

POLYMÉRY REAGUJÚCE NA STIMULY PRE PRÍPRAVU *IN SITU* GÉLOV

SIMONA ROHAĽOVÁ LIVOVSKÁ^{a,b},
 JAN GAJZIOK^a, TOMÁŠ WOLASCHKA^b
 a DAVID VETCHÝ^a

^a Farmaceutická fakulta, Masarykova Univerzita, Žerotínovo nám. 617/9, 601 77 Brno, ^b Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
 gajdziokj@pharm.muni.cz

Došlo 25.5.20, prijaté 9.6.20.

Kľúčové slová: *in situ* gél, smart polymér, polyméry reagujúce na stimuly, hydrogél

Obsah

1. Úvod
2. Polyméry reagujúce na stimuly
3. Smart hydrogély a *in situ* gély
4. *In situ* gély a polyméry používané pri ich príprave
 - 4.1. Termosenzitívne polyméry
 - 4.2. pH-senzitívne polyméry
 - 4.3. Polyméry reagujúce na iónovú silu
 - 4.4. Fotosenzitívne polyméry
 - 4.5. Polyméry reagujúce na elektrické pole
 - 4.6. Polyméry reagujúce na magnetické pole
 - 4.7. Polyméry reagujúce na ultrazvuk
 - 4.8. Polyméry reagujúce na šmykové napätie
 - 4.9. Polyméry reagujúce na biologické molekuly
5. Záver

1. Úvod

Syntetické a prírodné gélujúce polyméry sú využívané na výrobu rôznych liekových foriem, napr. gélov, filmov, náplastí a rôznych druhov krytí rán a kožných náhrad. Ak tieto pomocné látky reagujú na stimuly prostredia, ide o tzv. smart polyméry, ktoré môžu vytvoriť atraktívnu liekovú formu novej generácie, tzv. smart hydrogély a tiež *in situ* gély, ktoré pod vplyvom stimulu vznikajú v mieste podania alebo uvoľňujú liečivo¹.

Smart polyméry sa stali dôležitou súčasťou výskumu farmaceutickej technológie, bioinžinierstva, tkanivového inžinierstva² a regeneratívnej medicíny, kde sa využívajú na vývoj terapeutických systémov a liekových foriem na cieleň a riadený prívod liečiva alebo diagnostika^{1,3,4}. Sú skúmané s cieľom pripraviť systémy, ktoré by mohli inteligentne reagovať na zmeny prostredia. Tento predpoklad

vyplýva z ich schopnosti meniť fyzikálnochemické vlastnosti ako odpoveď na zmenu v organizme alebo mimo neho³. Stimuly aplikované zvonka majú výraznú výhodu v jednoduchej regulácii rýchlosti, intenzity a miesta aplikácie oproti stimulom vnútorného prostredia, ktoré sú zákonitou súčasťou organizmu (napr. zmena pH po endocytóze)⁵.

2. Polyméry reagujúce na stimuly

Polyméry reagujúce na stimuly (PRS), čiže smart polyméry, menia svoje fyzikálne alebo chemické vlastnosti vplyvom zmien prostredia vďaka funkčným skupinám, ktoré sú prítomné v hlavnom reťazci polyméru, alebo môžu byť zavedené do molekuly vo forme kopolymérov⁶ alebo komplexov³. Tieto zmeny môžu byť vyvolané jedným alebo súčasným pôsobením viacerých stimulov (i) biologických: enzýmy, antigény, D-glukóza a iné molekuly; (ii) chemických: pH, iónová sila, rozpúšťadlo, redoxné deje a (iii) fyzikálnych: teplota, elektrické a magnetické pole, ultrazvuk, UV žiarenie a mechanické javy (tab. I). Tieto vplyvy následne vyvolajú makroskopicky viditeľnú alebo inak detekovateľnú zmenu polymérov, ako napr. napučovanie, zmrštenie, prechod sól – gél¹, zmena farby, vodivosti, magnetizmus, tvorba častíc, sieťovanie a i⁶. Zmeny vyvolané stimulom môžu byť vratné alebo nevratné v závislosti od deja, ktorý vyvolajú na úrovni väzieb. Ireverzibilná zmena nastáva pri štiepení alebo vzniku kovalentných väzieb v molekulách, alebo pri náhrade atómu či molekuly inou chemickou skupinou. Reverzibilné zmeny sú najčastejšie sprostredkované naviazaním iónov alebo štiepením vodíkových väzieb či iónových a hydrofóbných interakcií⁶.

PRS zohrávajú dôležitú úlohu v biomedicíne. Pri podaní liečiv do organizmu sa využívajú jedinečné vlastnosti PRS reagovať na podmienky fyziologického prostredia. Keďže je toto prostredie mimoriadne komplexné a rôzne stavy sú spojené s odchýlkami viacerých hodnôt, v posledných rokoch sú intenzívne skúmané polyméry, schopné zaznamenať viacero faktorov prostredia, na základe ktorých dôjde k ich premene⁶. Lu a spol.⁴ vo svojej práci definujú najdôležitejšie parametre a ich hodnoty, ktoré sú v organizme podmienené jeho aktuálnym stavom a je možné ich využiť ako stimul: teplota, pH, redoxné systémy, enzýmy, koncentrácia glukózy a ATP, stav hypoxie, mechanické podnety, prítomnosť nukleovej kyseliny a i⁴.

3. Smart hydrogély a *in situ* gély

Hydrogély sú prírodné alebo syntetické trojrozmerné polymérne siete prestúpené vodou. Smart hydrogély sú

Tabuľka I

Príklady najdôležitejších smart polymérov a ich stimulov pre gélovanie

Polyméry	Stimul	Lit.
Poly(<i>N</i> -izopropylakrylamid)	32–34 °C	12
Poloxaméry	20–85 °C	41
Karagénan	jedno- a dvojmocné katióny K ⁺ , Ca ²⁺	42
Gelánová guma	dvojmocné katióny Ca ²⁺ , Mg ²⁺	42
Alginát sodný	dvoj- a viacmocné katióny, napr. Ca ²⁺	42
Kyselina polyakrylová	pH > 4,8	16
Chitosan	pH > 6,5	16

jednou z liekových foriem pripravených z PRS. Sú to hydrogély, ktoré prechádzajú náhlou objemovou premenou, alebo prechodom sól – gél pri vystavení jednému alebo viacerým stimulom prostredia⁷.

In situ gél (ISG) je formulácia pripravovaná ako vodný roztok obsahujúci liečivo a ostatné pomocné látky, ktoré sú v mieste aplikácie vystavené rôznym stimulom, následkom ktorých tento gél vzniká. V procese fázovej premeny vytvárajú zložky systému maticu, ktorá môže následne riadiť uvoľňovať liečivo. Pre terapeutické systémy sú zaujímavé najmä ISG, ktoré reagujú na stimul samozostavením⁸ v mieste aplikácie v čase podania a tie, ktoré reagujú uvoľnením liečiva či diagnostika⁹.

Výhody a nevýhody in situ gélov

Najväčšou prednosťou ISG je jednoduchá aplikácia prípravku vo forme kvapaliny. Rovnorodosť dávky a presné miesto podania je možné zabezpečiť injekčným podaním. Ďalšou možnosťou je neinvazívna aplikácia sprejom alebo inou dávkovacou pomôckou. ISG môžu poskytovať rôzny disolučný profil v procese difúzie alebo erózie gélu, pričom riadené uvoľňovanie liečiva vedie k zníženému výskytu nežiaducich účinkov a interakcií a vyššej kompliance¹⁰.

Nevýhodou ISG je pomerne krátke zotrvanie liekovej formy v mieste aplikácie najmä u topických hydrogélov, ktoré môže predĺžiť pridané mukoadhézivum¹¹. ISG majú obmedzené množstvo inkorporovateľného liečiva. Rizikom je aj nižšia mechanická odolnosť gélu, ktorá môže vyústiť v predčasnú disolúciu, alebo oddelenie gélu od miesta aplikácie¹². Problematická je tiež pomalá odpoveď ISG na stimuly, ktorá komplikuje podanie liekovej formy⁷.

4. *In situ* gély a polyméry v ich príprave**4.1. Termosenzitivné polyméry**

Termosenzitivné polyméry (TSP) prechádzajú objemovou premenou alebo prechodom sól – gél pri kritickej teplote. Roztoky negatívne termosenzitivných polymérov gélovatej so stúpajúcou teplotou pri dolnej kritickej rozpúšťacej teplote (DKRT) a pri poklese pod DKRT tvoria

sól. Túto teplotu je možné ovplyvniť úpravou pomeru hydrofilných a hydrofóbných skupín a zároveň spolu s viskozitou formulácie závisia od koncentrácie polymérov. Zavedenie hydrofilných skupín zvyšuje schopnosť tvorby vodíkových väzieb, čo zvyšuje DKRT, naopak hydrofóbné skupiny túto teplotu znižujú. Roztoky pozitívne termosenzitivných polymérov gélovatej pri poklese pod hornú kritickej rozpúšťacej teplotu (HKRT) a pri vzostupe teploty nad HKRT tvoria sól. TSP teda v roztoku blízko kritickej teploty vykazujú zmenu vo fáze z rozpustného stavu (náhodné klbko) na nerozpustnú formu (kolaps alebo forma micel). Polyméry s DKRT podstupujú so zvyšujúcou sa teplotou prechod hydrofilno-hydrofóbný (rozpusťnosť vo vode klesá, interakcie voda – polymér sa stávajú nepriaznivými a začínajú prevažovať energeticky výhodnejšie vodíkové interakcie voda – voda a hydrofóbné interakcie polymér – polymér, kedy vzniká dvojfázový systém) a polyméry s HKRT prechod opačný (rozpusťnosť vo vode stúpa a vzniká jednofázový systém)¹².

TSP, ktoré gélovatej pri zahrievaní nad DKRT (32–37 °C) sú napr. poly(*N*-izopropylakrylamid), poly(*N,N*-dietylakrylamid), poly(metylvinyléter), poly(*N*-vinylkaprolaktám), prípadne aj poloxaméry, triblokové kopolyméry hydrofilného polyetylénoxidu (PEO) a hydrofóbného polypropylénoxidu (PPO) a poloxamíny, tetrablokové kopolyméry PEO-PPO blokov¹². Poloxaméry sú nezriedka používanými základmi pre termosenzitivné ISG a sú väčšinou doplnené o ďalšie mukoadhézivné polyméry alebo polyméry, ktoré sú citlivé voči iným vplyvom a vytvárajú tak multisenzitivný ISG (cit.⁷). K TSP ktoré gélovatej pri ochladzovaní pod HKRT, patria polymérne siete, tvorené poly(akrylamid-*ko*-butylmetakrylátom), polyakrylamidom alebo kyselinou polyakrylovou¹².

Periodontálne bol aplikovaný ISG s obsahom levofloxacinu a metronidazolu (antibiotiká) na liečbu parodontitídy, ktorý bol pripravený z poloxaméru 407 (20 % w/v) a chitosanu (1,5 % w/v) a tvoril gél pri teplote 34 °C v priebehu 32 s *in vitro*. Formulácia uvoľnila 60–70 % liečiva do 6–7 h s predĺženým uvoľňovaním do 48 h (cit.¹³). Injekčný biodegradovateľný ISG na intraartikulárne podanie metotrexátu (cytostatikum) pri reumatoidnej artritíde bol pripravený z poloxaméru (22 % w/v) a xantánovej gummy (0,6 % w/v) a prechádzal zo sólu na gél

pri teplote 29,6 °C počas 28 s *in vitro*. Formulácia uvoľnila 95,29 % liečiva za 132 h (cit.¹⁴). Ako prevencia gastrointestinálnych vedľajších účinkov a svalových kŕčov perorálne podávaného donepezilu (antidementívum), ale aj jeho nedostatočného prestupu hematoencefalickou bariérou bol navrhnutý intranazálny ISG pripravený z poloxamérov 407 (19,6 % w/v) a 188 (8,2 % w/v), ktorý prechádzal zo sólu na gél pri 32,5 °C za 40 s *in vitro*. Oproti intragastrickému podaniu bola dosiahnutá maximálna koncentrácia (c_{\max}) v mozgu a plazme vyššia (dvojnásobne, resp. mnohonásobne) a rýchlejšie dosiahnutá (6, resp. 5× rýchlejšie)¹⁵.

4.2. pH-senzitívne polyméry

Polyméry, ktoré disociujú vo vode za vzniku polymérnych iónov, sú slabé polyelektrolyty. Stupeň ionizácie polymérov, ich rozpustnosť vo vode a konformácia závisia od hodnoty pH (pK_a). Pre biomedicínsku aplikáciu sú vhodné polyméry s pK_a v rozmedzí 3–10. Všetky pH-senzitívne polyméry (pHSP) vo svojej štruktúre obsahujú naviazané kyslé alebo zásadité skupiny, ktoré v závislosti od pH prostredia môžu protón prijať alebo uvoľniť. Napučívanie polymérov nastáva pri zvyšujúcom sa pH v prípade slabobázických skupín, ktoré budú vo vysokom pH ionizované po odovzdaní protónu (polyaniónové ISG) a pri zníženom pH v prípade slabobázických skupín, ktoré prijatím protónu rovnako ionizujú (polykationové ISG). Existujúce odpudzovanie medzi vznikajúcim rovnakým nábojom reťazcov v priebehu ionizácie spôsobuje objemovú expanziu makromolekuly. Ionizáciou dochádza ku kumulácii protiiónov v géli, čo spôsobuje rozdiel v osmotickom tlaku v hydrogéli a mimo neho, ktorý vedie k prestupu vody do gélu a jeho napučaniu. Ak k ionizácii nedochádza, neionizované hydrofóbne reťazce v rozpúšťadle kolabujú do globúl a precipitujú z roztokov. Kritické pH, pri ktorom bude dochádzať k napučaniu polymérov, môže byť upravené kopolymerizáciou s iným polyelektrolytom, alebo zavedením viac hydrofóbných skupín alebo molekúl¹⁶.

Aniónové pHSP obsahujú karboxylovú alebo sulfónovú skupinu, ako napr. kyselina polyakrylová, kyselina polymetakrylová, kyselina hyalurónová (KH), karboxymetylchitosan, karboxymetylcelulóza alebo deriváty kyseliny polysulfónovej obsahujúce styrenové alebo vinylové skupiny. Kationové pHSP obvykle obsahujú amino skupinu, ako napr. poly(*N,N*-dimetylamoetylmetakrylát), poly(*N,N*-dietylamoetylmetakrylát) a chitosan⁷ alebo imino skupinu či pyridín, ako napr. poly(etylénimín) a poly(4-vinylpyridín)¹². Intranazálne podávaný ISG s cieľom systémového účinku lamotrigínu (antiepileptikum) bol pripravený z alginátu sodného (0,05 % w/v), chitosanu (0,25 % w/v) a metylcelulózy (0,5 % w/v). V prítomnosti simulovanej nazálnej tekutiny s pH 6,5 a obsahom Na^+ , K^+ a Ca^{2+} iónov dochádzalo ku gélovataniu formulácii. Hodnota c_{\max} v plazme aj v mozgu bola dosiahnutá dvakrát rýchlejšie a bola dvojnásobne vyššia ako po podaní p.o. suspenzie lamotrigínu¹⁷. Na prípravu injikovateľného ISG bola použitá kyselina chitosan-graft-dihydrokofeínová v zmesi s pullulánom. Citlivosť na zmenu pH bola testova-

ná uvoľnením doxorubicínu (cytostatikum) v prostrediach s rôznym pH *in vitro*. Potvrdené bolo uvoľňovanie doxorubicínu v závislosti od pH a schopnosť zabíjať bunky nádorovej línie¹⁸.

4.3. Polyméry reagujúce na iónovú silu

Zmena koncentrácie solí môže spôsobovať zmeny v rozpustnosti polyméru, jeho napučívanie, zmeny vo veľkosti polymérnych micel a i. Efekt iónovej sily na hydrogél závisí od ionizovateľnosti polyméru. Polymér, ktorého molekuly nie sú ionizované, nebude pod vplyvom iónovej sily napučívať. Ionizovaná forma bude takéto správanie vykazovať v prítomnosti iónov rôznej mocnosti¹². Napučívanie závisí, rovnako ako u pHSP, od rozdielu v koncentrácii iónov vnútri a mimo hydrogélu, čo vedie k strhávaniu vody do gélu alebo von z gélu. Ióny však môžu pôsobiť aj ako sieťujúce činidlá a znižovať tak schopnosť hydrogélov napučívať. Polyméry, najčastejšie používané pre prípravu iónsenzitívnych ISG, sú najmä polyméry prírodného pôvodu, ako gelánová guma (GG), karagénan a kyselina algínová. Tieto sú zosieťované (komplexované) polyvalentnými iónmi ako následok elektrostatických interakcií opačných nábojov¹⁹.

Iónsenzitívny ISG s obsahom estradiolu (estrogén) bol pripravený na okulárne podanie k prevencii senilnej katarakty. ISG vo forme kvapiek bol pripravený z deacetylovanej GG (0,3 % w/v). Kvapalná formulácia tvorila gél po zmiešaní so simulovanou slznou kvapalinou s obsahom kationov Na^+ , K^+ a Ca^{2+} a uvoľnila 80 % liečiva počas 8 h *in vitro*. ISG bol stabilný pri izbovej teplote, po sterilizácii aj po stabilných testoch a preukázal predĺžené uvoľňovanie a kontakt v mieste aplikácie²⁰. Duálny ISG, reagujúci na iónovú silu a teplotu, bol pripravený s cieľom intranazálneho podania ketoprolaku (antiflogistikum). Gél bol pripravený z deacetylovanej GG (3 % w/v) a poloxaméru 407 (18 % w/v). Proces gélovatania prebiehal pri teplote 36,5 °C v prítomnosti simulovanej nazálnej tekutiny obsahujúcej ióny Na^+ , K^+ a Ca^{2+} . Zotrvanie gélu bolo zisťované značením cyanínom 7 *in vivo* a dosahovalo 25 min. Gély dosiahli dostatočnú viskozitu a rýchly prechod sól – gél, predĺžené uvoľňovanie, lepšiu nazálnu absorpciu, analgetický účinok *in vivo* a zanedbateľnú ciliotoxickosť²¹.

4.4. Fotosenzitívne polyméry

Fotosenzitívne polyméry reagujú na žiarenie vhodnej vlnovej dĺžky napr. zmenou tvaru, zmáčateľnosti, rozpustnosti, optických vlastností, náboja a konjugácie. Musia obsahovať chromofór, funkčnú skupinu, ktorej vlastnosti rozhodujú o reverzibilitate zmien vyvolaných žiarením²². Žiarenie vyvoláva jednu z týchto reakcií: izomerizácia (najčastejšie *cis* – *trans* a cyklizácia) spojená so zmenou polarizácie, štiepenie, dimerizácia alebo fotopolymerizácia, využívaná napr. v zubnej protetike u akrylátov. Izomerizácia *cis* – *trans* je žiarením vyvolaná napr. u polymérov s azobenzénovou skupinou a cyklizáciu môžeme pozorovať u spiropyranov. K štiepeniu dochádza u fotolabilných

protektívnych skupín, ako napr. *o*-nitrobenzyl a k dimerizácii napr. u kumarínových derivátov. Produkt môže mať zmenené fyzikálne alebo chemické vlastnosti (napučanie, zmena viskozity, degradácia a i.)⁷. Vo väčšine prípadov senzitivných hydrogélův dochádza k ionizácii alebo sieťovaniu polymérov, čo vedie k zmene v stupni napučania gélu²².

Azobenzénové skupiny ako chromofór boli inkorporované do inklúzných komplexov metylcelulóza – cykloextrín, u ktorých bol potvrdený vplyv UV žiarenia na gélovatenie vodných roztokov²³. Liu a spol.²⁴ pripravili kumarínový hydrogél, ktorý reagoval na žiarenie štiepením miesto dimerizácie. Žiarenie s vlnovou dĺžkou 365 nm vyvolalo štiepenie väzby C-N v 7-aminokumarínovej štruktúre a prechod gélu na sól. Ako modelové liečivo bol použitý cytarabín (cytostatikum). Po aplikácii žiarenia dochádzalo k zvýšenému uvoľňovaniu a po prerušení žiarenia sa disolúcia opäť spomalila. Žiarenie urýchlilo štiepenie C-N väzby a rozrušovalo štruktúru gélu, čím sa urýchlilo uvoľňovanie liečiva. Tento gél by mohol byť podávaný intratumorálne injekciou a uvoľnenie liečiva by bolo riadené svetelným stimulom zvonka²⁴.

4.5. Polyméry reagujúce na elektrické pole

Polyméry reagujúce na elektrické pole premieňajú elektrickú energiu na mechanickú a môžu sa ohýbať, zmrštiť, napučať alebo erodovať. Deformácia gélu v elektrickom poli je závislá od faktorov, ako osmotický tlak, pH alebo koncentrácia solí v médiu, pozícia gélu vzhľadom k elektródam, hrúbka a tvar gélu, použité napätie⁵, stupeň zosieťovania polyméru a dielektrické vlastnosti média²⁵. Najviac skúmanými sú hydrogély polyelektrolytov, ktoré sú v elektrickom poli deformované pod vplyvom anizotropného napučovania alebo zmrštenia, ako výsledok pohybu iónov ku katódovej alebo anódovej strane gélu. Ióny v rámci polymérnej siete sú však obmedzené v pohybe kvôli zosieťovanej štruktúre hydrogélů. Transport protiiónov vytvára osmotický potenciál vedúci k elektroosmotickému pohybu molekúl a ku kontrakcii hydrogélů. Hlavné mechanizmy uvoľňovania liečiva pod vplyvom elektrického prúdu sú uvoľňovanie liečiva spolu s vodou po syneréze, difúzia z gélu po napučaní, elektroforéza a uvoľnenie počas erózie gélu²⁵. Polyméry používané na prípravu elektrosenzitivných formulácií sú napr. chitosan, KH, alginát alebo syntetické polyméry obsahujúce 2-hydroxyetyl-metakrylát, vinylalkohol, allylamín, akrylonitril, anilín, kyselinu 2-akrylamido-2-metylpropán-sulfónovú, akrylovú alebo metakrylovú⁵. Qu a spol.²⁶ pripravili hydrogél tvorený dextránom a anilínovým trimérom schopný reagovať na elektrický prúd za účelom lokálneho predĺženého uvoľňovania. Dosiahnuté bolo pulzné uvoľňovanie. Množstvo uvoľneného liečiva záviselo od externého napätia. Hydrogél uvoľňoval so stúpajúcim napätím viac dexametazónu (kortikosteroid) alebo indometacín (antiflogistikum), ako v stave bez externého zdroja, kedy sa uvoľnilo len 35 % dexametazónu a 9 % indometacínu z celkovej dávky za 140 minút. Pri napätí 3 V uvoľnili gély 95 %, resp. 30 % uvedených liečiv²⁶.

4.6. Polyméry reagujúce na magnetické pole

Polyméry reagujúce na magnetické pole obsahujú vo svojej štruktúre anorganické magnetické nanočastice, najčastejšie z oxidov železa (ferrogély). Ich odpoveď na magnetické pole závisí od typu polymérnej matrice a nanočastíc, ich veľkosti, koncentrácie a distribúcie v hydrogéli⁷. Pod vplyvom nehomogénneho magnetického poľa dochádza k okamžitej reverzibilnej zmene tvaru alebo veľkosti materiálu, ako následok interakcii pole – častice. Častice sú vystavené magnetoforéze a sú priťahované miestom s vyššou intenzitou magnetického poľa²⁷. Vplyvom elektrického alebo magnetického dipólu dochádza k usporiadaniu častíc do reťazca²⁷, čo môže viesť k výrazným zmenám vo vlastnostiach polymérnej matrice⁵.

Alginátový ferrogél bol pripravený zosieťovaním pomocou iónov Ca^{2+} zo zmesi alginátového roztoku a nanočastíc Fe_3O_4 . Následne bol s cieľom predĺženia uvoľňovania transformujúceho rastového faktora $\beta 1$ konjugovaný s heparínom. Potvrdené bolo *in vitro* predĺžené uvoľňovanie faktora $\beta 1$. Uvoľňovanie bolo regulované magnetickým poľom a formulácia vyvolala diferenciáciu chondrocytov bunkovej línie²⁸.

4.7. Polyméry reagujúce na ultrazvuk

Ultrazvuk môže vyvolať uvoľnenie liečiva z polymérneho gélu rôznymi mechanizmami. Základným procesom je kavitácia, pri ktorej vznikajú a zanikajú vzduchom vyplnené mikrobubliny, ako následok tlakových vln vyvolaných ultrazvukom. V porovnaní s inými smart polymérmí je zložitá s presnosťou určiť makromolekulové vlastnosti, ktoré by jasne určovali senzitivitu polyméru na ultrazvuk. Ultrazvukom je možné urýchliť disolúciu z (i) biodegradovateľných (napr. kyselina polymliečna, polyglykolová) a (ii) nebiodegradovateľných (napr. etylénvinylacetát) polymérov, a to (i) urýchlením degradácie a (ii) uľahčením permeácie⁵.

Ultrazvukom riadené uvoľňovanie ciprofloxacínu (antibiotikum) bolo popísané pri hydrogéli tvorenom poly (2-hydroxyetyl-metakrylátom)²⁹. K uvoľneniu ciprofloxacínu došlo až po pôsobení ultrazvuku nízkej intenzity, ktoré rozrušilo povrchové metylénové reťazce, ktorými bol gél vopred pokrytý kvôli prevencii pasívneho uvoľňovania liečiva³⁰. Ďalším vplyvom ultrazvuku môže byť čiastočná alebo úplná disociácia micel. Prívod doxorubicínu (cytostatikum) v micelách tvorených poloxamérom P105 zabezpečil pod vplyvom ultrazvuku pasívny targeting do tumoru *in vivo*. Ultrazvuk zvýšil uptake nádorových buniek a znížil uptake zdravých tkanív³¹.

4.8. Polyméry reagujúce na šmykové napätie

Polyméry odpovedajúce na mechanický stimul sú označované ako polyméry reagujúce na šmykové napätie. Šmyková sila, resp. deformácia vyvolá šmykové zriedenie, ak viskozita hydrogélů klesá, alebo šmykové zahustenie, ak jeho viskozita stúpa. Predmetom záujmu sú najmä hyd-

rogély odpovedajúce šmykovým zriedením²⁵. Ich výraznou výhodou oproti ostatným ISG je, že vznik gélu nie je podmienený externým stimulom, ale gélovanie nastáva hneď po prerušení šmykového napätia³². Vlastnosti šmykového zriedenia vykazujú napr. zmesi KH a metylcelulózy alebo cyklodextríny v asociácii s blokovými kopolymérami PEO, PPO, poly- ϵ -kaprolaktómom, kyselinou polymliečnou alebo polyetylenglykolom (PEG)⁷.

Skupina supramolekulárných hyalurónových gélov prechádza pri stlačení injekčnou striekačkou šmykovým zriedením a následne sa v priebehu pár desiatok sekúnd po prerušení síl opäť regenerujú. Takto bol pripravený aj gél KH (liečivo muskuloskeletálnej sústavy), kde bola KH modifikovaná hosťom adamantánom a hositeľom cyklodextrínom³³. Po aplikácii striekačkou súčasťou prechádzajú samozostavením, kedy adamantán zapadá do cyklodextrínových dutín a vzniká gél. Formulácia bola aplikovaná potkanom do infarktovej hraničnej zóny myokardu. Hydrogély utlmili nepriaznivú remodeláciu ľavej komory a potvrdené bolo histologické a funkčné zlepšenie stavu³⁴. Na podporu regenerácie tkanív bol pripravený hydrogél reagujúci na šmykové napätie pripravený samozostavením z roztoku heparínu a disperzie laponitu (syntetický kremičitan), do ktorého bol pridaný fibroblastový rastový faktor 2 za vzniku komplexu s heparínom. Gél bol potkanom podaný subkutánne, vyvolal silnú angiogénu a počas šiestich týždňov degradoval³².

4.9. Polyméry reagujúce na biologické molekuly

Polyméry reagujúce na redoxné deje

Polyméry reagujúce na redoxné deje obsahujúce najčastejšie disulfidické väzby sú označované aj ako polyméry reagujúce na tioly, pretože disulfidické väzby môžu reverzibilne prechádzať na tioly po vystavení redukčným činidlám alebo podstúpiť disulfidickú zámenu v prítomnosti iných tiolov. Tiolové skupiny môžu následne oxidovať na pôvodné disulfidické mostíky⁴. Práve tiolované polyméry (tioméry) prejavujú *in situ* gélujúce schopnosti vysvetľované tvorbou inter- a intramolekulových disulfidických mostíkov po oxidácii tiolových skupín¹⁰. Ďalšou skupinou sú polyméry obsahujúce diselenidové skupiny reagujúce na redukčné aj oxidačné činidlá⁴. Hlavnou skupinou polymérov reagujúcich na oxidujúce látky sú systémy obsahujúce síru, ako napr. kopolyméry propylén-sulfidu a etylénoxidu, ktoré sú amfifilné a vytvárajú micely. K ďalším patria polyméry na báze esterov arylborónovej kyseliny a dialkylsulfidov³⁵.

Intracelulárna koncentrácia glutatiónu je 10 mM, extracelulárne 0,002 mM a v nádorových bunkách sú tieto hodnoty ešte vyššie. Práve tento rozdiel je využívaný pri príprave terapeutických systémov reagujúcich na redoxné deje, ktoré majú uvoľniť liečivo po vstupe do bunky. Koo a spol.³⁶ pripravili systém založený na micelách tvorených triblokovým kopolymérom PEG-polylyzín-polyfenylalanín, v ktorých obal tvorený lyzínom bol zosieťovaný činidlom obsahujúcim redukovateľné disulfidické mostíky. Vnútro miciel, tvorené fenylalanínom slúži ako rezervoár pre hydrofilné liečivo a vrstva, tvorená lyzínom

a zosieťovaná činidlom, zvyšuje stabilitu miciel a bráni uvoľneniu liečiva v extracelulárnom prostredí s nízkou koncentráciou glutatiónu. Po endocytoze dôjde v prostredí s vyššou koncentráciou glutatiónu k uvoľneniu liečiva. Modelovým liečivom bol metotrexát (cytostatikum), ktorý sa z miciel uvoľňoval rýchlejšie so zvyšujúcou sa koncentráciou glutatiónu, pričom zosieťované micely brzdili uvoľnenie metotrexátu extracelulárne oproti nezosieťovaným micelám³⁶.

Polyméry reagujúce na glukózu

Polyméry reagujúce na glukózu zaznamenávajú veľký záujem, kvôli neutíchajúcim snahám o vytvorenie autoregulačného terapeutického systému citlivého na hladinu glukózy, ktorý by reagoval na výkyvy glykémie prívodom inzulínu. Na toto použitie sú skúmané najmä systémy založené na (i) oxidácii glukózy glukózooxidázou (GO), (ii) väzbe glukózy na lektín alebo (iii) vzniku reverzibilnej väzby medzi glukózou a kyselinou fenylboritou. Zvyčajne sa jedná o (i) pHSP, v ktorom je inkorporovaná GO, alebo ktorý je konjugovaný s GO, kedy po rozložení glukózy GO vzniká peroxid vodíka a kyselina glukónová, ktorá vyvolá zmenu v pH a odpoveď pHSP, (ii) glykopolymer, ktorý v prítomnosti konkavalínu A sieťuje alebo agreguje, ale v prítomnosti glukózy dôjde k jej väzbe na konkavalín A a uvoľneniu glykopolymeru s liečivom, (iii) polyméry obsahujúce vo svojej štruktúre kyselinu fenylboritú, ktorých rozpustnosť závisí od pH a od koncentrácie prítomných 1,2-diolov⁵. Kyselina fenylboritá reaguje s glukózou a polymér tak získava náboj a stáva sa viac hydrofilným²⁵. Na tomto princípe vznikol aj glukózo-senzitívny hydrogél tvorený trehalózovým glykopolymerom a kyselinou fenylboritou naviazanou na PEG, ktorá vytvára cez hydroxylové skupiny trehalózy ester boronátu, ktorý v štruktúre gélu zachytí inzulín (antidiabetikum). V prítomnosti glukózy je esterová väzba porušená a kyselina fenylboritá sa viaže na glukózu, čím je inzulín uvoľnený. So zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy boli rozpad gélu a uvoľnenie inzulínu rýchlejšie. Bolo zistené, že trehalóza navyše chránila inzulín pred tepelnou degradáciou³⁷.

Polyméry reagujúce na antigény

Vysoká afinita a špecifickosť interakcií antigénov a protilátok viedla k príprave rôznych polymérnych systémov, ktoré majú po rozpoznaní antigénu napučiavať. Väčšina hydrogélov reagujúcich na väzbu antigén – protilátka je pripravených zavedením antigénu alebo protilátky do siete, či konjugáciou na sieť polyméru, alebo využitím tejto interakcie ako reverzibilného sieťujúceho činidla²⁷. Napr. v prítomnosti voľného antigénu môže dochádzať ku kompetitívnemu obsadzovaniu miest na protilátke polyméru a antigén graftedovaný na polyméri je zo sieťujúcej väzby uvoľnený, následkom čoho dôjde ku napučaniu gélu. V neprítomnosti voľných antigénov dochádza k opätovnému zosieťovaniu a gél sa zmrští⁷. Hydrogél reagujúci na pH, teplotu a koncentráciu Fab fragmentu bol pripravený kopolymerizáciou Fab fragmentu z monoklonálneho antifuoresceínu a *N*-izopropylakrylamidu a *N,N'*-metylénbisakrylamidu. Prítomnosť fluo-

resceínu sodného (antigén) a jeho väzba na Fab fragmenty vyvolala objemovú zmenu hydrogélu³⁸.

Polyméry reagujúce na enzýmy

Selektívny katalytický účinok enzýmov vyvoláva v polyméroch reagujúcich na enzýmy zmeny, ako napr. napučovanie a zmrštenie³⁹, alebo uvoľnenie liečiva⁷. Tieto polyméry pozostávajú z dvoch zložiek: (i) časť citlivá na enzým tvorená substrátom na báze peptidu, lipidu alebo polynukleotidu, (ii) časť, ktorá riadi alebo kontroluje zmeny v nekovalentných väzbách vedúce k makroskopickej premene³⁹. Príprava je možná napr. použitím peptidových reťazcov, ako sieťujúcich činidiel, alebo naviazaním molekúl na polymér. Tieto peptidy sú rozoznané enzýmom, dôsledkom čoho dôjde k rozrušeniu polymérnej siete, alebo uvoľneniu naviazanej molekuly⁷. Druhou skupinou sú chemicky sieťované hydrogély obsahujúce enzýmovo senzitivnú vedľajšiu skupinu. Pod vplyvom enzýmu u nich dochádza k napučovaniu alebo zmršteniu, no zosieťovaná štruktúra ostáva intaktná³⁹. Pre prípravu ISG boli použité napr. peroxidáza, ktorá v prítomnosti H₂O₂ katalyzuje sieťovanie polymérov obsahujúcich tyrozín a transglutamináza katalyzujúca sieťovanie polymérov prostredníctvom lyzínu a glutamínu⁹.

Gao a spol.⁴⁰ pripravili terapeutický systém, reagujúci na enzýmy, založený na PEG substituovanom pillar[5]aréne, ktorý sa vo vode organizuje do micel. Tieto micely vykazovali vysokú schopnosť zapuzdrenia liečivej látky a jej uvoľnenie pod vplyvom enzýmovej katalýzy L-asparaginázou. Micely obsahujúce doxorubicin (cytostatikum) preukázali signifikantnú cytotoxicitu voči MCF-7 línii nádorových buniek a aj micely bez liečiva mali slabý toxický účinok na MCF-7 proliferáciu⁴⁰.

5. Záver

Smart polyméry, smart hydrogély a *in situ* gély sú predmetom výskumu riadeného a cieleného uvoľňovania liečiv. Medzi zatiaľ najvyužívanejšie patria polyméry reagujúce na teplotu, pH, redoxné prostredie alebo svetelné žiarenie. Termosenzitivné polyméry sú využívané napr. na prípravu depotných systémov, v lokalizovanej rádioterapii alebo v tkanivovom inžinierstve. Polyméry reagujúce na pH sa uplatňujú v cielej farmakoterapii nádorov a v perorálnych liekových formách. Redoxné senzitivné polyméry sa skúmajú kvôli možnému využitiu v diagnostike zápalom alebo nádorom zmenených tkanív. Fotosenzitivné polyméry sú súčasťou terapie ochorení, kedy je poškodené tkanivo prístupné externému žiareniu. Budúcou perspektívou sú multisenzitivné hydrogély a *in situ* gély schopné odpovedať na viaceré podnety, a tak citlivejšie reagovať na komplexné prostredie biologických procesov.

Zoznam skratiek

GG	gelánová guma
GO	glukózooxidáza
ISG	<i>in situ</i> gél
DKRT	dolná kritická rozpúšťacia teplota
KH	kyselina hyalurónová
HKRT	horná kritická rozpúšťacia teplota
PEG	polyetylén glykol
PEO	polyetylén oxid
pHSP	pH senzitivné polyméry
PPO	polypropylén oxid
PRS	polyméry reagujúce na stimuly
TSP	termosenzitivné polyméry

LITERATÚRA

1. Aguilar M. R., Román J. S., v knihe: *Smart Polymers and their Applications*, 2. vyd. (Aguilar M. R., Román J. S., ed.), kap. 1, str. 11. Woodhead Publishing, Cambridge 2019.
2. Kaňka J. a 10 spoluautorov: Chem. Listy 113, 726 (2019).
3. Indermun S., Govender M., Kumar P., Choonara Y. E., Pillay V., v knihe: *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications* (Makhlouf A. S. H., Abu-Thabit N. Y., ed.), kap. 2, str. 43. Woodhead Publishing, Cambridge 2018.
4. Lu Y., Aimetti A. A., Langer R., Gu Z.: Nat. Rev. Mater. 2, 1521 (2017).
5. Roy D., Cambre J. N., Sumerlin B. S.: Prog. Polym. Sci. 35, 278 (2010).
6. Malikmammadov E., Hasirci N., v knihe: *Smart Polymers and their Applications*, 2. vyd. (Aguilar M. R., Román J. S., ed.), kap. 8, str. 255. Woodhead Publishing, Cambridge 2019.
7. Montero A., Valencia L., Corrales R., Jorcano J. L., Velasco D., v knihe: *Smart Polymers and their Applications*, 2. vyd. (Aguilar M. R., Román J. S., ed.), kap. 9, str. 279. Woodhead Publishing, Cambridge 2019.
8. Hrubý M.: Chem. Listy 112, 294 (2018).
9. Ko D. Y., Shinde U. P., Yeon B., Jeong B.: Prog. Polym. Sci. 38, 672 (2013).
10. Zahir-Jouzdani F., Wolf J. D., Atiyabi F., Bernkop-Schnürch A.: Expert Opin. Drug Delivery 15, 1007 (2018).
11. Gajdziok J., Vetchý D.: Chem. Listy 106, 632 (2012).
12. Qureshi D., Nayak S. K., Maji S., Anis A., Kim D., Pal K.: Eur. Polym. J. 120, 109220 (2019).
13. Bansal M., Mittal N., Yadav S. K., Khan G., Gupta P., Mishra B., Nath G.: J. Oral Biol. Craniofac. Res. 8, 126 (2018).
14. Das T., Prakash V. M., Math P. K. T.: J. Appl. Pharm. Sci. 9, 40 (2019).
15. Gu F., Fan H., Wu C.: Acta Pharm. 70, 411 (2020).
16. Bazban-Shotorbani S., Hasani-Sadrabadi M. M., Karhaneh A., Serpooshan V., Jacob K. I., Moshaverinia

- A., Mahmoudi M.: *J. Controlled Release* 253, 46 (2017).
17. Parashar P., Diwaker N., Kanoujia J., Singh M., Yadav A. S., Singh I. S., Saraf S. A.: *J. Pharm. Invest.* 50, 95 (2020).
 18. Liang Y., Zhao X., Ma P. X., Guo B., Du Y., Han X.: *J. Colloid Interface Sci.* 536, 224 (2019).
 19. Dong M., Chen Y., v kniže: *Hydrogels Based on Natural Polymers* (Chen Y., ed.), kap. 7, str. 173. Elsevier, Cambridge 2019.
 20. Kotreka U. K., Davis V. L., Adeyeye M. C.: *PLoS One* 12, 0172306 (2017).
 21. Li X., Du L., Chen X., Ge P., Wang Y., Fu Y., Sun H., Jiang Q., Jin Y.: *Int. J. Pharm.* 489, 252 (2015).
 22. Xiong X., Campo A., Cui J., v kniže: *Smart Polymers and their Applications*, 2. vyd. (Aguilar M. R., Román J. S., ed.), kap. 4, str. 87. Woodhead Publishing, Cambridge 2019.
 23. Hu X., Zheng P. J., Zhao X. Y., Li L., Tam K. C., Gan L. H.: *Polymer* 45, 6219 (2004).
 24. Liu Q., Wang H., Li G., Liu M., Ding J., Huang X., Gao W., Wu H.: *Chin. Chem. Lett.* 30, 485 (2019).
 25. Koetting M. C., Peters J. T., Steichen S. D., Peppas N. A.: *Mater. Sci. Eng., R* 93, 1 (2015).
 26. Qu J., Liang Y., Shi M., Guo B., Gao Y., Yin Z.: *Int. J. Biol. Macromol.* 140, 255 (2019).
 27. Bearat H. H., Vernon B. L., v kniže: *Injectable Biomaterials* (Vernon B., ed.), kap. 11, str. 263. Woodhead Publishing, Cambridge 2011.
 28. Kim H., Park H., Lee J. W., Lee K. Y.: *Carbohydr. Polym.* 151, 467 (2016).
 29. Michálek J., Dušková Smrčková M., Přádný M., Chyliková Krumbolcová E.: *Chem. Listy* 112, 490 (2018).
 30. Norris P., Noble M., Francolini I., Vinogradov A. M., Stewart P. S., Ratner B. D., Costerton J. W., Stoodley P.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4272 (2005).
 31. Rapoport N. Y., Christensen D. A., Fain H. D., Barrows L., Gao Z.: *Ultrasonics* 42, 943 (2004).
 32. Ding X., Gao J., Wang Z., Awada H., Wang Y.: *Biomaterials* 111, 80 (2016).
 33. Ferancov A., Labuda J., Berek J., Zima J.: *Chem. Listy* 96, 856 (2002).
 34. Rodell C. B., MacArthur J. W., Dorsey S. M., Wade R. J., Wang L. L., Woo Y. J., Burdick J. A.: *Adv. Funct. Mater.* 25, 636 (2015).
 35. Hrubý M., Filippov K. S., Felklová V., Štěpánek P.: *Chem. Listy* 109, 482 (2015).
 36. Koo A. N., Lee H. J., Kim S. E., Chang J. H., Park C., Kim C., Park J. H., Lee S. C.: *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* 48, 6570 (2008).
 37. Lee J., Ko J. H., Mansfield K. M., Nauka P. C., Bat E., Maynard H. D.: *Macromol. Biosci.* 18, 1700372 (2018).
 38. Lu Z. R., Kopečková P., Kopeček J.: *Macromol. Biosci.* 3, 296 (2003).
 39. Ulijn R. V.: *J. Mater. Chem.* 23, 2217 (2006).
 40. Gao L., Zheng B., Chen W., Schalley C. A.: *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* 51, 14901 (2015).
 41. Roy D., Brooks W. L. A., Sumerlin B. S.: *Chem. Soc. Rev.* 42, 7214 (2013).
 42. Masteiková R., Chalupová Z., Sklupalová Z.: *Medicina (Kaunas)* 39, 19 (2003).
- S. Rohal'ová^{a,b}, J. Gajdziok^a, T. Wolaschka^b, and D. Vetchý^a** (^aDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Czech Republic, ^bDepartment of Pharmaceutical Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice, Slovak Republic): **Stimuli-responsive Polymers for the Preparation of *in situ* Gels**
- Recently, the stimuli-responsive polymers get increased scientific interest due to the ability to reversibly alter their physicochemical properties. They are often referred to as smart, environmental-sensitive or intelligent polymers. This review provides fundamental information on various types of smart polymers responsive to biological, physical and chemical stimuli with examples of their use in the preparation of smart hydrogels and *in situ* gels with controlled or targeted drug release.
- Keywords: *in situ* gel, smart polymer, stimuli-responsive polymers, hydrogel