

Układy polimerowe formowane *in situ* do zastosowań biomedycznych

Cz. II. Wstrzykiwalne układy hydrożelowe

Anna Korytkowska-Wałach¹⁾, Monika Śmiga-Matuszowicz^{2), *)}, Jan Łukaszczyk²⁾

DOI: [dx.doi.org/10.14314/polimery.2015.435](https://doi.org/10.14314/polimery.2015.435)

Streszczenie: Część druga pracy przeglądowej poświęconej układom polimerowym formowanym w miejscu zastosowania (*in situ*), dotycząca wstrzykiwalnych układów hydrożelowych. Przedstawiono główne strategie otrzymywania hydrożeli formowanych w miejscu implantowania, z zasadniczym podziałem na sieciowanie chemiczne i fizyczne.

Słowa kluczowe: hydrożele wstrzykiwalne, sieciowanie *in situ*, inżynieria tkankowa, systemy dostarczania leków.

Polymeric *in situ* forming systems for biomedical applications. Part II. Injectable hydrogel systems

Abstract: The paper is the second part of a review concerning polymeric systems formed at the site of application (*in situ*). The following presentation relates to injectable hydrogel systems. Brief description of the polymers applied in such systems is given. The main strategies for preparing hydrogels at the target site are also described. *In situ* gelling systems have been essentially classified into chemically and physically crosslinked ones.

Keywords: injectable hydrogels, *in situ* crosslinking, tissue engineering, drug delivery systems.

Hydrożele definiuje się zazwyczaj jako materiały polimerowe, które w kontakcie z wodą ulegają spęcznieniu, lecz ze względu na usieciowaną strukturę nie rozpuszczają się w niej. Usieciowanie hydrożeli może mieć charakter fizyczny (poprzez wiązania wodorowe, jonowe, oddziaływania van der Waalsa) bądź chemiczny (z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych). W charakterze materiału biomedycznego hydrożele po raz pierwszy wykorzystali w latach 60-tych ub. wieku Lim i Wichterle, którzy opracowali soczewki kontaktowe na bazie metakrylanu 2-hydroksyetylu [1]. W następnych latach hydrożele nabierały coraz większego znaczenia jako biomateriały, ze względu na szereg unikatowych cech, takich jak: biokompatybilność, duża zawartość wody, elastyczność, przepuszczalność tlenu i substancji chemicznych (odżywczych, produktów metabolizmu). Obecnie hydrożele są wykorzystywane do produkcji soczewek kontaktowych, opatrunków okluzyjnych, klejów chirurgicznych, pokryć przeciwwzkrzepowych protez naczyń krwionośnych i serca.

W wielu zastosowaniach klinicznych korzystne jest formowanie hydrożeli *in vivo* w miejscu aplikacji (*in situ*). Znaczenia podjętego tematu dowodzi duża liczba prac, w tym także przeglądowych, dotycząca tego zagadnienia [2–7].

Prekursorami hydrożeli formowanych *in situ* są wstrzykiwalne układy płynne bądź półpłynne, które – wprowadzane do organizmu w sposób minimalnie inwazyjny – w miejscu wprowadzenia wypełniają szczelnie przestrzeń międzykankową, a następnie ulegają sieciowaniu. Uformowany implant hydrożelowy jest miękki i elastyczny, co minimalizuje ewentualne mechaniczne podrażnienia otaczających go tkanek. Ponadto, lek bądź komórki można umieścić w miejscu aplikacji w wyniku zmieszania ich z ciekłym układem hydrożelowym. Zmieszanie bioaktywnych składników z układem wstrzykiwalnym przed aplikacją zapewnia ich równomierną dystrybucję w już uformowanym implancie. Wstrzykiwalne materiały hydrożelowe są obiektem zainteresowania inżynierii tkankowej i chirurgii, ze względu na możliwość ich wprowadzania do organizmu, w sposób minimalnie inwazyjny, jako systemów kontrolowanego uwalniania leków bądź też rusztowań umożliwiających adhezję i proliferację komórek, a w konsekwencji regenerację tkanki. Formowane *in situ* hydrożele mogą być zastosowane w celu naprawy lub wspomagania regeneracji tkanki chrzęstnej, kostnej i naczyń krwionośnych.

¹⁾ Politechnika Śląska, Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, ul. Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice.

²⁾ Politechnika Śląska, Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, ul. M. Strzody 9, 44-100 Gliwice.

*) Autor do korespondencji; e-mail: Monika.Smiga-Matuszowicz@polsl.pl

Szczególnie dużo uwagi poświęca się wstrzykiwalnym systemom hydrożelowym, które po wprowadzeniu do żywego organizmu wykazują cechy podobne do cech wielu tkanek i biologicznej macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). W skład macierzy zewnątrzkomórkowej wchodzi różnego rodzaju białka i polisacharydy wydzielane przez obecne w niej komórki. Składniki ECM odgrywają istotną rolę w formowaniu tkanek, lokalizacji i migracji komórek, determinują ich kształt i uczestniczą w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Stąd też coraz częściej są opracowywane modyfikowane materiały hydrożelowe zawierające elementy bioaktywne, charakterystyczne dla ECM, takie jak: wrażliwe na degradację proteolityczną sekwencje peptydowe, czynniki wzrostu lub promotory adhezji (zwykle sekwencja RGD) [8]. Sekwencja RGD, składająca się z aminokwasów: argininy, glicyny i kwasu asparaginowego, występuje w wielu białkach ECM, np. w fibronektynie, i bierze udział w interakcjach komórek z macierzą. Sekwencja tripeptydu wbudowana w strukturę polimerów stymuluje adhezję i proliferację komórek, takich jak: chondrocyty, fibroblasty i komórki śródbłonna [9].

Niniejszy artykuł stanowi drugą część publikacji poświęconej wybranym polimerowym układom formowanym *in situ* do zastosowań biomedycznych [10]. W porównaniu ze wstrzykiwalnymi materiałami wspomagającymi regenerację tkanek twardych, omówionymi w Cz. I, wykorzystywanymi obecnie głównie w ortopedii, wstrzykiwalne układy hydrożelowe (którym poświęcono Cz. II) znajdują się na ogół ciągle jeszcze w fazie badań podstawowych. Wymagania stawiane biomateriałom formowanym *in situ* szczegółowo omówiono w Cz. I. W tej części opisano i porównano przede wszystkim surowce oraz główne strategie otrzymywania hydrożeli *in situ*, nie omówiono natomiast szerokiego zagadnienia modyfikacji materiałów hydrożelowych substancjami bioaktywnymi.

WYBRANE POLIMERY WYKORZYSTYWANE W HYDROŻELACH FORMOWANYCH *IN SITU*

Wśród materiałów hydrożelowych badanych pod kątem możliwości ich wykorzystania w systemach dostarczania leków lub inżynierii tkankowej, liczną grupę stanowią nietoksyczne polimery hydrofilowe, zazwyczaj biodegradowalne, pochodzenia naturalnego bądź syntetyczne. Najczęściej stosowanymi polimerami syntetycznymi są polimery zawierające w swym składzie poli(tlenek etylenu) (PEOX), poli(alkohol winylowy) (PVAL), poli(*N*-izopropioloakryloamid) (PNIPAm), natomiast spośród polimerów pochodzenia naturalnego wykorzystuje się alginian, kwas hialuronowy, chitozan, kolagen i żelatynę.

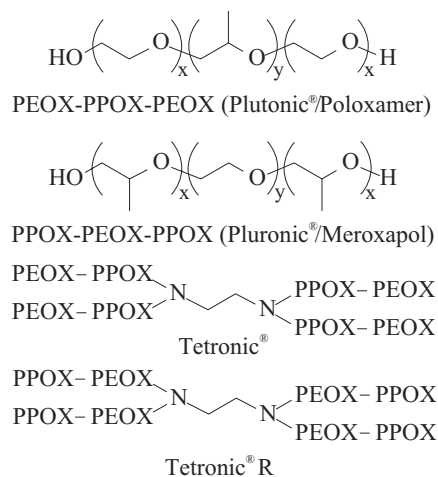
Poli(tlenek etylenu)

Poli(tlenek etylenu) — PEOX — [zwyczajowo poli(glikol etylenowy), PEG] uzyskał akceptację FDA (*Food and*

Drug Administration) jako materiał do zastosowań biomedycznych. Bardzo często PEOX jest stosowany w inżynierii tkankowej i w systemach dostarczania leków. Jest nietoksyczny i nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej organizmu. Ponadto jest relatywnie tani i łatwo dostępny w szerokim zakresie mas molowych. Hydrożele PEOX pod względem właściwości fizycznych i mechanicznych wykazują podobieństwo do tkanek naturalnych [11]. Rusztowania powstałe z PEOX charakteryzuje słaba przyczepność komórek, utrudniająca ich wzrost na powierzchni polimeru. Poli(tlenek etylenu) nie ulega biodegradacji. Wiadomo jednak, że makrocząsteczki PEOX, o masie molowej nieprzekraczającej 30 000 g/mol, mogą być wydalane z moczem [12].

Poli(tlenek etylenu-*blok*-tlenek propylenu-*blok*-tlenek etylenu)

W handlu są dostępne dwa rodzaje kopolimerów blokowych tlenku etylenu i tlenku propylenu (PEOX/PPOX): (1) liniowe kopolimery triblokowe pod nazwą Pluronic® (BASF) (Poloxamer wg *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) lub Pluronic R® (Merxapol), (2) ich czteroramienne odpowiedniki (Tetronic®, Tetronic®R) (schemat A). Dostępne są kopolimery o różnej masie molowej i różnej długości poszczególnych bloków PEOX i PPOX [13]. W wodnych roztworach takich kopolimerów pod wpływem ogrzewania zachodzi przemiana żół-żel. Szczególne zainteresowanie inżynierii tkankowej budzą roztwory kopolimerów PEOX/PPOX wykazujące przejście fazowe w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała ludzkiego. Mimo, że materiały na bazie PEOX/PPOX nie są biodegradowalne to, jak dowodzą badania wykonane przez J. Grindela i współpr., makrocząsteczki o masie molowej 16 000 g/mol są jeszcze filtrowane przez nerki [14]. FDA i EPA (*Environmental Protection Agency*) wyraziły zgodę na stosowanie wybranych polimerów z powyższej grupy, m.in. w charakterze dodatków do żywności, nośników leków i wstrzykiwalnych układów wykorzystywanych w inżynierii tkankowej [15].



Schemat A

Poli(alkohol winylowy)

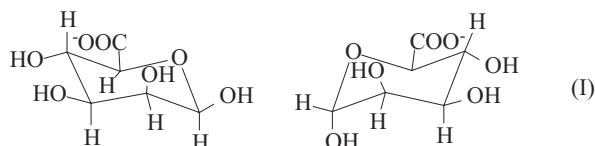
Hydrożele otrzymywane z PVAL charakteryzują się dużą chłonnością wody i elastycznością zbliżoną do elastyczności tkanek. Podobnie jak hydrożele otrzymywane z poli(tlenku etylenu), hydrożele PVAL nie wykazują adhezji komórek i białek. Ze względu na obecność wolnych grup hydroksylowych PVAL może być modyfikowany chemicznie [16].

Poli(N-izopropylakryloamid)

PNIPAm jest nieulegającym biodegradacji polimerem o wartości dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności (LCST) równej 32 °C. Jednym ze sposobów otrzymania hydrożeli biodegradowalnych PNIPAm jest sieciowanie liniowego polimeru za pomocą poliaminokwasów [17].

Alginiany

Alginiany to naturalne polisacharydy pozyskiwane z alg morskich lub produkowane pozakomórkowo przez niektóre bakterie. Kwas alginowy składa się z bloków o różnej długości reszt kwasu β -D-mannuronowego (M) i α -L-guluronowego (G), połączonych wiązaniami 1,4-glikozydowymi. W strukturze alginianów występują również bloki, w których poszczególne jednostki monomeryczne są rozmieszczone naprzemiennie [wzór (I)] [18].



kwas β -D-mannuronowy (M) kwas α -L-guluronowy (G)

bloki: $(-M-)_m$, $(-G-)_n$, $(-M-G-)_o$

W organizmach ssaków alginiany w zasadzie nie degradują ze względu na brak specyficznego enzymu — alginazy. Natomiast usieciowane jonowo hydrożele alginianów mogą *in vivo* ulegać niekontrolowanemu rozpuszczeniu na skutek wymiany jonów wapnia na obecne w środowisku fizjologicznym jednowartościowe jony, np. Na^+ [19]. Jeden ze sposobów poprawy degradowalności materiałów opartych na alginianach polega na częściowym utlenieniu łańcucha głównego. Alginiany są wykorzystywane jako nośniki w enkapsulacji żywych komórek do zastosowań terapeutycznych i otrzymywania hybrydowych sztucznych organów [20, 21], w inżynierii tkankowej oraz w systemach dostarczania protein, peptydów i leków [5, 22].

Kwas hialuronowy

Kwas hialuronowy to biodegradowalny polisacharyd zawierający powtarzające się jednostki disacharydu zbudowanego z kwasu D-glukuronowego i N-acetylogluko-

zoaminy. W organizmach żywych występuje w postaci soli sodowej, w największych ilościach w skórze, tkance chrzęstnej, płynie stawowym, cieple szklistym oka. Jako powszechny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu strukturalnej integralności tkanki. Kwas hialuronowy jest jedną z najbardziej higroskopijnych substancji. Jego wyjątkowa zdolność wiązania i zatrzymywania wody wynika ze struktury spiralnej z ulokowanymi na zewnątrz grupami karbonylowymi i sprawia, że tworzy sprężyste żel [23].

Chitozan

Chitozan jest polimerem, którego podstawową jednostkę powtarzalną stanowi β -(1,4)-2-amino-2-deoksy-D-glukopiranoza. Otrzymuje się go w wyniku deacetylacji chityny — poli[β -(1,4)-2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozy]. Stopień deacetylacji sięga na ogół 80 %. Ten nietoksyczny i biodegradowalny polisacharyd wykazuje aktywność hemostatyczną i immunologiczną, a także adhezję do tkanek [16]. W organizmie ulega degradacji enzymatycznej w wyniku działania lizozymu i chitynaz [24].

Dekstran

Dekstran to w większości liniowy polisacharyd zbudowany z jednostek glukozopiranozy połączonych wiązaniem 1,6-glikozydowym, zawiera 5–10 % rozgałęzień połączonych z łańcuchem wiązaniami 1,3-glikozydowymi [16, 25]. W warunkach *in vivo* pod wpływem dekstranazy ulega powolnej degradacji [26].

Kolagen i żelatyna

Kolagen stanowi atrakcyjny materiał do zastosowań biomedycznych, ponieważ jest głównym składnikiem ECM i najczęściej występującym białkiem w tkankach ssaków, pełniącym przede wszystkim funkcje strukturalne. Kolagen ma budowę prawoskrętnej superhelisy, utworzonej z trzech lewoskrętnych łańcuchów polipeptydowych α [27]. Ulega biodegradacji pod wpływem metaloproteinaz i proteazy serynowej. Pochodną kolagenu jest żelatyna, otrzymywana w wyniku zniszczenia naturalnej struktury trihelikalnej kolagenu. Jest w mniejszym stopniu immunogeniczna niż jej prekursor. Prawdopodobnie obecna w kolagenie struktura, odpowiedzialna za przekazywanie sygnałów informacyjnych do komórek, zostaje w żelatynie nienaruszona [4].

Scharakteryzowane polimery stanowią podstawowy składnik wstrzykiwalnych układów hydrożelowych, zwykle jednak muszą być poddane funkcjonalizacji, odpowiednio do użytej metody sieciowania.

METODY SIECIOWANIA

Aby uzyskać hydrożel *in situ* należy zastosować techniki, które zapewnią szybkie sieciowanie w obecności

wody, prowadzące do uformowania stabilnej, pęczniającej w warunkach fizjologicznych sieci polimerowej. Formowanie hydrożelu powinno następować w ciągu kilku minut, aby nie doszło do wycieku wstrzykiwalnego układu do sąsiadujących tkanek. Akceptowalne warunki sieciowania zarówno chemicznego, jak i fizycznego obejmują stosunkowo wąski zakres pH i temperatury.

Sieciovanie chemiczne

W przypadku sieciowania chemicznego istotne jest uzyskanie odpowiedniej szybkości reakcji w warunkach temperatury i pH zbliżonych do fizjologicznych. Substraty, a także produkty uboczne powstające w trakcie reakcji sieciowania, muszą być rozpuszczalne w wodzie i nietoksyczne. Sieciovanie chemiczne prowadzi się według mechanizmu rodnikowego, z wykorzystaniem klasycznych reakcji organicznych (reakcji zaliczanych do grupy „click chemistry” lub tworzenia imin), a także reakcji enzymatycznych.

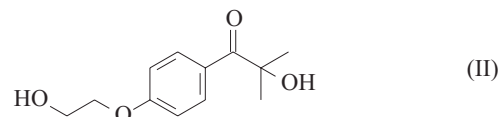
Sieciovanie rodnikowe

Niewielka konwersja wiązań podwójnych w syntezie wysokosieciovanych polimerów jest częstym problemem i może być przyczyną pogorszenia właściwości mechanicznych, a także obecności w układzie potencjalnie toksycznych, nieprzereagowanych monomerów. W przypadku, gdy hydrożele są formowane metodą sieciowania rodnikowego można, jak podają niektóre źródła, uzyskać bardzo dużą konwersję wiązań podwójnych, dzięki temu, że w wodzie makro-rodniki utrzymują znaczną ruchliwość łańcucha w trakcie żelowania [28]. W celu ograniczenia zawartości związków małowcząsteczkowych – zazwyczaj cytotoxycznych monomerów – w charakterze prekursorów hydrożeli formowanych *in situ* metodą polimeryzacji rodnikowej często stosuje się rozpuszczalne w wodzie makromonomery zawierające przynajmniej dwie reaktywne grupy. Chemiczne sieciowanie wykorzystujące mechanizm rodnikowy prowadzi się przy użyciu fotoinicjatorów lub inicjatorów redoks.

Polimeryzacja fotochemiczna

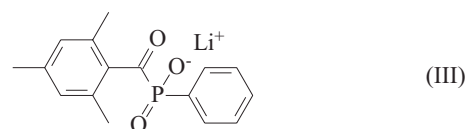
Hydrożele zarówno syntetyczne, jak i naturalne, formowane *in situ* pod wpływem bodźca świetlnego, szeroko opisano w artykułach przeglądowych dotyczących fotoczułych wstrzykiwalnych układów do zastosowań biomedycznych [16, 29, 30]. Prekursorami hydrożeli formowanych fotochemicznie *in situ* są zazwyczaj makromonomery hydrofilowe, zakończone z obu stron grupami akrylowymi, względnie metakrylowymi lub fumarowymi. Najczęściej główny łańcuch stanowi poli(tlenek etylenu) [31, 32], poli(alkohol winylowy) [33, 34], kwas hialuronowy [35], alginiany [36, 37], dekstran [38] lub chitozan [35, 39].

Polimeryzacja inicjowana fotochemicznie, prowadząca do wytworzenia sieci polimerowej, pod wieloma względami jest korzystniejsza od pozostałych metod polimeryzacji rodnikowej. Fotosieciovanie charakteryzuje duża szybkość reakcji (do kilku minut) nawet w temperaturze pokojowej lub fizjologicznej. Temperaturą można sterować na drodze zmiany natężenia światła [40]. Pewnym ograniczeniem fotopolimeryzacji jest grubość utwardzanej warstwy, ze względu na absorpcję światła przechodzącego przez utwardzaną kompozycję możliwe jest sieciowanie tylko stosunkowo cienkich warstw i w związku z tym jest konieczne stosowanie odpowiednich urządzeń naświetlających, wprowadzanych, np. laparoskopowo, lub stosowanie fotopolimeryzacji transdermalnej w przypadku sieciowania materiałów umiejscowionych tuż pod skórą. Fotopolimeryzację transdermalną badano podczas implantowania za pomocą technik minimalnie inwazyjnych układów przydatnych w rekonstrukcji tkanki chrzęstnej [41, 42] bądź podczas indukowania rozwoju sieci naczyniowej [43]. Ze względu na znaczną absorpcję promieniowania UV przez skórę, najefektywniejszymi fotoinicjatorami polimeryzacji podskórnej są fotoinicjatory absorbujące światło o długości fali z zakresu światła widzialnego lub nawet podczerwieni. W przypadku fotopolimeryzacji nietransdermalnej jest ważne, by żywe komórki immobilizowane w rusztowaniach hydrożelowych nie były narażone na działanie szkodliwego krótkofalowego promieniowania UV.

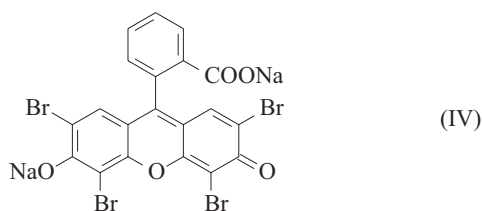


W hydrożelowych materiałach formowanych *in vivo* dość często jest stosowany 1-[4-(2-hydroksyetoxy)fenylo]-(2-hydroksy-2-metylo)propan-1-on (IrgacureTM 2959) [wzór (II)]. Jego zaletą jest mała cytotoxyczność, a także – w porównaniu z innymi handlowo dostępnymi fotoinicjatorami – najlepsza rozpuszczalność w wodzie (ok. 2 % mas.) [44]. Wspomniany fotoinicjator wykazuje maksimum absorpcji światła przy λ ok. 280 nm [45]. W celu zminimalizowania mutagennego wpływu krótkofalowego promieniowania UV, w przypadku IrgacureTM 2959 stosuje się zazwyczaj promieniowanie o długości fali 365 nm, mimo że następuje znaczny spadek wartości molowego współczynnika ekstynkcji odpowiadającego tej długości fali [46].

Stosunkowo niedawno opisano nowe układy fotoinicjujące polimeryzację za pomocą światła widzialnego w środowisku wodnym. Przykładem jest tu feny-



lo-2,4,6-trimetylobenzoilofosfinian litu [wzór (III)], efektywny nawet przy $\lambda > 400$ nm, niecytotoksyczny i charakteryzujący się lepszą rozpuszczalnością w wodzie niż IrgacureTM 2959 [47].



Eozyna [wzór (IV)], należąca do grupy barwników ksantogenowych, stosowana jest zazwyczaj razem z trzeciorzędową aminą (zwykle metyldietanoloaminą lub trietanoloaminą) i dodatkowo 1-winylo-2-pirolidonem w roli przyspieszacza. Eozyna wykazuje maksimum absorpcji przy $\lambda \sim 510$ nm, zalicza się ją więc do fotoinicjatorów absorbujących w zakresie światła widzialnego. Systemy fotoinicjujące zawierające eozynę zastosowano m.in. do otrzymywania — z diakrylanu poli(glikolu etylenowego) — hydrożelowych rusztowań dla mezenchymalnych komórek macierzystych [32] lub do enkapsulacji fibroblastów [31].

Pewną alternatywą dla fotopolimeryzacji w procesie formowania hydrożeli *in vivo*, może być polimeryzacja z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego. Tseng i współpr. przeprowadzili badania *in vitro* utwardzania poli(tlenku etylenu) zakończonego grupami akrylowymi (PEOX-DA) za pomocą promieniowania X. Zastosowany sposób polimeryzacji eliminuje wprawdzie obecność szkodliwych fotoinicjatorów, jednak ze względu na to, że zastosowana dawka promieniowania (wynosząca 1 Sv) jest stosunkowo duża, metoda wymaga optymalizacji w celu znacznej redukcji dawki promieniowania rentgenowskiego do bezpiecznego poziomu [48].

Polimeryzacja inicjowana układem redoks

Pewne ograniczenia stosowania fotopolimeryzacji w procesie żelowania *in vivo*, związane ze, wspomnianą już, głębokością utwardzania oraz możliwością występowania tzw. efektu cienia, nie dotyczą przypadku polimeryzacji rodnikowej inicjowanej układem redoks. Układ składający się z nadsiarczanu amonu bądź potasu i tetrametyloetylenodiaminy (APS/TEMED) był jednym z pierwszych układów redoks, wykorzystanych w syntezie hydrożeli przeznaczonych do zastosowań biomedycznych [49], w tym również do wstrzykiwalnych materiałów hydrożelowych utwardzanych *in vivo* [50]. Mechanizm wytwarzania reaktywnych rodników w układzie APS/TEMED opisali Feng i współpr. [51]. Użyty system jest bardzo efektywny, nawet w temperaturze pokojowej, niemniej jednak nieprzereagowane składniki, a także produkty ich degradacji, pogarszają biokompatybilność hydrożeli. Znaczną toksyczność poszczególnych składników omawianego układu wykazali m.in. Desai

i współpr. w badaniach toksyczności wobec fibroblastów [52]. Podobnie, toksyczności zarówno APS, jak i TEMED dowiedli Shifeng i współpr. [53]. Składniki te użyte w układzie odznaczają się jednak mniejszą toksycznością, prawdopodobnie ze względu na powstawanie mniejszej ilości toksycznych produktów reakcji pomiędzy APS i TEMED.

Toksyczności nie wykazuje system zawierający nad-tlenek wodoru i jony żelaza(II), w stężeniach poniżej, odpowiednio, 5 i 0,5 mmoli/dm³ [54, 55]. W omawianym układzie źródłem rodników hydroksylowych jest tzw. reakcja Fentona (schemat B). Zwykle ta reakcja jest prowadzona w środowisku kwaśnym (pH ok. 2,5), co ogranicza możliwości jej wykorzystania w procesie polimeryzacji prowadzonej w warunkach fizjologicznych. Niemniej jednak wspomniany system inicjowania zastosowano niedawno do otrzymania wstrzykiwalnych hydrożeli zawierających żywe komórki. L. Sun i współpr. spolimerizowali *N*-(2-hydroksyetylo)akryloamid i PEOX-DA [diakrylowany poli(tlenek etylenu)] w obecności chlorku żelaza(II) i wody utlenionej w neutralnym pH, w wyniku czego uzyskali przezroczyste i wytrzymałe hydrożele. Enkapsulowane w hydrożelu mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego, a także komórki mysiego fibrosarcoma wykazywały wysoką przeżywalność [56].



Schemat B

Interesującym rozwiązaniem wydaje się wprowadzenie do inicjującego układu, obok jonów Fe^{2+} , glukozy i oksydazy glukozowej. Enzym przekształca glukozę w kwas glukonowy. Regeneracja koenzymu oksydazy FAD (dinukleotydu flawinoadeninowego) następuje w wyniku redukcji O_2 do H_2O_2 (schemat C). Nadtlenek wodoru wytworzony enzymatycznie w reakcji z jonami



Schemat C

żelaza(II) tworzy z kolei rodniki hydroksylowe. Ponieważ w reakcji jest zużywany tlen cząsteczkowy, praktycznie biorąc zanika problem inhibicji tlenowej. Autorzy zastosowali powyższy układ inicjowania do enkapsulacji fibroblastów w procesie polimeryzacji czteroramiennego poli(tlenku etylenu), sfunkcjonalizowanego grupami akrylanowymi [57].

Sieciovanie z wykorzystaniem klasycznych reakcji organicznych

Formowanie hydrożeli z wysoką wydajnością w łagodnych warunkach w środowisku wodnym jest możli-

we z zastosowaniem reakcji z grupy CC (ang. *click chemistry*). Termin *click chemistry*, wprowadzony przez K.B. Sharplessa i współpr., nie wskazuje na konkretną reakcję, oznacza raczej koncepcję reakcji i procesów spełniających, m.in. wymienione powyżej kryteria (wysoka wydajność, nieskomplikowane warunki prowadzenia procesów, najlepiej bez rozpuszczalnika, lub stosowanie przyjaznych rozpuszczalników) [58].

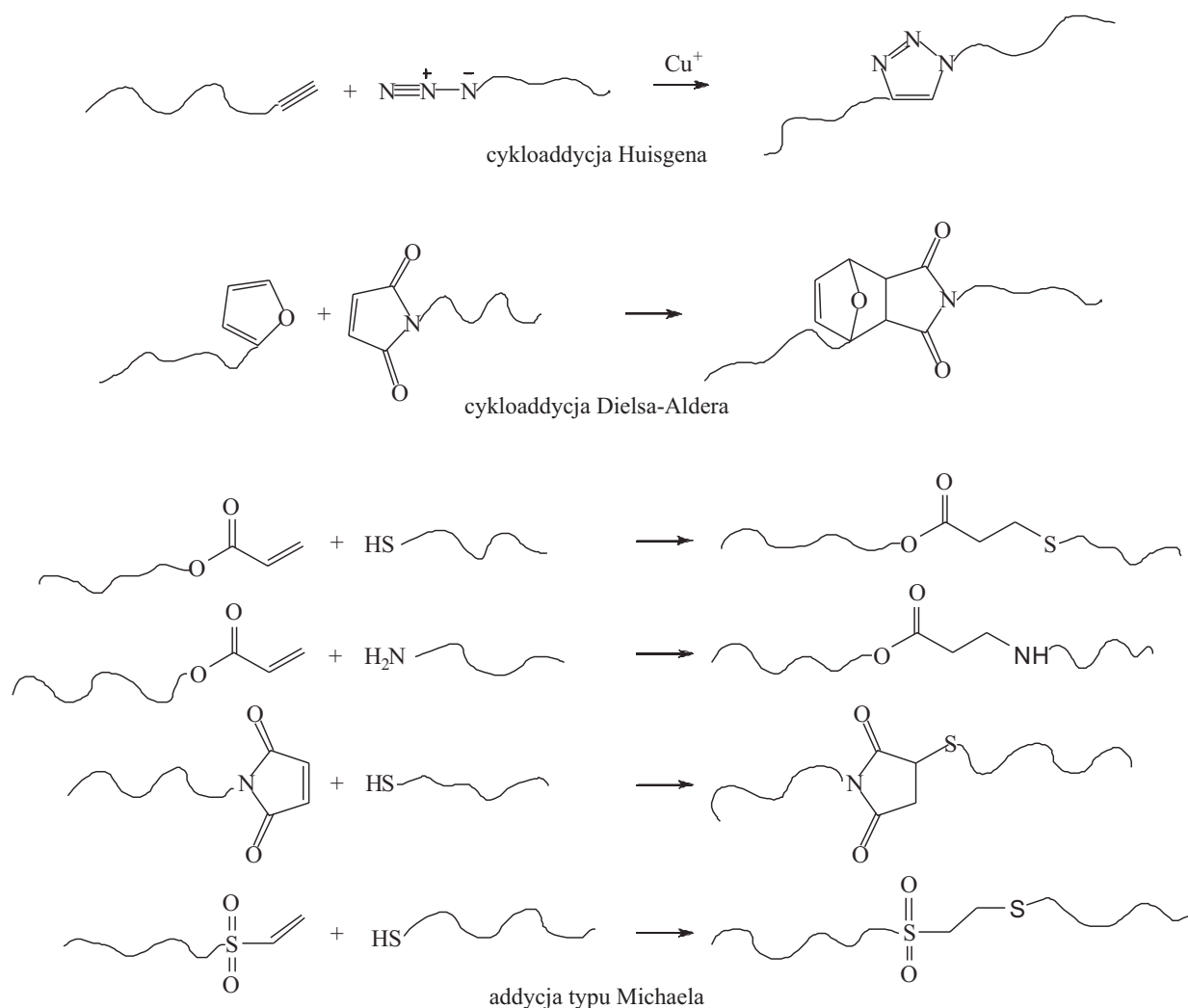
Cykloaddycja Huisgena

Cykloaddycja Huisgena, zachodzi pomiędzy azydkami a końcowymi grupami acetylenowymi, polega na tworzeniu 1,2,3-triazolu w wyniku cykloaddycji 1,3-dipolarnej (schemat D). Dodatek jonów miedzi(I) zwiększa szybkość i regioselektywność tej reakcji. Do formowania hydrożeli *in situ* stosowano modyfikowane polisacharydy, zawierające grupy azydkowe i acetylenowe [59], poli(alkohol winylowy) [60] lub poli(tlenek etylenu) [61, 62]. Wprowadzenie dodatkowo w sieć polimerową degradowalnych fragmentów, np. sekwencji peptydowej RGD [62], zwiększa użyteczność hydrożelu w inżynierii

tkankowej lub systemach kontrolowanego uwalniania leków. Reakcje cykloaddycji Huisgena przebiegają w łagodnych warunkach i z dużą wydajnością. Zwykle prowadzą do utworzenia hydrożeli o strukturze zbliżonej do sieci idealnej, charakteryzujących się dobrymi właściwościami fizycznymi. Pewne ograniczenie w przypadku materiałów formowanych *in situ* stanowi obecność w układzie śladowych ilości miedzi. Zwiększona zawartość miedzi w organizmie prowadzi do stanów zapalnych wątroby, podejrzewa się także, że jest jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój choroby Alzheimera. W literaturze można znaleźć publikacje dotyczące opracowania układów niezawierających miedzi. W takich układach czas formowania hydrożelu jest jednak dość długi (co najmniej 12 h) [63], co również znacznie ogranicza ich zastosowanie w procesie formowania hydrożelu *in situ*.

Cykloaddycja Dielsa-Aldera

Reakcja cykloaddycji [4 + 2] Dielsa-Aldera, zachodząca pomiędzy dienem i dienofilem, prowadzi do



Schemat D

utworzenia sześciocząłowego pierścienia (schemat D). Cykloaddycja Dielsa-Aldera nie wymaga obecności katalizatora ani inicjatora. Mimo tych zalet stosunkowo mało doniesień literaturowych dotyczy wykorzystania omawianej reakcji w formowaniu hydrożeli *in situ*, prawdopodobnie ze względu na zbyt długi czas sieciowania (pomimo znacznego przyspieszenia reakcji w środowisku wodnym) [64]. Przykładowo, sieciowanie materiałów na bazie kwasu hialuronowego sfunkcjonalizowanego grupą furanową a także poli(tlenku etylenu) z grupą maleimidową trwało kilka godzin [65].

Addycja typu Michaela

Addycja typu Michaela polega na przyłączeniu nukleofili tlenowych, azotowych bądź siarkowych do nienasyconego wiązania węgiel-węgiel aktywowanego grupą elektroakceptorową. W reakcjach formowania hydrożeli z wykorzystaniem addycji typu Michaela, jako nukleofili używa się prawie wyłącznie ugrupowań tiolowych, rzadziej aminowych. Natomiast akceptorami są zazwyczaj ugrupowania akrylanowe, metakrylanowe, maleimidowe bądź sulfony winylowe (schemat D). Addycja typu Michaela między wymienionymi donorami i akceptorami stanowi dogodny sposób formowania żeli *in situ* ze względu na to, że przebiega w warunkach środowiska fizjologicznego, nie wymaga użycia katalizatorów i nie generuje produktów ubocznych. Ponadto, w większości przypadków czas sieciowania liczy się w minutach.

Lutolf i Hubbell pierwsi wykorzystali addycję typu Michaela do formowania trójwymiarowych struktur hydrożelowych. W charakterze reagentów użyli wieloramiennych makromonomerów PEG, o różnej masie molarnej, zakończonych grupami winylosulfonowymi, oraz liniowych oligopeptydów zakończonych grupami tiolowymi [66, 67]. Szybkość biodegradacji i adhezja komórek do otrzymanego hydrożelu były podobne jak w przypadku biologicznej macierzy zewnątrzkomórkowej.

Addycja typu Michaela była również stosowana do otrzymywania hydrożeli *in situ* z modyfikowanych polisacharydów. Między innymi w zespole J. Feijena opracowano wstrzykiwalny, biodegradowalny biomateriał do regeneracji tkanki chrzęstnej. W syntezie wykorzystano kwas hialuronowy zawierający grupy tiolowe (HA-SH) oraz czteroramienny PEG z końcowymi ugrupowaniami winylosulfonowymi. Stopniowa poliaddycja składników w obecności chondrocytów prowadziła do uformowania hydrożelu z równomiernie rozmieszczonymi komórka-

mi chrzęstnymi. Badania *in vitro* wykazały, że umieszczone w hydrożelu chondrocyty zachowały zdolność do podziału, a także do wytwarzania glikozoaminoglikanów i kolagenu typu II [68].

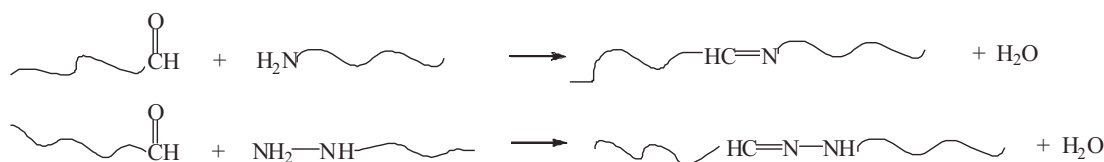
Wstrzykiwalne, biodegradowalne hydrożele, formowane na skutek przebiegającej addycji typu Michaela, i przeznaczone do kontrolowanego uwalniania ludzkiego hormonu wzrostu (hGH), opracował zespół Hahna. Jako donor Michaela zastosowano – podobnie jak poprzednio – HA-SH, jako akceptor użyto natomiast adduktu kwasu hialuronowego z metakrylanem 2-aminoetylu [69].

Addycja typu Michaela była ponadto wielokrotnie wykorzystywana do formowania *in situ* hydrożeli zawierających w swym składzie polisacharydy, np. chitozan [70] lub dekstran [71].

Sieciowanie w wyniku tworzenia imin

N-podstawione iminy tworzą się w wyniku kondensacji pierwszorzędowych amin z aldehydami (schemat E). Z amin bądź aldehydów, aromatycznych lub mających rozbudowane podstawniki, powstają stosunkowo trwałe iminy – znane również jako zasady Schiffa. Metoda otrzymywania hydrożeli *in situ* na drodze tworzenia imin jest najczęściej wykorzystywana w przypadku polisacharydów. Wykorzystuje się grupy aminowe obecne w niektórych polisacharydach (żelatyna, chitozan) bądź wprowadza się je przy użyciu diamin (etylenodiaminy, dihidrazynu kwasu adypinowego) zazwyczaj w obecności chlorowodoru 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) [71–74]. Grupy aldehydowe otrzymuje się w wyniku utlenienia za pomocą NaIO_4 wycinalnych grup hydroksyloowych w polisacharydzie [72, 73, 75]. Tą metodą wytwarza się hydrożele na ogół z zadowalającym stopniem usieciowania. W przypadku hydrożeli uzyskiwanych z aldehydowej pochodnej karboksymetylocelulozy i żelatyny sieciowanie przebiegało wyłącznie po dodaniu do układu boraksu. Katalizujący wpływ tego czynnika na tworzenie się imin między łańcuchami polisacharydów można tłumaczyć kompleksowaniem przez atom boru grup hydroksyloowych karboksymetylocelulozy [75].

Metoda formowania hydrożeli, wykorzystująca powstawanie imin, nie wymaga stosowania dodatkowych czynników sieciujących, przebiega w warunkach fizjologicznych, a otrzymywane materiały są biodegradowalne i nietoksyczne. Możliwość użycia takich hydrożeli w rekonstrukcji tkanki chrzęstnej potwierdzono na drodze



Schemat E

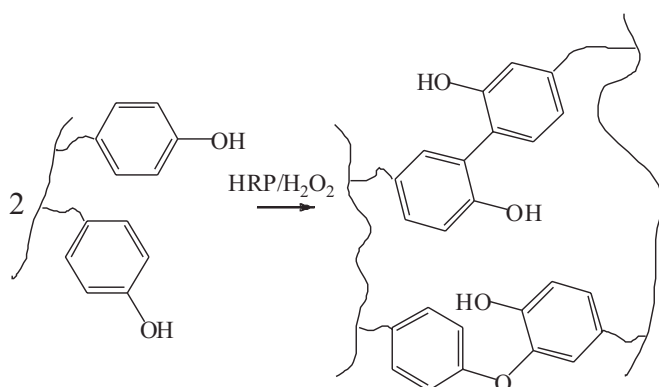
immobilizacji w nich chondrocytów, które wykazywały wysoką przeżywalność, zdolność do proliferacji i niezmienną morfologię [75, 76].

Sieciovanie enzymatyczne

Większość enzymów katalizuje reakcje chemiczne w niskiej temperaturze i w warunkach obojętnego pH. Enzymy zazwyczaj charakteryzują się także dużą specyficznością względem substratów, jak i katalizowanej reakcji. Reakcja sieciovania może więc przebiegać w obecności innych grup funkcyjnych w polimerze. Najczęściej wykorzystywanymi enzymami w procesie sieciovania są peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase* – HRP) i transglutaminaza (TGs).

Peroksydaza chrzanowa – HRP

Reakcje sieciovania z udziałem tego enzymu w obecności nadtlenku wodoru polegają na utleniającym sprzęganiu łańcuchów polimerowych z przyłączonymi cząsteczkami tyraminy. Sprzężenie następuje w wyniku utworzenia wiązania węgiel-węgiel w pozycjach *ortho* pierścieni fenylowych bądź wiązania węgiel-tlen między atomem węgla znajdującym się w pozycji *ortho* i tlenem grupy fenolowej drugiej cząsteczki tyraminy (schemat F). Takim

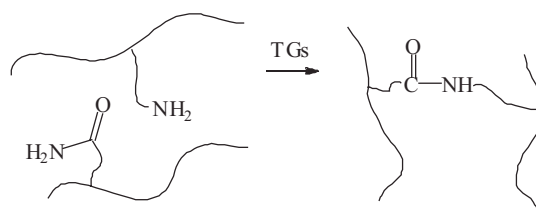


Schemat F

sieciovaniu poddawano koniugaty tyraminy z kwasem hialuronowym [77], dekstranem [78] i kopolimerowym surfaktantem blokowym Tetronic® [79]. Czas żelowania mieścił się w przedziale od kilku sekund do kilku minut, w zależności od stężenia polimeru i enzymu, a także stosunku ilości enzymu i H_2O_2 względem tyraminy. W metodzie tej jest konieczna kontrola ilości wprowadzanego H_2O_2 . Jak wykazali Asad i współpracownicy w badaniach chondrocytów obecność nadtlenku wodoru o stężeniu powyżej 0,2 mM/dm³ indukuje apoptozę komórek [80].

Transglutaminaza TGs

Transglutaminaza jest enzymem katalizującym tworzenie wiązania amidowego między grupą γ -karboksy-



Schemat G

amidową glutaminy a pierwszorzędowymi aminami (schemat G). W organizmach żywych taka reakcja reszt glutaminowych związanych z peptydami lub białkami i z udziałem ϵ -aminowych grup lizyny czy też grup aminowych poliamin, prowadzi do sieciovania białek. Sperinde i Griffith jako pierwsi wykorzystali TGs do otrzymania hydrożeli w łagodnych warunkach. W syntezie stosowali poli-peptyd zawierający lizynę i sfunkcjonalizowany glutaminą handlowy produkt reakcji eteru diglicydyłowego Bisfenolu A z PEG (10 000 g/mol) [81]. B.H. Hu i P.B. Messersmith używali dwóch rodzajów cztero-funkcyjnych koniugatów PEG i peptydów. Jeden zakończony jednostkami L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA), drugi natomiast cząsteczkami glutaminy [82]. W przypadku sieciovania układów z wykorzystaniem TGs zwierzęcej, zwykle jest wymagana obecność soli wapnia w odpowiednim stężeniu, ponieważ aktywność transglutaminaz regulują jony Ca^{2+} . Natomiast transglutaminaza pochodzenia mikrobiologicznego (mTGs) nie wymaga obecności jonów wapnia [83]. K. Yokoyama i współpracownicy wykorzystali mTGs do immobilizowania komórek *E. coli* w usieciovanej żelatynie. Nie była konieczna wcześniejsza funkcjonalizacja żelatyny, ponieważ zawierała ona zarówno lizynę, jak i glutaminę. Jednak usieciovane hydrożele zyskiwały odpowiednie właściwości reologiczne dopiero po upływie 5 h [84].

Metody sieciovania fizycznego

Ze względu na łagodne warunki sieciovania fizycznego, większość hydrożeli fizycznych może być formowana *in vivo*. Takie hydrożele charakteryzują się zazwyczaj mniejszą toksycznością niż hydrożele formowane metodami chemicznymi, dzięki nieobecności cząsteczek inicjatora bądź czynników sieciovujących. Sieciovanie fizyczne zwykle jednak prowadzi do utworzenia hydrożeli mniej stabilnych i o słabszych właściwościach mechanicznych.

Mechanizmy odpowiedzialne za tworzenie hydrożeli fizycznych, w tym formowanych *in situ*, obejmują zazwyczaj oddziaływania jonowe, hydrofobowe lub wiązania wodorowe.

Układy termoczule

O przydatności tego typu układów przeznaczonych do formowania *in situ* decyduje m.in. wysokość temperatury żelowania. Znaczenie mają tylko takie układy, które

w temperaturze fizjologicznej ulegają odwracalnemu przejściu zol-żel i, w odróżnieniu od układów, gdzie zachodzi wytrącanie polimeru, zawierają w dalszym ciągu znaczne ilości wody. Zazwyczaj polimerowe układy termozelujące stanowią makrocząsteczki z udziałem fragmentów zarówno hydrofilowych, jak i hydrofobowych. Do najczęściej badanych zalicza się kopolimery *N*-izopropioloakryloamid, kopolimery blokowe tlenku etylenu z tlenkiem propylenu, kopolimery, w których do bloku PEG jest przyłączony blok biodegradowalnego poliestru alifatycznego [poli(D,L-laktyd) (PLA), poli(D,L-laktyd-*co*-glikolid) (PLGA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) lub poli(ϵ -kaprolakton-*co*-laktyd) (PCLA)]. Przeglądu hydrożelowych układów termoczulych formowanych *in situ* dokonali Ruel-Gariépy i Leroux [85]. Mechanizm odpowiedzialny za przejście fazowe pod wpływem temperatury jest zależny od rodzaju polimeru.

W przypadku PNIPAm, podobnie jak w innych poli(*N*-podstawionych akryloamidach), przejście fazowe jest związane ze zmianą konformacji z kłębaka makrocząsteczki do konformacji globuli [86, 87]. Poli(*N*-izopropioloakryloamid) w wodzie, w odpowiedzi na małe zmiany temperatury, wykazuje znaczne zmiany stopnia hydratacji. W temp. 32 °C ostra przemiana fazowa prowadzi do wytrącania liniowego PNIPAm z roztworu wodnego. W celu uzyskania przejścia roztworu PNIPAm w żel, zamiast wytrącenia polimeru z wody, do łańcucha wprowadza się hydrofilowe komonomery. Przykładowo *N*-izopropioloakryloamid poddaje się kopolimeryzacji z kwasem akrylowym [88–90], *N*-winylopirolidonem [91], metakrylanem eteru metylowego glikolu oligoetylenowego [metakrylanem metoksy-(oligoetoksy)etylu] (mPEGMMA) [92]. Kopolimer NIPAm z kwasem akrylowym [poli(NIPAm-*co*-AAc)], wykazujący przejście fazowe w temp. 30–34 °C, badano pod kątem możliwości wykorzystania w sztucznej trzustce hybrydowej. Wykazano, że żel uformowany w temperaturze ciała ludzkiego zapewnia odpowiednie warunki do prawidłowego funkcjonowania umieszczonych w nim żywych komórek wyspepek Langerhansa [88]. Poli(NIPAm-*co*-AAc) badano również pod kątem przydatności w odbudowie tkanki chrzęstnej [89, 90]. Otrzymane hydrożele z mPEGMMA i PNIPAm charakteryzują się dobrą przezroczystością. Umieszczone w hydrożelu mezenchymalne komórki macierzyste wykazywały dużą przeżywalność i rozrastały się z utworzeniem trójwymiarowych kultur [92].

Amfifilowe kopolimery blokowe, należące do grupy surfaktantów niejonowych, są zbudowane z przynajmniej dwóch części (bloków) różniących się powinowactwem do wody. Zazwyczaj funkcję bloku hydrofilowego pełni poli(tlenek etylenu), natomiast w odniesieniu do bloków hydrofobowych jest obserwowana duża różnorodność. Najprostsze układy stanowią liniowe kopolimery typu AB, ABA bądź BAB. W zależności od rodzaju bloku hydrofobowego, a także długości obu bloków otrzymuje się systemy różniące się właściwościami fizykochemicznymi. Ponieważ makrocząsteczki kopolimeru skła-

dają się z dwóch rodzajów segmentów o różnej rozpuszczalności w wodzie, w warunkach małych stężeń występują w roztworze jako pojedyncze łańcuchy (unimery). Po przekroczeniu krytycznego stężenia micelizacji (cmc) rozpoczyna się proces organizacji makrocząsteczek (micelizacja). W przypadku większości kopolimerów blokowych wykorzystywanych do tworzenia hydrożeli, wzrost temperatury powyżej cmc powoduje żelowanie roztworu na skutek asocjacji micel. Jest to proces odwracalny – obniżenie temperatury hydrożelu wywołuje przejście w stan ciekły.

Temperatura przejścia fazowego jest uzależniona od składu polimeru i stężenia roztworu. Triblokowy kopolimer tlenku etylenu i tlenku propylenu, zawierający ok. 70 % mas. tlenku etylenu w postaci bloku o masie molowej 13 000 g/mol (Poloxamer 407/Pluronic F-127), w roztworze o stężeniu co najmniej 20 % mas. wykazuje przejście fazowe w temp. 37 °C [93]. Żele na bazie Poloxameru wykazują jednak małą wytrzymałość mechaniczną i charakteryzują się szybką erozją (rozpuszczanie warstw powierzchniowych). Z tego względu w systemach dostarczania leków mogą być stosowane raczej w terapiach krótkoterminowych, takich jak leczenie bólu czy infekcji [94]. Szczepienie kopolimerów blokowych PEOX i PPOX na innych polimerach może poprawić m.in. właściwości mechaniczne i stabilność formowanego hydrożelu. Roztwory wodne zawierające Pluronic F-127 szczepiony na chitozanie lub na żelatynie badano jako wstrzykiwalne układy stosowane do odbudowy tkanki chrzęstnej [95, 96].

Kopolimery: PLGA-PEG-PLGA [97], PEG-PLGA-PEG [98], PLA-PEG-PLA [99, 100], PCL-PEG-PCL [101], PEG-PCL-PEG [102], PCLA-PEG-PCLA [103] są badane przede wszystkim pod względem możliwości wykorzystania w systemach miejscowego dostarczania leków lub jako wstrzykiwalne materiały oddzielające tkanki poszczególnych organów jamy brzusznej i miednicy, zapobiegające powstawaniu zrostów pooperacyjnych. Kopolimery blokowe tlenku etylenu i hydroksykwasów stanowią polimery, na bazie których uzyskano wstrzykiwalne systemy hydrożelowe, biodegradowalne i biokompatybilne. Uformowane w wyniku termozelowania hydrożele mają zadowalającą stabilność, pozwalającą na przedłużone uwalnianie leku. Przykładowo systemy oparte na kopolimerach PEG-PLGA-PEG uwalniają ketoprofen (lek hydrofilowy) w ciągu dwóch tygodni, natomiast spironolakton (lek hydrofobowy) – ponad dwóch miesięcy [98]. Układ oparty na kopolimerze triblokowym PLGA-PEG-PLGA, opatentowany przez Macromed pod nazwą ReGel[®] jako system pozajelitowego dostarczania leków [104], stanowi całą rodzinę produktów, które – zależnie od masy molowej, hydrofobowości i stężenia polimeru, wykazują różną temperaturę żelowania, szybkość degradacji, kinetykę i profil uwalniania leków. W fazie badań klinicznych znajdują się obecnie OncoGel[®] – preparat zawierający paklitaksel w ReGel[®] – i Cytoryn[®] z udziałem interleukiny-2 (IL-2) [105].

Kolejny przykład układu wykazującego zdolność żelowania w podwyższonej temperaturze stanowi roztwór wodny chitozanu. Temperatura żelowania zależy częściowo od stopnia deacetylacji chitozanu. W latach 2000–2001 pojawiły się doniesienia, że dodatek chlorku sodu i β -glicerofosforanu wpływa na zmianę oddziaływań elektrostatycznych, hydrofobowych i siłę wiązań wodorowych w układzie, prowadzącą do żelowania układu w podwyższonej temperaturze [106–108]. Technologia wytwarzania została zoptymalizowana przez Biosyntech Inc., dzięki czemu na rynku pojawiły się układy BST-Gel™ zdolne do żelowania w temperaturze ciała ludzkiego. Wstrzykiwalne hydrożele oparte na chitozanie i β -glicerofosforanie są obecnie badane głównie w układach dostarczających leki miejscowo w terapii przeciwnowotworowej [109, 110].

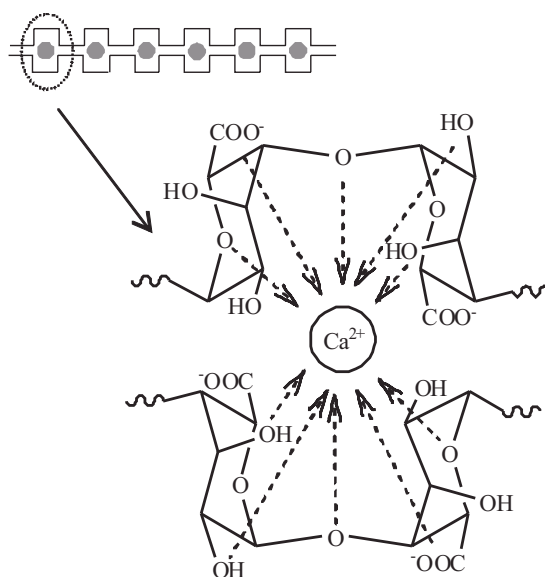
Sieciovanie w wyniku stereokompleksowania

W przypadku niektórych polimerów oddziaływania międzycząsteczkowe między łańcuchami makrocząstek o różnej taktyczności lub konfiguracji prowadzą do stereoselektywnej asocjacji (stereokompleksowania) [111]. Typowym polimerem ulegającym stereokompleksowaniu jest polilaktyd. Hydrożele na jego bazie otrzymano w wyniku zmieszania roztworów wodnych kopolimerów blokowych lub szczepionych, zawierających segmenty hydrofilowe i jednostki stereosekwencyjne L-laktydowe lub D-laktydowe. Aby powstała usieciowana struktura hydrożelu poszczególne stereosekwencje PLA muszą zawierać przynajmniej 11 jednostek laktydu [112]. Jako segmenty hydrofilowe wprowadzano PEG zarówno liniowy [113], jak i rozgałęziony [114, 115], Pluronic® [116], dekstran [112, 117], poli(metakrylan 2-hydroksyetylu) [118], poli[N-(2-hydroksypropylo)metakryloamid] [119].

Stereoselektywna asocjacja może stanowić użyteczną metodę formowania hydrożeli *in situ* charakteryzujących się większą wytrzymałością mechaniczną niż pozostałe hydrożele fizyczne [120]. Znaczną poprawę właściwości mechanicznych ($G' = 9,87$ kPa w 37°C) uzyskano zwłaszcza w przypadku hydrożeli powstałych na bazie kopolimerów rozgałęzionych. Zachodzące w roztworze wodnym trwałe stereokompleksowanie prowadzi do nieodwracalnego przejścia zol-żel [114].

Sieciovanie jonowe

Sieciovanie jonowe jest możliwe w przypadku polimerów wodorozpuszczalnych, zawierających zjonizowaną grupę funkcyjną, i zachodzi z udziałem jonów dwu- lub wielowartościowych. Dobrze znanymi przykładami polimerów, które mogą być usieciowane w wyniku oddziaływań jonowych są alginiany, zdolne do tworzenia sieci hydrożelowej w warunkach fizjologicznych w obecności jonów wapnia. Istotą mechanizmu sieciovania alginianów jest wymiana jonu sodu na jon Ca^{2+} , a następnie utworzenie struktury molekularnej z udziałem



Schemat H

bloków kwasu α -L-gulonowego, określanej jako *eggs-box model* (schemat H) [121–123]. We wstrzykiwalnych hydrożelach opartych na alginianach źródłem jonów wapnia są zazwyczaj siarczan(VI) wapnia lub węglan wapnia. Obecność trudnorozpuszczalnych soli spowalnia proces żelowania, dzięki czemu umożliwia zastosowanie takich systemów w charakterze rusztowań wstrzykiwalnych [124].

Formowanie hydrożeli *in situ* może odbywać się również na skutek oddziaływań jonowych między polikationem i polianionem lub przeciwnie naładowanymi, usieciowanymi mikrosferami. Przykładowo Hennink i wspólr. opracowali wstrzykiwalny materiał na bazie mikrosfer sfunkcjonalizowanych kwasem metakrylowym lub metakrylanem dimetyloaminoetylowym. Po zmieszaniu mikrosfer otrzymano materiały o cechach hydrożelu, które w zależności od zawartości wody wykazywały różną wytrzymałość mechaniczną [125].

Hydrożele typu shear-thinning

Niektóre z hydrożeli fizycznych wykazują odwracalne zmniejszenie lepkości pod wpływem naprężenia ścinającego (ang. *shear-thinning*). Czas, w którym następuje odbudowanie struktury hydrożelu, po ustąpieniu sił odpowiedzialnych za zmniejszenie lepkości, jest uzależniony od rodzaju materiału i występujących oddziaływań. Zdolność do tworzenia tego typu hydrożeli wykazują makrocząsteczki ulegające samoorganizacji, np. polipeptydy czy polimery z przyłączonymi cyklodekstrynami. Hydrożele typu *shear-thinning* stanowią obiecującą, stosunkowo młodą grupę hydrożeli formowanych *in situ*. W tego typu systemach aplikacja uprzednio wytworzonego hydrożelu jest możliwa dzięki działającym w trakcie iniekcji siłom ścinającym. Potencjalne zastosowanie takich układów to przede wszystkim wykorzystanie ich jako nośników substancji biologicznie aktywnych i komórek [126].

PODSUMOWANIE

Rosnące zainteresowanie inżynierii tkankowej hydrożelami formowanymi *in situ*, a także możliwościami ich aplikacji w systemach dostarczania leków, przyczyniło się do powstania wielu nowych i obiecujących strategii otrzymywania tego typu materiałów. Idealny układ przeznaczony do formowania hydrożeli *in situ* jest wstrzykiwalny, żeluje w pożądanym czasie, a po usiecieniu charakteryzuje się właściwościami mechanicznymi i biologicznymi zbliżonymi do właściwości naturalnych tkanek. Powinien też być biokompatybilny i z odpowiednią szybkością ulegać degradacji. Jednakże uzyskanie materiału posiadającego wszystkie pożądane właściwości jest niezwykle trudne. Do tej pory niewielka liczba opracowywanych wstrzykiwalnych układów hydrożelowych przeszła do fazy badań klinicznych. Wobec przedstawionych faktów należy oczekiwać propozycji nowych rozwiązań w tej dziedzinie.

LITERATURA

- [1] Wichterle O., Lim D.: *Nature* **1960**, 185, 117.
- [2] Drury J.L., Mooney D.J.: *Biomaterials* **2003**, 24, 4337. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5)
- [3] Van Tomme S.R., Storm G., Hennink W.E.: *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 355, 1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.057>
- [4] Tan H., Marra K.C.: *Materials* **2010**, 3, 1746. <http://dx.doi.org/10.3390/ma3031746>
- [5] Li Y., Rodrigues J., Tomás H.: *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, 2193. <http://dx.doi.org/10.1039/c1cs15203c>
- [6] Ko D.Y., Shinde U.P., Yeon B., Jeong B.: *Progress in Polymer Science* **2013**, 38, 672. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.08.002>
- [7] Patenaude M., Smeets N.M.B., Hoare T.: *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, 35, 598. <http://dx.doi.org/10.1002/marc.201300818>
- [8] Zhu J.: *Biomaterials* **2010**, 31, 4639. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044>
- [9] Park K.M., Joung Y.K., Park K.D.: *Macromolecular Research* **2008**, 16, 517. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03218553>
- [10] Śmiga-Matuszowicz M., Korytkowska-Wałach A., Łukaszczyk J.: *Polimery* **2015**, 60, 149.
- [11] Elisseeff J., Anseth K., Sims D. i in.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 3104. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.6.3104>
- [12] Veronese F.M., Pasut G.: *Drug Discovery Today* **2005**, 10, 1451. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03575-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03575-0)
- [13] Alexandridis P.: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1997**, 2, 478. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0294\(97\)80095-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0294(97)80095-7)
- [14] Grindel J.M., Jaworski T., Piraner O. i in.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, 91, 1936. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.10190>
- [15] Qiu Y., Park K.: *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, 321. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00203-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00203-4)
- [16] Iffkovits J.L., Burdick J.A.: *Tissue Engineering* **2007**, 13, 2369. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2007.0093>
- [17] Yoshida T., Aoyagi T., Kokufuta E., Okano T.: *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2003**, 41, 779. <http://dx.doi.org/10.1002/pola.10595>
- [18] Andersen T., Strand B.L., Formo K. i in.: *Carbohydrate Chemistry* **2012**, 37, 227. <http://dx.doi.org/10.1039/9781849732765-00227>
- [19] Lee K.Y., Mooney D.J.: *Progress in Polymer Science* **2012**, 37, 106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- [20] Lim F., Sun A.M.: *Science* **1980**, 210, 908. <http://dx.doi.org/10.1126/science.6776628>
- [21] Kozicki M., Kujawa P., Pajewski L. i in.: *Inżynieria Biomateriałów* **1999**, 2, 11.
- [22] Murua A., Portero A., Orive G. i in.: *Journal of Controlled Release* **2008**, 132, 76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.010>
- [23] Schroeder G.: „Nanotechnologia, kosmetyki, chemia supramolekularna”, *Cursiva* 2013, str. 63–87.
- [24] Kean T., Thanou M.: *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
- [25] Mehvar R.: *Journal of Controlled Release* **2000**, 69, 1. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00302-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00302-3)
- [26] Ito T., Yeo Y., Highley C.B. i in.: *Biomaterials* **2007**, 28, 3418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.017>
- [27] Gelse K., Pöschl E., Aigner T.: *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 1531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- [28] Bryant S.J., Davis-Arehart K.A., Luo N. i in.: *Macromolecules* **2004**, 37, 6726. <http://dx.doi.org/10.1021/ma0499324>
- [29] Nguyen K.T., West J.L.: *Biomaterials* **2002**, 23, 4307. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00175-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00175-8)
- [30] El Fray M., Skrobot J.: *Polimery* **2010**, 55, 267.
- [31] Bikram M., Fouletier-Dilling C., Hipp J.A. i in.: *Annals of Biomedical Engineering* **2007**, 35, 796. <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-007-9263-4>
- [32] Bahney C.S., Lujan T.J., Hsu C.W. i in.: *European Cell and Materials Journal* **2011**, 22, 43.
- [33] Schmedlen R.H., Masters K.S., West J.L.: *Biomaterials* **2002**, 23, 4325. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00177-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00177-1)
- [34] Cavalieri F., Miano F., D'Antona P., Paradossi G.: *Biomacromolecules* **2004**, 5, 2439.
- [35] Park H., Choi B., Hu J., Lee M.: *Acta Biomaterialia* **2013**, 9, 4779. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.033>
- [36] Jeon O., Bouhadir K.H., Mansour J.M., Alsberg E.: *Biomaterials* **2009**, 30, 2724. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.034>
- [37] Rouillard A.D., Berglund C.M., Lee J.Y. i in.: *Tissue Engineering Part C: Methods* **2011**, 17, 173. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0582>
- [38] Corrente F., Amara H.M.A., Pacelli S. i in.: *Carbohydrate Polymers* **2013**, 92, 1033. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.018>
- [39] Hu J., Hou Y., Park H. i in.: *Acta Biomaterialia* **2012**, 8, 1730. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.029>
- [40] Burdick J.A., Peterson A.J., Anseth K.S.: *Biomaterials* **2001**, 22, 1779. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00347-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00347-1)

- [41] Elisseeff J., Anseth K., Sims D. i in.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 3104. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.6.3104>
- [42] Elisseeff J., McIntosh W., Anseth K. i in.: *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 51, 164. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200008\)51:2%3C164::AID-JBM4%3E3.3.CO;2-N](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200008)51:2%3C164::AID-JBM4%3E3.3.CO;2-N)
- [43] Lin R.Z., Chen Y.C., Moreno-Luna R. i in.: *Biomaterials* **2013**, 34, 6785. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.060>
- [44] Fouassier J.P., Burr D., Wieder F.: *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1991**, 29, 1319. <http://dx.doi.org/10.1002/pola.1991.080290911>
- [45] Masson F., Decker C., Andre S., Andrieu X.: *Progress in Polymer Science* **2004**, 49, 1.
- [46] Bryant S.J., Nuttelman C.R., Anseth K.S.: *Biomedical Sciences Instrumentation* **1999**, 35, 309.
- [47] Fairbanks B.D., Schwartz M.P., Bowman C.N., Anseth K.S.: *Biomaterials* **2009**, 30, 6702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.055>
- [48] Tseng S.J., Chien C.C., Liao Z.X. i in.: *Soft Matter* **2012**, 8, 1420. <http://dx.doi.org/10.1039/c1sm06682j>
- [49] Stenekes R.J.H., Hennink W.E.: *Polymer* **2000**, 41, 5563. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00814-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00814-9)
- [50] Ifkovits J.L., Tous E., Minakawa M. i in.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 11 507. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1004097107>
- [51] Feng X.D., Guo X.Q., Qiu K.Y.: *Macromolecular Chemistry and Physics* **1988**, 189, 77. <http://dx.doi.org/10.1002/macp.1988.021890108>
- [52] Desai E.S., Tang M.Y., Ross A.E., Gemeinhart R.A.: *Biomedical Materials* **2012**, 7, 1. <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/7/2/024108>
- [53] Shifeng D., Wen Z., Lin Y., Jiandong D.: *Chinese Science Bulletin* **2005**, 50, 1093. <http://dx.doi.org/10.1360/982004-459>
- [54] Leist M., Raab B., Maurer S. i in.: *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 21, 297. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00045-7](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(96)00045-7)
- [55] Knöbel Y., Gleit M., Osswald K., Pool-Zobel B.L.: *Toxicology in Vitro* **2006**, 20, 793. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2005.11.009>
- [56] Sun L., Zhang S., Zhang J. i in.: *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1, 3932. <http://dx.doi.org/10.1039/c3tb20553c>
- [57] Johnson L.M., Fairbanks B.D., Anseth K.S., Bowman C.N.: *Biomacromolecules* **2009**, 10, 3114. <http://dx.doi.org/10.1021/bm900846m>
- [58] Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B.: *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, 2004. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11%3C2004::AID-ANIE2004%3E3.3.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11%3C2004::AID-ANIE2004%3E3.3.CO;2-X)
- [59] Crescenzi V., Cornelio L., Di Meo C. i in.: *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1844. <http://dx.doi.org/10.1021/bm0700800>
- [60] Ossipov D.A., Hilborn J.: *Macromolecules* **2006**, 39, 1709. <http://dx.doi.org/10.1021/ma052545p>
- [61] Malkoch M., Vestberg R., Gupta N. i in.: *Chemical Communications* **2006**, 2774. <http://dx.doi.org/10.1039/b603438a>
- [62] Liu S.Q., Ee P.L.R., Ke C.Y. i in.: *Biomaterials* **2009**, 30, 1453. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.023>
- [63] Clark M., Kiser P.: *Polymer International* **2009**, 58, 1190. <http://dx.doi.org/10.1002/pi.2650>
- [64] Narayan S., Muldoon J., Finn M.G. i in.: *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 117, 3339. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200462883>
- [65] Nimmo C.M., Shawn C.O., Shoichet M.S.: *Biomacromolecules* **2011**, 12, 824. <http://dx.doi.org/10.1021/bm101446k>
- [66] Lutolf M.P., Hubbell J.A.: *Biomacromolecules* **2003**, 4, 713. <http://dx.doi.org/10.1021/bm025744e>
- [67] Lutolf M.P., Raeber G.P., Zisch A.H. i in.: *Advanced Materials* **2003**, 15, 888. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200304621>
- [68] Jin R., Moreira Teixeira L.S., Krouwels A. i in.: *Acta Biomaterialia* **2010**, 6, 1968. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.024>
- [69] Yang J.A., Kim H., Park K., Hahn S.K.: *Soft Matter* **2011**, 7, 868. <http://dx.doi.org/10.1039/c0sm01011a>
- [70] Yu Y., Deng C., Meng F. i in.: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2011**, 99A, 316. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.33199>
- [71] Hiemstra C., van der Aa L.J., Zhong Z.Y. i in.: *Macromolecules* **2007**, 40, 1165. <http://dx.doi.org/10.1021/ma062468d>
- [72] Pan J., Guo C., Fei T. i in.: *Advancements in Genetic Engineering* **2013**, 2, 1.
- [73] Tan H., Hu X.: *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, 126, E180. <http://dx.doi.org/10.1002/app.36737>
- [74] Maia J., Ferreira L., Garvalho R.: *Polymer* **2005**, 46, 9604. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2005.07.089>
- [75] Balakrishnan B., Joshi N., Banerjee R.: *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1, 5564. <http://dx.doi.org/10.1039/c3tb21056a>
- [76] Tan H., Chu C.R., Payne K.A., Marra K.G.: *Biomaterials* **2009**, 30, 2499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.080>
- [77] Kurisawa M., Chung J.E., Yang Y.Y. i in.: *Chemical Communications* **2005**, 4312. <http://dx.doi.org/10.1039/b506989k>
- [78] Jin R., Hiemstra C., Zhong Z., Feijen J.: *Biomaterials* **2007**, 28, 2791. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.02.032>
- [79] Park K.M., Shin Y.M., Joung Y.K. i in.: *Biomacromolecules* **2010**, 11, 706. <http://dx.doi.org/10.1021/bm9012875>
- [80] Asada S., Fukuda K., Hamanishi C., Tanaka S.: *Inflammation Research* **1999**, 48, 399. <http://dx.doi.org/10.1007/s000110050478>
- [81] Sperinde J.J., Griffith L.G.: *Macromolecules* **1997**, 30, 5255. <http://dx.doi.org/10.1021/ma970345a>
- [82] Hu B.H., Messersmith B.: *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 14 298. <http://dx.doi.org/10.1021/ja038593b>
- [83] Yokoyama K., Nio N., Kikuchi Y.: *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, 64, 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1539-5>
- [84] Chen T., Small D.A., McDermott M.K. i in.: *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1558. <http://dx.doi.org/10.1021/bm034145k>

- [85] Ruel-Gariépy E., Leroux J.C.: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58, 409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.019>
- [86] Schild H.G.: *Progress in Polymer Science* **1992**, 17, 163. [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700\(92\)90023-R](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R)
- [87] Utrata-Wesołek A., Trzebicka B., Dworak A.: *Polimery* **2008**, 53, 717.
- [88] Bae Y.H., Vernon B., Han C.K., Kim S.W.: *Journal of Controlled Release* **1998**, 53, 249. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00258-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00258-7)
- [89] Na K., Park J.H., Kim S.W. i in.: *Biomaterials* **2006**, 27, 5951. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.012>
- [90] Park K.H., Na K.: *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2008**, 106, 74. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.106.74>
- [91] Nam I., Bae J.W., Jee K.S. i in.: *Macromolecular Research* **2002**, 10, 115. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03218300>
- [92] Pollock J.F., Healy K.E.: *Acta Biomaterialia* **2010**, 6, 1307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.027>
- [93] Gutowska A., Jeong B., Jasionowski M.: *Anatomical Record* **2001**, 263, 342. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1115>
- [94] Bonacucina G., Cespi M., Mencarelli G. i in.: *Polymers* **2011**, 3, 779. <http://dx.doi.org/10.3390/polym3020779>
- [95] Park K.M., Lee S.Y., Joung Y.K. i in.: *Acta Biomaterialia* **2009**, 5, 1956. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.040>
- [96] Kim D.H., Heo S.J., Shin J.W. i in.: *Macromolecular Research* **2010**, 18, 387. <http://dx.doi.org/10.1007/s13233-010-0405-4>
- [97] Qiao M., Chen D., Ma X., Liu Y.: *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 294, 103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ij-pharm.2005.01.017>
- [98] Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W.: *Journal of Controlled Release* **2000**, 63, 155. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00194-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00194-7)
- [99] Mothé C., Drumond W., Wang S.: *Thermochimica Acta* **2006**, 445, 61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2006.01.001>
- [100] Dadras P., Dinarvand R., Khezri S.M.: *Global Journal of Researches in Engineering: J. General Engineering* **2011**, 11, 23.
- [101] Ma G., Miao B., Song C.: *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, 116, 1985.
- [102] Payyappilly S., Dhara S., Chattopadhyay S.: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014**, 102 A, 1500. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.34800>
- [103] Zhang Z., Ni J., Chen L. i in.: *Biomaterials* **2011**, 32, 4725. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.046>
- [104] *US Pat.* 6 201 072 (2001).
- [105] Solanki H.K., Thakkar J.H., Jani G.K.: *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2010**, 4, 168.
- [106] Chenite A., Chaput C., Wang D. i in.: *Biomaterials* **2000**, 21, 2155. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00116-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00116-2)
- [107] Ruel-Gariépy E., Chenite A., Chaput C. i in.: *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 203, 89. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00428-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00428-2)
- [108] Chenite A., Buschmann M., Wang D. i in.: *Carbohydrate Polymers* **2001**, 46, 39. [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00281-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00281-2)
- [109] Ruel-Garépy E., Shive M., Bichara A. i in.: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 57, 53. [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00095-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00095-X)
- [110] Berrada M., Serreqi A., Dabbarh F. i in.: *Biomaterials* **2005**, 26, 2115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.013>
- [111] Tsuji H.: *Macromolecular Bioscience* **2005**, 5, 569. <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.200500062>
- [112] De Jong S.J., De Smedt S.C., Wahls M.W.C. i in.: *Macromolecules* **2000**, 33, 3680. <http://dx.doi.org/10.1021/ma992067g>
- [113] Li S., El Ghzaoui A., Dewinck E.: *Macromolecular Symposia* **2005**, 222, 23. <http://dx.doi.org/10.1002/masy.200550403>
- [114] Jun Y.J., Park K.M., Joung Y.K. i in.: *Macromolecular Research* **2008**, 16, 704. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03218584>
- [115] Nagahama K., Fujiura K., Enami S. i in.: *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, 46, 6317. <http://dx.doi.org/10.1002/pola.22943>
- [116] Chung H.J., Lee Y., Park T.G.: *Journal of Controlled Release* **2008**, 127, 22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.008>
- [117] van Tomme S.R., Mens A., van Nostrum C.F., Hennink W.E.: *Biomacromolecules* **2008**, 9, 158. <http://dx.doi.org/10.1021/bm700931q>
- [118] Lim D.W., Choi S.H., Park T.G.: *Macromolecular Rapid Communications* **2000**, 21, 464. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3927\(20000501\)21:8%3C464::AID-MARC464%3E3.0.CO;2-%23](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-3927(20000501)21:8%3C464::AID-MARC464%3E3.0.CO;2-%23)
- [119] van Nostrum C.F., Veldhuis T.F., Bos G.W., Hennink W.E.: *Macromolecules* **2004**, 37, 2113. <http://dx.doi.org/10.1021/ma035534>
- [120] Chung H.J., Park T.G.: *Nano Today* **2009**, 4, 429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2009.08.008>
- [121] Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A. i in.: *FEBS Letters* **1973**, 32, 195. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7)
- [122] George M., Abraham T.E.: *Journal of Controlled Release* **2006**, 114, 1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>
- [123] Kashima K., Imai M.: „Advancing Desalination” (red. Ning R.Y.), InTech 2012. <http://dx.doi.org/10.5772/50734>
- [124] Bidarra S., Barrias C.C., Granja P.L.: *Acta Biomaterialia* **2014**, 10, 1646. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.006>
- [125] Van Tomme S.R., Van Steenbergen M.J., De Smedt S.C. i in.: *Biomaterials* **2005**, 26, 2129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.035>
- [126] Guvendiren M., Lu H.D., Burdick J.A.: *Soft Matter* **2012**, 8, 260. <http://dx.doi.org/10.1039/c1sm06513k>