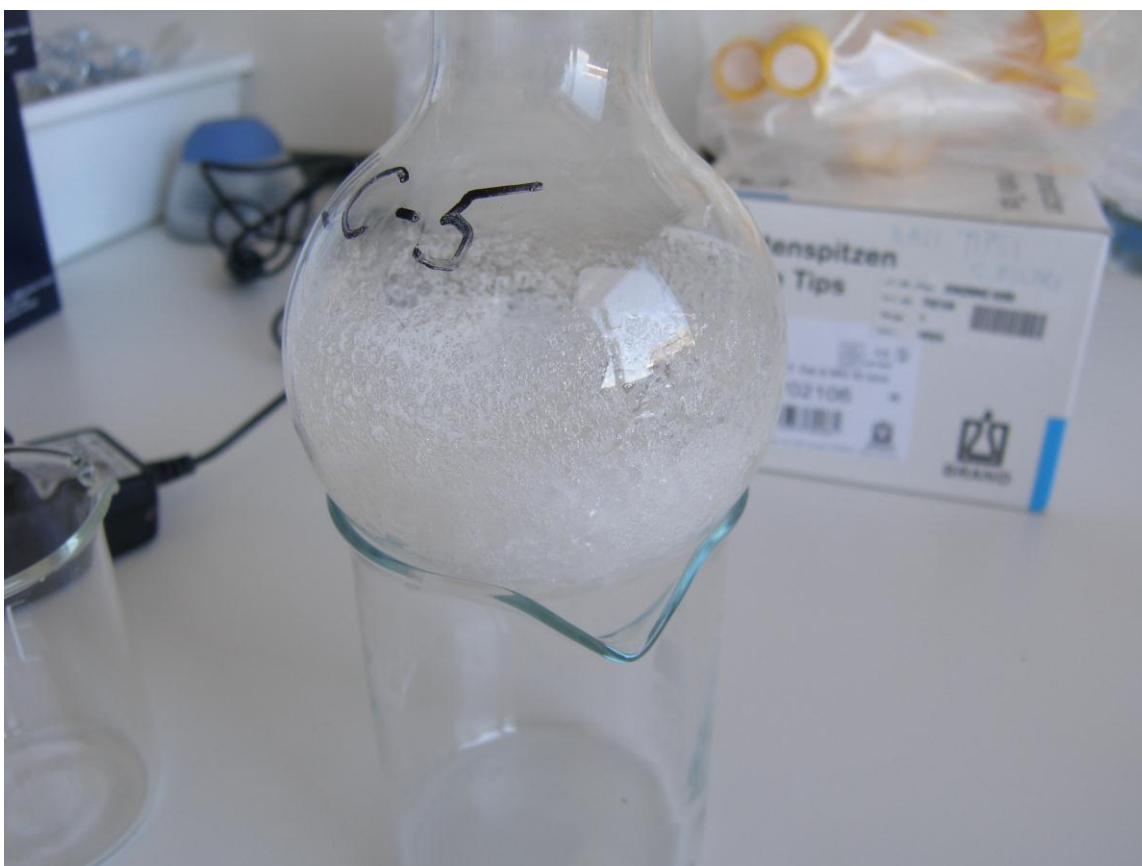
Priloga 7: Izgled kopolimera z razmerjem monomerov TMC in DLLA 81:19 (DLLA 19).



Priloga 8: Izgled kopolimera z razmerjem monomerov TMC in DLLA 76:24 (DLLA 24).



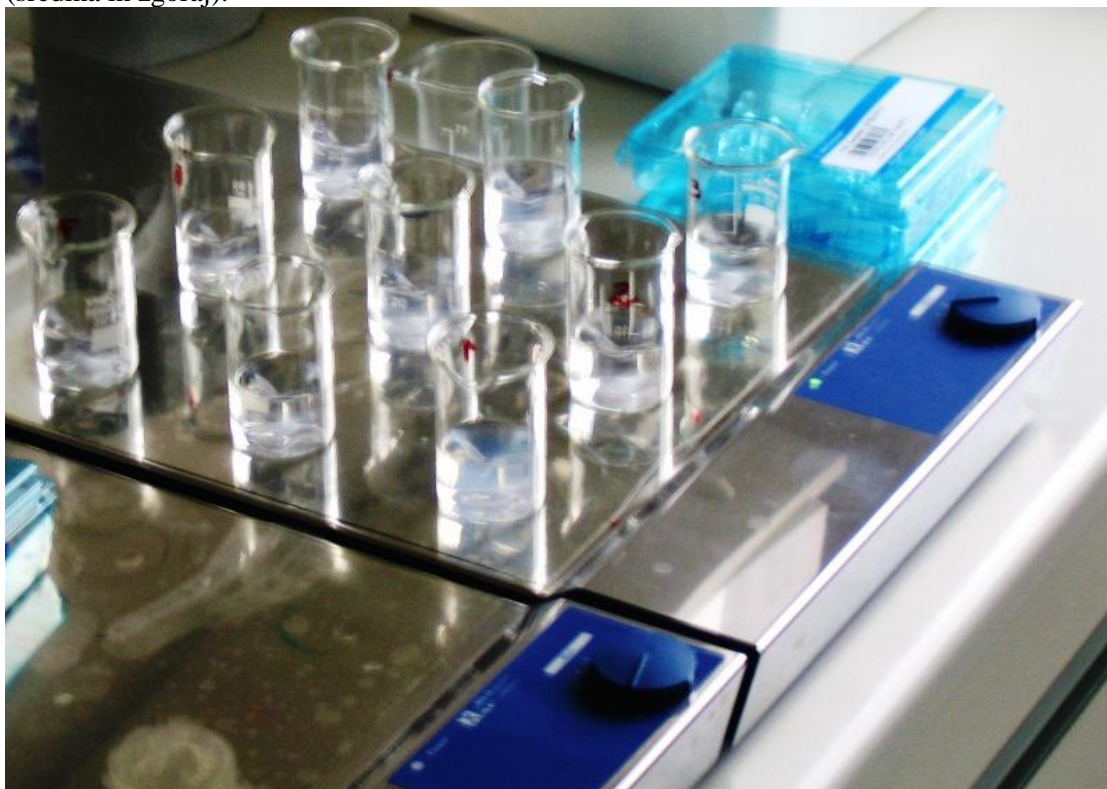
Priloga 9: Izgled kopolimera z razmerjem monomerov TMC in DLLA 32:68 (DLLA 68).



Priloga 10: Izgled kopolimera z razmerjem monomerov TMC in DLLA 19:81 (DLLA 81).



Priloga 11: Disperzije nanodelcev izdelane iz 2,5 % raztopine kopolimerov TMC-DLLA v bidestilirani vodi brez stabilizatorja. Vidno mlečne disperzije kopolimerov DLLA 19-DLLA 32 (spodaj) ter nastanek opalescentnih disperzij in oborine iz kopolimerov DLLA 68-DLLA 84 (sredina in zgoraj).



Priloga 12: Opalescentne disperzije nanodelcev izdelane iz 0,5 % raztopine kopolimerov TMC-DLLA v bidestilirani vodi brez stabilizatorja.