



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Petra Utroša

POROZNI POLIMERI, PRIPRAVLJENI S POLIMERIZACIJO Z ODPIRANJEM OBROČA V EMULZIJAH

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2021



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Porozni polimeri, pripravljene s polimerizacijo z odpiranjem obroča v emulzijah

Doktorska disertacija

Študentka: Petra Utroša

Študijski program: doktorski študijski program III. stopnje Kemija in
kemijska tehnika

Študijska smer: Kemija

Predvideni znanstveni naslov: doktorica znanosti

Mentor: dr. David Pahovnik

Komentor: doc. dr. Sebastijan Kovačič

Ljubljana, 2021

Kazalo

Kazalo.....	I
Zahvala.....	III
Povzetek.....	IV
Abstract.....	VI
Seznam tabel	VIII
Seznam slik.....	IX
Uporabljeni simboli in kratice.....	XIV
1 Uvod	1
1.1 Opredelitev problema.....	1
1.2 Doktorska teza, namen in cilji	2
2 Teoretični del.....	4
2.1 Polimerizacija z odpiranjem obroča (ROP)	4
2.2 Poliestri	6
2.2.1 Mehanizmi ROP laktonov	7
2.3 Sintetični polipeptidi	11
2.3.1 Sinteza <i>N</i> -karboksianhidridov (NCA)	12
2.3.2 Mehanizmi ROP NCA	15
2.4 Zamreženi poliestri in polipeptidi	22
2.4.1 Oblikovni spomin	26
2.5 Porozni polimeri na osnovi poliestrov in polipeptidov	28
2.5.1 Polimerizirana emulzija z visokim deležem notranje faze (poliHIPE).....	32
3 Eksperimentalni del.....	36
3.1 Materiali.....	36
3.2 Metode karakterizacije	38
3.2.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	38
3.2.2 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR).....	38
3.2.3 Ramanska spektroskopija	38
3.2.4 MALDI-TOF masna spektrometrija	38
3.2.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	38
3.2.6 Vrstična elektronska mikroskopija (SEM).....	38
3.2.7 Mehanska analiza	39
3.2.8 Test toksičnosti	39
3.2.9 Konfokalna mikroskopija	39
3.2.10 Rast celic	40
3.2.11 Optična mikroskopija	40
3.3 Sinteze.....	41
3.3.1 Modifikacija surfaktanta	41
3.3.2 Sinteza monomerov.....	41
3.3.3 Sinteza PCL poliHIPE-ov	46
3.3.4 Hidrolitska razgradnja PCL poliHIPE-ov	46
3.3.5 Linearni polipeptidi	47
3.3.6 Spremljanje kinetike ROP NCA	47
3.3.7 Sinteza polipeptidnih DMF/PB poliHIPE-ov	47
3.3.8 Sinteza polipeptidnih DMSO/PB poliHIPE-ov	47

3.3.9	Odščita polipeptidnih poliHIPE-ov	47
3.3.10	Gvanidizacija polipeptidnih poliHIPE-ov	48
4	Rezultati in razprava	49
4.1	PoliHIPE na osnovi PCL	49
4.1.1	Metilacija surfaktanta	49
4.1.2	Sinteza BOD.....	52
4.1.3	Priprava PCL poliHIPE-ov.....	53
4.1.4	Karakterizacija PCL poliHIPE-ov.....	56
4.2	Polipeptidni poliHIPE-i na osnovi PBLG	65
4.2.1	Sinteza NCA-monomerov.....	65
4.2.2	Priprava PBLG poliHIPE-a	68
4.2.3	Karakterizacija PBLG poliHIPE-ov	74
4.2.4	Celični testi na PBLG poliHIPE-u.....	78
4.3	Polipeptidni poliHIPE-i na osnovi drugih NCA	81
4.3.1	PoliHIPE na osnovi PZLL	81
4.3.2	PoliHIPE na osnovi motiva RGD	86
5	Zaključek	97
6	Literatura	99
	Izjava doktorskega kandidata	112
	Bibliografija kandidata	113

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so prispevali k nastanku moje doktorske disertacije.

Jasmini Turnšek za pomoč pri merjenju NMR-spektrov. Poloni Prosen za pomoč pri DSC-meritvah. Özgünu Can Önderju za pomoč pri SEM. Simonu Casermanu in Marjetki Podobnik za pomoč pri celičnih testih. Jožetu Grdadolniku za pomoč pri IR-spektroskopiji. Magdi Tušek Žnidarič za pomoč pri optični mikroskopiji.

Hvala dr. Emi Žagar za strokovno pomoč.

Hvala komentorju doc. dr. Sebastijanu Kovačiču za nasvete.

Ne nazadnje pa se zahvaljujem mentorju dr. Davidu Pahovniku za vodenje in vso prejeto znanje.

Povzetek

V okviru doktorske disertacije smo s polimerizacijo z odpiranjem obroča (ROP) v zvezni fazi emulzij z visokim deležem interne faze (HIPE) polimerizirali heterociklične monomere. Prednost ROP neposredno v HIPE-u je v tem, da lahko pripravimo popolnoma razgradljiva poliHIPE-ogrodja specifične morfologije na osnovi poliestrov in sintetičnih polipeptidov. Za uspešno izvedbo ROP v HIPE-u smo pripravili brezvodne emulzije in uporabili organske katalizatorje, ki omogočajo izvedbo ROP pri relativno nizkih temperaturah in primerni hitrosti polimerizacije. Hitrost ROP v HIPE-u se je izkazala kot izredno pomemben parameter, saj mora zvezna faza emulzije želirati v času stabilne emulzije, obenem pa mora biti viskoznost emulzije primerna za zadovoljivo mešanje in prenos v primerne modele.

V prvem delu doktorskega dela predstavljamo poliHIPE na osnovi semikristaliničnega poliestra, poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL). S stopnjo zamreženosti smo vplivali na termomehanske lastnosti PCL poliHIPE-materiala, ki izkazuje oblikovni spomin. Oblikovni spomin smo raziskali s termomehanskimi cikličnimi testi in pokazali, da ga odlikujeta odlična fiksacija začasne oblike pri nizki temperaturi in odlična povrnitev v prvotno obliko med segrevanjem nad temperaturo tališča. Manj zamrežen poliHIPE ima višji temperaturi taljenja in kristalizacije in ga lahko fiksiramo že pri sobni temperaturi.

Metodo ROP v HIPE-u smo razširili na različne vrste *N*-karboksianhidridov (NCA) α -aminokislin ter kot prvi pripravili poliHIPE-materiale iz sintetičnih polipeptidov. Hitrost polimerizacije se je izkazala kot izredno pomemben parameter za uspešno pripravo poliHIPE sintetičnih polipeptidov, saj mora omogočati nadzorovano izhajanje plinastega ogljikovega dioksida, ki se sprošča med ROP NCA. Sintezni postopek, ki smo ga razvili, omogoča sintezo poliHIPE-ogrodij na osnovi polipeptidov različne kemijske sestave, pri čemer je zaradi razlik v reaktivnosti NCA-monomerov za vsak sistem reaktantov potrebno prilagoditi eksperimentalne pogoje sinteze, kot so koncentracija monomerov, količina katalizatorja, količina surfaktanta, vrsta zamreževalca in topila. Vzpostavili smo relacije med sintezo, strukturo in lastnostmi sintetiziranih poliHIPE-ov ter postavili temelje za načrtovanje in pripravo različno funkcionaliziranih polipeptidnih poliHIPE-materialov. Pokazali smo, da lahko z deležem interne faze in količino surfaktanta prilagajamo morfologijo poliHIPE, ki igra pomembno vlogo pri uporabi materiala v namen gojenja celic. Na izbranem polipeptidnem poliHIPE-u smo potrdili, da material ni toksičen za celice ter da omogoča njihovo rast in proliferacijo. V nadaljevanju smo pokazali, da je razvita metoda primerna za pripravo poliHIPE-polimerov na osnovi različnih polipeptidov, kot tudi kopolipeptidov. Pokazali smo tudi, da lahko z odščito zaščitenih stranskih skupin polipeptidov pripravimo poliHIPE-hidrogele, ki omogočajo nadaljnje popolimerizacijske modifikacije. Opisan pristop k pripravi polipeptidnih poliHIPE-ov obeta načrtovanje in pripravo makroporoznih ogrodij na osnovi sintetičnih polipeptidov različne kemijske sestave, katerih funkcionalnost lahko enostavno prilagajamo z izborom NCA-monomerov.

Ključne besede: polimerizacija z odpiranjem obroča (ROP), emulzije z visokim deležem interne faze (HIPE), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), oblikovni spomin, sintetični polipeptidi, tkivno inženirstvo

UDK: 66.095.26:57086.83(043.3)

Abstract

In this doctoral thesis, ring-opening polymerization (ROP) of heterocyclic monomers in a continuous phase of high internal phase emulsions (HIPEs) was performed. ROP directly in HIPE enables the preparation of fully degradable polyester and synthetic polypeptide polyHIPEs with specific porous morphology. For the successful implementation of ROP in HIPE, anhydrous HIPEs were prepared and organic catalysts were used to enable ROP at relatively low temperatures and suitable polymerization rate. It has been shown that the rate of ROP in HIPEs is an extremely important parameter, as the continuous phase of the emulsion must gel within the time-frame of emulsion stability, while at the same time the HIPE viscosity must be suitable for adequate stirring and transfer of emulsions into the molds.

In the first part of the work, polyHIPEs based on a semi-crystalline polyester, poly(ϵ -caprolactone) (PCL), are presented. The thermomechanical properties of the prepared PCL polyHIPEs were investigated and found to be strongly dependent on the degree of PCL crosslinking. PCL polyHIPEs exhibit shape memory behavior with excellent fixation of the temporary shape at low temperatures and excellent recovery of the original shape when heated above the melting temperature, as demonstrated by cyclic thermomechanical tests. Less crosslinked polyHIPE shows higher melting and crystallization temperatures and as a result, its temporary shape can be fixed even at room temperature.

The synthetic method was further extended to the polymerization of various types of α -amino acid *N*-carboxyanhydrides (NCAs) to prepare synthetic polypeptide polyHIPEs not previously reported. The polymerization rate has been shown to be an extremely important parameter for the successful preparation of polypeptide polyHIPEs, as it determines the rate of carbon dioxide release from HIPE during the ROP of NCA monomers. The synthetic process we developed allows the synthesis of polypeptide polyHIPE scaffolds with different chemical compositions. However, due to the different reactivity of NCA monomers, it is necessary to adjust the experimental conditions such as monomer concentration, catalyst amount, surfactant amount, type of crosslinker and type of solvent. Moreover, we have established relationships between the synthesis, structure and properties of the synthesized polyHIPE scaffolds and laid the foundation for the design and preparation of differently functionalized polypeptide polyHIPE scaffolds. We have shown that the morphology of the polyHIPEs, which plays an important role in the use of the material for cell culture, can be adjusted by the proportion of the internal phase in HIPE and the amount of surfactant. In the case of selected polypeptide polyHIPE, we have confirmed that the material is nontoxic to cells and that it allows good viability, migration and proliferation of cells throughout the polypeptide polyHIPE scaffold. Furthermore, the disclosed synthetic procedure is applicable for the preparation of polyHIPEs based on various polypeptides as well as copolypeptides. In addition, we have shown that we can prepare polyHIPE hydrogels by deprotecting the protected side groups of polypeptides. The unprotected functional groups allow further postpolymerization modifications of the polyHIPEs. The described approach to the preparation of polypeptide polyHIPEs promises the design and preparation of macroporous polypeptide scaffolds with different chemical compositions, whose functionality can be tuned simply by selecting the types of NCA monomers.

Key words: ring-opening polymerization (ROP), high internal phase emulsion (HIPE), poly(ϵ -caprolactone) (PCL), shape memory, synthetic polypeptides, tissue engineering

UDK: 66.095.26:57086.83(043.3)

Seznam tabel

Tabela 4-1: Stabilnost PCL HIPE-ov (75 vol. % interne faze, 16 mas. % surfaktanta, 5 mol % zamreževalca) med polimerizacijo pri različnih količinah uporabljenega katalizatorja ($x(\text{DPP})$) v odvisnosti od temperature (T).	54
Tabela 4-2: Najnižji masni delež surfaktanta ($w(\text{surf.})$) v kontinuirni fazi za stabilizacijo PCL HIPE-ov z različnimi deleži interne faze ($x(\text{PB})$). HIPE-i so polimerizirani s 3 mol % DPP na temperaturi 50 °C ter označeni kot stabilni, če po 16 h polimerizacije ni vidne fazne separacije.	55
Tabela 4-3: Delež gela, gostota (ρ) in izračunana poroznost (Φ) vzorcev PCL poliHIPE.	57
Tabela 4-4: Termične lastnosti poliHIPE-ov PCL-5,0 in PCL-7,5: stopnja kristaliničnosti (χ_c), temperatura taljenja (T_m) in temperatura kristalizacije (T_c), določene z DSC.	58
Tabela 4-5: Faktor fiksiranja (R_f) in faktor povrnitve (R_r) zaporednih ciklov poliHIPE-ov pri različnih temperaturah fiksiranja (T_f) in povrnitve (T_r).	63
Tabela 4-6: Eksperimentalni parametri poliHIPE na osnovi PBLG, zamreženega s 5 mol % cistina, pri čemer smo spreminjali volumski delež interne faze ($x(\text{PB})$), koncentracijo NCA ($c(\text{NCA})$), masni delež surfaktanta ($w(\text{surf.})$) in molski delež katalizatorja ($x(\text{kat.})$), ter pripadajoče teoretične poroznosti ($\Phi(\text{teor.})$).	72
Tabela 4-7: Gostota (ρ), poroznost (Φ) in povprečna velikost por ($d(\text{povp.})$) poliHIPE-ov na osnovi PBLG, zamreženega s 5 mol % cistina.	76
Tabela 4-8: Volumen (V), masa (m) in Youngov modul (E) suhega in v PBS namočenega poliHIPE-a PBLG _{2,0} 80-3.	77

Seznam slik

Slika 2-1: Primeri heterocikličnih monomerov in pripadajočih polimernih struktur, ki nastanejo po mehanizmu ROP.	4
Slika 2-2: Shematski prikaz poteka polimerizacije v primeru kontrolirane in nekontrolirane ROP.	5
Slika 2-3: Inicijacija in propagacija ROP po anionskem (A) in kationskem mehanizmu (B). ³⁰ ...	6
Slika 2-4: Načini sinteze poliestrov: esterifikacija diola in dikarboksilne kisline (A), esterifikacija hidroksikisline (B) in ROP laktonov (C).	6
Slika 2-5. Primer alifatskih poliestrov, pripravljenih z ROP laktonov.	7
Slika 2-6: Anionski mehanizem ROP laktonov z napadom iniciatorja na ogljikov atom karbonylne skupine (A) ali na alkilni ogljikov atom ob kisiku (B). ³⁵	7
Slika 2-7: Stranski reakciji pri ROP laktonov: intermolekularna transesterifikacija (A) in intramolekularna transesterifikacija (B). ³⁵	8
Slika 2-8: Mehanizem aktivacije alkoholnega iniciatorja oz. aktivnega konca verige za ROP laktonov s fosfazenom. ³³	9
Slika 2-9: Mehanizem ROP laktona z alkilirajočim sredstvom. ³⁵	9
Slika 2-10: Mehanizem ROP laktona, aktiviranega z DPP in iniciiranega z alkoholom. ³⁷	10
Slika 2-11: Mehanizem ROP laktona, aktiviranega s tiosečnino in aminom ter iniciiranega z alkoholom. ³³	10
Slika 2-12: Mehanizem ROP laktona, kataliziranega s kovinskim alkoksidom, ki nastane iz kovinskega karboksilata in alkohola. ³²	11
Slika 2-13: Primeri α -aminokislin.	12
Slika 2-14: Ciklizacija α -aminokislin v NCA-monomere po Leuchsovi in Fuchs-Farthing metodi. ¹²	13
Slika 2-15: Shema sinteze NCA-monomerov z uporabo difenil karbonata. ^{46,47}	13
Slika 2-16: Stranske reakcije NCA-monomerov v prisotnosti nečistoč: hidroliza NCA-monomera (A) ⁴⁹ ter nastanek <i>N</i> -kloroformil aminokislinskega klorida in α -izocianato kislinskega klorida (B). ⁴³	14
Slika 2-17: Shematski prikaz zaščite stranske skupine α -aminokisline, sinteze NCA-monomera, sinteze in odščite polipeptida ter popolimerizacijske modifikacije polipeptida.	15
Slika 2-18: Reaktivna mesta <i>N</i> -nesubstituiranih (A) in <i>N</i> -substituiranih NCA-monomerov (B).	15
Slika 2-19: NAM-mehanizem ROP NCA: inicijacija (A) in propagacija (B).	16
Slika 2-20: Inicijacija ROP NCA z alkoholom kot nukleofilom, katalizirana s tvorbo vodikovih vezi tiosečninskega organokatalizatorja (A) ⁵⁹ in z uporabo kislinskega katalizatorja (B). ⁶¹ ...	17
Slika 2-21: Mehanizem ROP NCA-monomerov z aktiviranim monomerom: predinicijacija (A), inicijacija (B) in propagacija (C).	18
Slika 2-22: Inicijacija ROP NCA z uporabo soli primarnih aminov. ⁶³	19
Slika 2-23: Shematski prikaz ROP NCA po AAMMA s primarnim in sekundarnim aminom. ²⁷	19

Slika 2-24: Mehanizem ROP NCA z uporabo silazanov. ⁶⁹	20
Slika 2-25: ROP NCA z uporabo <i>N</i> -heterocikličnih karbenov. Mehanizem z deprotonacijo <i>N</i> -substituiranega NCA na mestu C-4 (A) ⁷² in mehanizem z nukleofilnim napadom in odprtjem obroča <i>N</i> -substituiranega NCA (B). ⁷³	21
Slika 2-26: Mehanizem ROP NCA z uporabo kovin prehoda. ⁴¹	22
Slika 2-27: Shematski prikaz različnih pristopov zamreževanja polimerov: kopolimerizacija z dvofunkcionalnim zamreževalcem (A), popolimerizacijsko zamreževanje funkcionaliziranega polimera (B), popolimerizacijsko zamreževanje preko različno funkcionaliziranih polimerov (C), uporaba makromonomera in nizkomolekularnega zamreževalca (D).	22
Slika 2-28: Dvofunkcionalni laktonski zamreževalci za poliestre (A) in dvofunkcionalni NCA-monomeri kot zamreževalci za polipeptide (B).	24
Slika 2-29: Primer popolimerizacijskega zamreževanja polipeptida s tiol-en klik reakcijo. ^{89,90}	25
Slika 2-30: Primer neposrednega popolimerizacijskega zamreževanja polipeptidnih verig. ⁹⁴	25
Slika 2-31: Primer zamreževanja makromonomera. ²⁸	26
Slika 2-32: Potek enega cikla oblikovnega spomina. Semi-kristalinični polimer (A) segrejemo nad temperaturo tališča in stalimo kristalinične domene (B). Nato ga stisnemo (C) in ohladimo, da kristalizira (Č). Silo odstranimo, pri čemer polimer obdrži začasno obliko. Ko material segrejemo, se povrne v prvotno obliko (D).	27
Slika 2-33: Strukturne značilnosti poroznega materiala. ²	28
Slika 2-34: Prikaz izvora statističnega korekcijskega faktorja, ki upošteva, da namesto dejanskega polmera (<i>R</i>) opazujemo polmer (<i>r</i>) na naključni globini pore (<i>h</i>).	29
Slika 2-35: Primer poroznih materialov na osnovi PCL, pripravljenega s tridimenzionalnim tiskanjem ¹²³ (A) in s predenjem iz raztopine ¹³ (B).	30
Slika 2-36: Primer poroznega hidrogela na osnovi nekovalentno zamreženega PLGA in hitosana ¹³² (A) in kovalentno zamreženega PLGA (B). ⁹³	31
Slika 2-37: Primer poroznega kriogela na osnovi kovalentno zamreženega PLGA-ko-poli(L-lizina) ²¹ (A) in poroznega PBLG, pripravljenega z negativnim templatom na osnovi trsa (B). ¹³⁴	32
Slika 2-38: Stabilizacija emulzije s surfaktantom (A) in trdnimi delci (B).	33
Slika 2-39: Prikaz nastanka poliHIPE-a.	34
Slika 4-1: Shematski povzetek raziskovalnega dela.	49
Slika 4-2: MALDI-TOF masni spektri izhodnega PEG-polimera (A), reakcijske zmesi po 4 h (2,0 ekvivalenta CH ₃ I) (B) in reakcijske zmesi po 48 h (3,0 ekvivalenti CH ₃ I).	50
Slika 4-3: FTIR-spekter (A) in ¹ H NMR-spekter (B) surfaktanta pred metilacijo in po njej.	51
Slika 4-4: ¹ H NMR-spektra [1,1'-bi(cikloheksan)]-4,4'-diona (A) in zamreževalca BOD-a (B).	52
Slika 4-5: Shematski prikaz ROP CL-monomera in BOD-zamreževalca, kjer etilen glikol deluje kot iniciator in DPP kot organokatalizator. Reaktanti in modificiran surfaktant so raztopljeni v CL, ki predstavlja zvezno fazo HIPE-a, medtem ko PB predstavlja interno fazo.	53
Slika 4-6: ¹ H NMR-spekter CDCl ₃ ekstrakta neočiščenega PCL HIPE-a s 3 mol % DPP po 16 h polimerizacije na temperaturi 50 °C ter povečan spekter s primerjavo spektra CL.	54

Slika 4-7: ^1H NMR-spekter CDCl_3 ekstrakta čiščenega in osušenega PCL poliHIPE-a.	56
Slika 4-8: SEM-mikrografa vzorcev poliHIPE PCL-5,0 (A) in PCL-7,5 (B).....	57
Slika 4-9: DSC-termograma poliHIPE-ov PCL-5,0 (A) in PCL-7,5 (B). Prikazano je prvo ohlajanje (s hitrostjo $-2\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) in drugo segrevanje ($10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) ter talilna entalpija (ΔH_m).	58
Slika 4-10: SEM-mikrograf poliHIPE-a PCL-5,0 po 8 dneh razgradnje v 0,1 M NaOH.	59
Slika 4-11: Krivulje napetost-deformacija (σ vs. ϵ) poliHIPE-ov PCL-5,0 in PCL-7,5 pri različnih temperaturah (A). Youngovi moduli (E), določeni iz naklona začetnega linearnega dela krivulj napetost-deformacija (B).	60
Slika 4-12: SEM-mikrografi poliHIPE-a PCL-5,0 v začasni obliki, pri čemer je vzorec stisnjen na 50 % začetne višine in fiksiran pri $20\text{ }^\circ\text{C}$ (A), povrnjena oblika PCL-5,0 po segrevanju na $60\text{ }^\circ\text{C}$ (B), ter povrnjena oblika PCL-7,5, ki je bil pred tem stisnjen na 50 % začetne višine in nato segret na $40\text{ }^\circ\text{C}$ (C).	60
Slika 4-13: Napetost (σ), deformacija (ϵ), temperatura (T), faktor fiksacije (R_f) in celokupni faktor povrnitve (R_r) pri cikličnih oblikovnega spomina poliHIPE-a PCL-5,0, kjer smo silo (F) v vsakem ciklu povečali od 0,1 N (kar ustreza napetosti 1,8 kPa) do 0,9 N (kar ustreza napetosti 16,6 kPa).	61
Slika 4-14: Napetost (σ), deformacija (ϵ) in temperatura (T) med zaporednimi cikličnimi oblikovnega spomina poliHIPE PCL-5,0 (A) in PCL-7,5 (B). Puščica predstavlja začetek in smer procesa.....	62
Slika 4-15: Odvod deformacije po temperaturi ($d\epsilon/dT$) za prvi cikel oblikovnega spomina. Maksimuma krivulj predstavlja temperaturi prehoda iz začasne v prvotno obliko.	64
Slika 4-16: Deformacija (ϵ) PCL poliHIPE-ov med ohlajanjem in segrevanjem pod konstanto obremenitvijo. Puščica označuje začetek in smer procesa.	64
Slika 4-17: ^1H in ^{13}C NMR-spektra BLG NCA.	66
Slika 4-18: ^1H - ^{13}C HSQC (A) in HMBC (B) NMR-spektra produktov stranske reakcije razpada Cys NCA.	67
Slika 4-19: ^1H in ^{13}C NMR-spektra Cys NCA-zamreževalca.	68
Slika 4-20: Grafični prikaz in fotografije vzorcev: fazno separiran poliHIPE kot posledica prenizke koncentracije katalizatorja (A), poliHIPE z optimalno morfologijo (B), spenjen poliHIPE zaradi previsoke koncentracije katalizatorja ali predolgega mešanja po dodatku katalizatorja (C). Razlika med spenjenim in nespenjenim vzorcem po čiščenju je vidna v obliki vzorca in na SEM-posnetku.	70
Slika 4-21: Zaželiran poliHIPE na osnovi linearnega PBLG.	70
Slika 4-22: ROP BLG NCA in Cys NCA v kontinuirni fazi HIPE.	71
Slika 4-23: ^1H NMR-spekter PBLG poliHIPE-a po 24 h polimerizacije ter povečava s primerjavo spektra BLG NCA-monomera.	73
Slika 4-24: ^1H NMR-spekter ekstrakta očiščenega PBLG poliHIPE-a.....	73
Slika 4-25: Ramanska spektra linearnega PBLG in PBLG poliHIPE-a ter povečava diferencialnega ramanskega spektra.....	74
Slika 4-26: Primerjava FTIR-spektrov linearnega PBLG in PBLG poliHIPE-a ter povečava območja, ki prikazuje amidni I trak.....	75

Slika 4-27: SEM-mikrografi PBLG _{2,0} 75-5 (A), PBLG _{2,0} 75-2 (B), PBLG _{2,5} 75-2 (C), PBLG _{2,0} 80-10 (Č), PBLG _{2,0} 80-3 (D), PBLG _{2,5} 80-3 (E), PBLG _{2,0} 85-5 (F), PBLG _{2,0} 85-3 (G) in PBLG _{2,5} 85-3 (H).	75
Slika 4-28: DSC-termogram vzorca poliHIPE PBLG _{2,0} 80-3. Krivulja prikazuje drugo segrevanje (20 °C min ⁻¹), iz katere smo odčitali temperaturo steklastega prehoda (T_g).....	76
Slika 4-29: Fotografiji vzorca poliHIPE-a PBLG _{2,0} 80-3 v suhem stanju (A) in namočenega v PBS (B).	77
Slika 4-30: Krivulja napetost-deformacija (σ vs. ϵ) za poliHIPE PBLG _{2,0} 80-3, merjen pri 37 °C. Podana sta Youngova modula, določena iz naklona začetnega linearnega dela krivulje.....	77
Slika 4-31: Viabilnost celic L929, izpostavljenih mediju, v katerem je bil 24 h inkubiran PBLG poliHIPE, in primerjava s kontrolo (medij, inkubiran v odsotnosti poliHIPE-monolita).	78
Slika 4-32: Relativni fluorescenčni signal poliHIPE-diska PBLG _{2,0} 80-3 po dveh, štirih in šestih dneh po inkubaciji s celično linijo mišjih fibrosarkom L929 oz. brez nje (kontrola).	79
Slika 4-33: Posnetki konfokalne mikroskopije poliHIPE-a PBLG _{2,0} 80-3 s posejanimi L929 celicami po 2 dneh (A, B), 4 dneh (C, D) in 7 dneh (E, F) po inkubaciji.	79
Slika 4-34: Posnetka optične mikroskopije poliHIPE-a PBLG _{2,0} 80-3 s posejanimi celicami L929, prerezanega vzporedno (~5 μ m pod površino) (A) in prečno glede na površino (puščice kažejo zgornjo plast) (B).	80
Slika 4-35: ¹ H in ¹³ C NMR-spektra ZLL NCA.	82
Slika 4-36: PoliHIPE na osnovi linearnega PZLL, ki ne zaželira in se fazno loči.	83
Slika 4-37: ¹ H NMR-spektra reakcijskih zmesi ZLL NCA (A) in BLG NCA (B), polimeriziranih z 0,5 mol % DIPEA po reakcijskem času 5 min.	83
Slika 4-38: Ramanska spektra PZLL poliHIPE-a in linearnega PZLL (A) s povečavo diferencialnega ramanskega spektra (B) ter FTIR-spekter PZLL poliHIPE-a in linearnega PZLL s povečavo območja amidnega I traku (C).	84
Slika 4-39: SEM-mikrograf poliHIPE-a PZLL.	85
Slika 4-40: SEM-mikrograf poliHIPE-a na osnovi PBLG-ko-PZLL.	85
Slika 4-41: Sinteza poliRGD z ROP ustreznih NCA-monomerov, odščito zaščitenih funkcionalnih skupin in popolimerizacijsko modifikacijo.	86
Slika 4-42: ¹ H NMR-spekter BLA NCA.	87
Slika 4-43: ¹ H in ¹³ C NMR-spektra ZLO NCA.	88
Slika 4-44: ¹ H NMR-spekter Gly NCA.	89
Slika 4-45: SEM-mikrograf poliHIPE-a PBLA.	89
Slika 4-46: SEM-mikrograf poliHIPE-a PBLG-ko-PGly.	90
Slika 4-47: SEM-mikrograf poliHIPE-a PBLA _{DMSO}	91
Slika 4-48: ¹ H NMR-spekter reakcijske zmesi BLA NCA, ZLO NCA in Cys NCA (molsko razmerje 45 : 45 : 10), izmerjen po 30 min po dodatku 1,5 mol % Et ₃ N.	91
Slika 4-49: SEM-mikrografa poliHIPE-a PBLA-ko-PZLO: spenjen del (A) in povečava sten (B).	92
Slika 4-50: SEM-mikrograf odščitenega poliHIPE-a PBLA-ko-PZLO (poliHIPE PAsp-ko-POrn).	92
Slika 4-51: ¹ H NMR-spektra (Boc-Hcys-OH) ₂ (A) in Hcys NCA (B).	94

Slika 4-52: SEM-mikrograf poliHIPE-a PBLA- <i>ko</i> -PZLO _{Hcys}	95
Slika 4-53: ¹ H NMR-spektra Boc-Glu(Boc-Lys-OH)-OH (A) in Glu-Lys NCA (B).....	96

Uporabljeni simboli in kratice

Simboli

c	koncentracija (M)
d	premer (mm)
$d_{\text{povp.}}$	povprečni premer pore (μm)
E	Youngov modul (Pa)
F	sila (N)
h	višina (mm)
M	molska masa (g mol^{-1})
m/z	razmerje med maso in nabojem (-)
M_n	številčno povprečje molske mase (g mol^{-1})
M_n/M_w	disperznost (-)
M_w	utežno povprečje molske mase (g mol^{-1})
R	dejanski polmer pore (μm)
r	navidezni polmer pore (μm)
R_f	faktor fiksacije začasne oblike (%)
R_r	faktor povrnitve prvotne oblike (%)
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
T_c	temperatura kristalizacije ($^{\circ}\text{C}$)
T_g	temperatura steklastega prehoda ($^{\circ}\text{C}$)
T_m	temperatura taljenja ($^{\circ}\text{C}$)
T_{trans}	temperatura prehoda iz začasne oblike v prvotno ($^{\circ}\text{C}$)
w	masni delež (mas. %)
x	množinski delež (mol %)
ΔH_m	talilna entalpija (J g^{-1})

Grški simboli

δ	kemijski premik (ppm)
ε	deformacija (%)
ρ	gostota (g cm^{-3})
σ	napetost (Pa)
Φ	poroznost (%)
χ_c	delež kristaliničnosti (%)

Kratice

AAMMA	pospešenaminski mehanizem z aktivacijo monomera (angl. <i>accelerated amine mechanism by monomer activation</i>)
AMM	mehanizem z aktiviranim monomerom (angl. <i>activated monomer mechanism</i>)
ATR	oslabljen totalni odboj (angl. <i>attenuated total reflectance</i>)
BLA	β -benzil-L-aspartat
BLG	γ -benzil-L-glutamat
Bn	benzil
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
BOD	4,4'-bioksepanil-7,7'-dion
Cbz	karbobenziloksi
CL	ϵ -kaprolakton
Cys	L-cistin
DAP	diaminopimelinska kislina
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetil formamid
DMSO	dimetil sulfoksid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetil sulfoksid
DPP	difenil fosfat
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
FBS	serum goveda fetusa (angl. <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Uprava za hrano in zdravila (angl. <i>Food and Drug Administration</i>)
Fmoc	fluorenilmetiloksikarbonil
FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
Gly	glicin
Hcys	L-homocistin
HEMA	hidroksietil metakrilat
HIPE	emulzija z visokim deležem notranje faze (angl. <i>high internal phase emulsion</i>)
HLB	hidrofilno-lipofilno ravnotežje
HMBC	heteronuklearna multiplo-kvantna korelacijska spektroskopija (angl. <i>heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>)
HSQC	heteronuklearna enojno-kvantna korelacijska spektroskopija (angl. <i>heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>)
MALDI-TOF MS	masna spektrometrija z ionizacijo v matriksu z lasersko desorpcijo in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (angl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>)
Me-F127	metiliran Pluronic F-127
MIU	<i>O</i> -metil izosečnina
MMA	metil metakrilat
NAM	normalniaminski mehanizem
NCA	<i>N</i> -karboksianhidrid (angl. <i>N-carboxyanhydride</i>)
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PB	petrol bencin

PBLA	poli(β -benzil-L-aspartat)
PBLG	poli(γ -benzil-L-glutamat)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCL	poli(ϵ -kaprolakton)
PEG	poli(etilen glikol)
PET	poli(etilen tereftalat)
PLGA	poli(L-glutaminska kislina)
PMMA	poli(metil metakrilat)
poliHEMA	poli(hidroksietil metakrilat)
poliHIPE	polimerizirana emulzija z visokim deležem notranje faze (angl. <i>polymerized high internal phase emulsion</i>)
PPG	poli(propilen glikol)
PPLG	poli(γ -propargil-L-glutamat)
PTFE	poli(tetrafluoroetilen)
PZLL	poli(N_{ϵ} -karbobenziloksi-L-lizin)
PZLO	poli(N_{δ} -karbobenziloksi-L-ornitin)
RGD	motiv arginin-glicin-aspartat
ROP	polimerizacija z odpiranjem obroča (angl. <i>ring-opening polymerization</i>)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (angl. <i>scanning electron microscopy</i>)
S_N1	mononuklearna nukleofilna substitucija
S_N2	binuklearna nukleofilna substitucija
SPPS	sintheza polipeptidov na trdni fazi (angl. <i>solid-phase peptide synthesis</i>)
tBu	<i>terc</i> -butil
TFA	trifluoroocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
YIGSR	motiv tirozin-izolevcin-glicin-serin-arginin
ZLL	N_{ϵ} -karbobenziloksi-L-lizin
ZLO	N_{δ} -karbobenziloksi-L-ornitin

1 Uvod

Porozni polimerni materiali so uporabni na področjih od separacije, katalize in čiščenja vod do biomedicinskih aplikacij, kot so gojenje celic, tkivno inženirstvo in regenerativna medicina.¹ Raznolikost sinteznih poti za pripravo polimerov omogoča načrtovanje in izdelavo poroznih polimerov različne kemijske sestave kot tudi oblike, npr. monolitov, membran ali kroglic.² Porozne polimere običajno pripravimo s tehnikami, kot so predenje, tridimenzionalno tiskanje, temperaturno procesiranje, s fazno separacijo ali z uporabo porogenov, ki jih po pripravi ogrodja odstranimo.³ Dober nadzor nad poroznostjo kot tudi velikostjo in povezanostjo por omogoča templatiranje z emulzijami z visokim deležem notranje faze (angl. *high internal phase emulsion*, HIPE).⁴ Pri tem polimeriziramo notranjo, zvezno fazo emulzije, ki vsebuje monomere, medtem ko dispergirano, kapljično fazo, po sintezi odstranimo.⁵ Polimerizirane HIPE (t.i. poliHIPE) običajno pripravimo s prosto radikalsko polimerizacijo stirenskih, akrilatnih ali metakrilatnih monomerov. Nabor polimerizacijskih tehnik, primernih za HIPE, se postopoma širi tudi na kontrolirano radikalsko polimerizacijo, metatezno polimerizacijo z odpiranjem obroča, Diels-Alder in klik polimerizacije.⁶ V večini primerov so poliHIPE-i sintetizirani iz nerazgradljivih polimerov, vendar pa je v zadnjem času vedno večje zanimanje za pripravo razgradljivih poliHIPE-ogrodij,⁷ ki so primerni za uporabo v tkivnem inženirstvu.⁸ Pri uporabi materialov v tkivnem inženirstvu je izjemno pomembna ustrezna porozna morfologija ogrodja, ki omogoča prenos hranil, odvajanje metabolnih izločkov in rast celic preko celotnega ogrodja, kot tudi biorazgradljivost in biološka združljivost samega polimera in njegovih razgradnih produktov. Razgradljive polimere, kot so npr. poliestri in sintetični polipeptidi, je možno pripraviti s polimerizacijo z odpiranjem obroča (angl. *ring-opening polymerization*, ROP) laktonov oz. *N*-karboksianhidridov (angl. *N-carboxyanhydride*, NCA) α -aminokislin. Poliestri imajo dobre mehanske lastnosti in se, odvisno od kemijske sestave in molske mase, razgradijo v času od nekaj mesecev do nekaj let, zato so uporabni predvsem kot ortopedski pripomočki in dolgotrajna ogrodja za tkivno inženirstvo.⁹ Posebna pozornost med poliestri je namenjena poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL), ki ga pripravimo z ROP ϵ -kaprolaktona (CL).¹⁰ PCL je delno kristaliničen polimer, zaradi česar lahko pri zamreženju izkazuje oblikovni spomin.¹¹ Sintetične polipeptide odlikujejo odlična biološka združljivost, encimska razgradljivost in prisotnost funkcionalnih skupin. Uporabljajo se predvsem za tarčno dostavo zdravilnih učinkovin in v tkivnem inženirstvu.¹²

1.1 Opredelitev problema

Razgradljivost in biološka združljivost polimerov sta povezani s kemijsko sestavo, medtem ko so morfološke lastnosti odvisne od načina priprave poroznega materiala. Ogrodja na osnovi PCL, pripravljena s tridimenzionalnim tiskanjem, omogočajo dobro kontrolo nad porozno morfologijo, vendar je tehnika omejena na pripravo ogrodij s porami velikosti nekaj 100 μm , postopek pa je drag in dolgotrajen.¹⁰ Pogosteje uporabljeno tehniko predstavlja predenje iz raztopine, s čimer dobimo nespletene vlaknaste mreže s porami velikostnega reda 10 μm .¹⁰ Priprava vlaknastih nosilcev na osnovi PCL z omenjeno tehniko je že dobro raziskana. Pomanjkljivost ogrodij na osnovi PCL je hidrofoben material brez funkcionalnih skupin na površini. Kot boljša alternativa poliestrom za uporabo v tkivnem

inženirstvu so se izkazali sintetični polipeptidi, pripravljani iz NCA-monomerov.^{13,14} ROP NCA-monomerov je pogosta tehnika za pripravo poroznih hidrogelnih ogrodij, ki lahko služijo kot ogrodja za rast celic. Hidrogeli imajo tridimenzionalno zamreženo strukturo kot posledico privlačnih nekovalentnih interakcij (ionske, hidrofobne) ali kovalentnih vezi. Absorbirajo in zadržijo lahko velike količine vode ter so po strukturi podobni izvenceličnemu matriksu.¹⁵ Hidrogeli omogočajo rast celic in so zato primerni materiali za uporabo v tkivnem inženirstvu.¹⁶⁻¹⁸ Če zamreževanje hidrogela poteka pod temperaturo ledišča vode, služijo kristali ledu kot templat za pripravo porozne strukture hidrogela, saj se polimerne verige skoncentrirajo na fazni meji med kristali in raztopino, kar vodi do nastanka kriogelov. Kriogeli imajo v primerjavi s hidrogeli bolj odprto poroznost in so mehansko obstojnejši, prav tako pa so uporabni kot materiali za rast celic.¹⁹⁻²¹

Opisani postopki priprave poroznih ogrodij omogočajo le delno kontrolo nad strukturo por, stopnjo poroznosti in povezanostjo por. Nasprotno vodi tehnologija HIPE-templatiranja do dobro kontrolirane, medsebojno povezane porozne strukture. Razgradljive poliHIPE-e lahko razdelimo na tiste, ki so osnovani iz naravnih biopolimerov, kot so npr. polisaharidi in proteini, ter na poliHIPE-e na osnovi sintetičnih polimerov. PoliHIPE-materiali na osnovi naravnih biopolimerov imajo pogosto bolj raznoliko kemijsko sestavo, kar lahko zmanjša kontrolo nad zamreženjem, zato je težko ponovljivo narediti ogrodja enake kakovosti.²² V primeru razgradljivih poliHIPE-ov iz sintetičnih polimerov gre običajno za razgradnjo disulfidnih ali estrskih skupin, ki so v strukturi zamreževalca in/ali del glavne verige. PoliHIPE-ogrodja na osnovi PCL poliestra so bila v večini pripravljena iz raztopine polimerov ali s polimerizacijo makromonomerov. Pomanjkljivost ogrodij, pripravljenih iz raztopine PCL, je, da njihova struktura ni zamrežena. Slaba stran polimerizacije makromonomerov pa je visoka viskoznost raztopin PCL, ki otežuje učinkovito mešanje pri pripravi emulzij. V izogib problemov zaradi visoke viskoznosti so PCL s končnimi diakrilatnimi skupinami redčili in kopolimerizirali z akrilnimi komonomeri ali zamreževali s tiol-en klik reakcijo z nizkomolekularnim tritolom, vendar tak sintezni postopek vodi do manjšega deleža razgradljivega PCL v strukturi poliHIPE-ogrodja,²³⁻²⁸ kar običajno predstavlja težavo za uporabo takšnih materialov v biomedicinske namene.

1.2 Doktorska teza, namen in cilji

V doktorskem delu bomo raziskali možnosti za pripravo popolnoma razgradljivih poliHIPE-polimerov, ki združujejo morfološke lastnosti poliHIPE-ov z lastnostmi sintetičnih poliestrov in polipeptidov. Namen je pripraviti ogrodja s kontrolirano kemijsko sestavo, poroznostjo, razgradljivostjo in funkcionalnostjo. Glavna teza dela je, da lahko, kljub občutljivosti ROP, pripravimo in polimeriziramo HIPE na osnovi heterocikličnih monomerov, kar je do sedaj slabo raziskana tema. PoliHIPE-ogrodja, pripravljena neposredno z ROP, nudijo številne prednosti, saj emulzije v tem primeru pripravimo iz monomerov, zato ni dodatnih korakov sinteze in izolacije polimera oz. makromomera, s tem pa se obenem izognemo težavi visoke viskoznosti raztopine polimera med mešanjem emulzije. Metodo bomo razvili za dve različni vrsti monomerov: ciklične estre (laktone), ki jih uporabljamo za pripravo poliestrov, ter za NCA-monomere za pripravo sintetičnih polipeptidov. Lastnosti nastalih poliHIPE-ogrodij bomo prilagajali z izborom monomerov in količino zamreževalca oziroma kemijsko

sestavo emulzij, morfologijo ogrodja pa s količino notranje faze emulzije, površinsko aktivnega sredstva in katalizatorja. Pokazali bomo, da lahko z ROP, izvedeno v HIPE-u, pripravimo polimerna ogrodja z različnimi lastnostmi, kot so semikristaliničnost in funkcionalnost, ki izhaja iz raznolikega nabora NCA-monomerov. Raziskali bomo možnost kopolimerizacije različnih monomerov ter izpostavili dejavnike, ki so bistveni za pripravo obstojnih polipeptidnih poliHIPE-ov. Ne nazadnje je naš namen vzpostaviti povezave med sintezo, strukturo in lastnostmi materialov, kar bo odprlo možnosti za načrtovanje in pripravo različnih funkcionalnih poliHIPE-materialov.

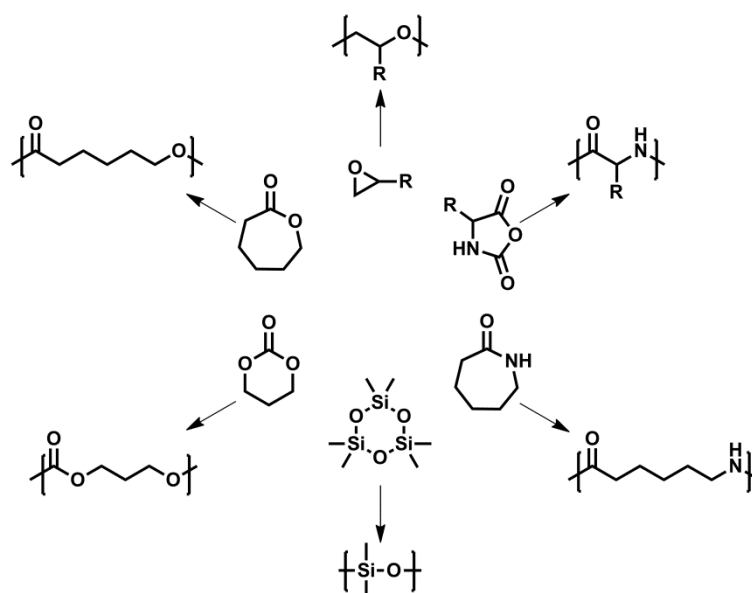
V prvem sklopu rezultatov doktorskega dela se bomo osredotočili na ROP tekočega monomera CL v HIPE. Cilj našega dela je v prvi fazi razviti metodo priprave in polimerizacije brezvodne emulzije, pri kateri upoštevamo omejitve ROP. Namen je pripraviti obstojne poliHIPE-e na osnovi zamreženega PCL. Nadalje bomo raziskali njihove termomehanske lastnosti v odvisnosti od sestave oz. stopnje zamreženja. Nenazadnje bomo PCL poliHIPE testirali na zmožnost oblikovnega spomina, kar je redka lastnost poliHIPE-materialov.

V drugem sklopu bomo razširili uporabnost ROP v HIPE-u na NCA-monomere. PoliHIPE-i na osnovi sintetičnih polipeptidov še niso bili pripravljene in bodo predstavljali nova tridimenzionalna, makroporozna ogrodja, primerna za pričvrstitev in rast celic, s potencialom za uporabo v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini. Najprej bomo postavili sistem brezvodnih HIPE-ov, nato pa v tretjem sklopu doktorskega dela kot dokaz splošne uporabnosti razvite metode razširili nabor NCA-monomerov in NCA-zamreževalcev. Ker so NCA-monomeri različno reaktivni, bomo na posameznih primerih optimizirali pogoje priprave stabilnih poliHIPE-ov. Cilj je razviti metodo, ki bo omogočala sintezo polipeptidnih poliHIPE-ov na osnovi poljubnih α -aminokislin. To bo odprlo pot k načrtovanju in sintezi raznovrstnih naprednih materialov, ki bodo uporabni za različne biomedicinske aplikacije.

2 Teoretični del

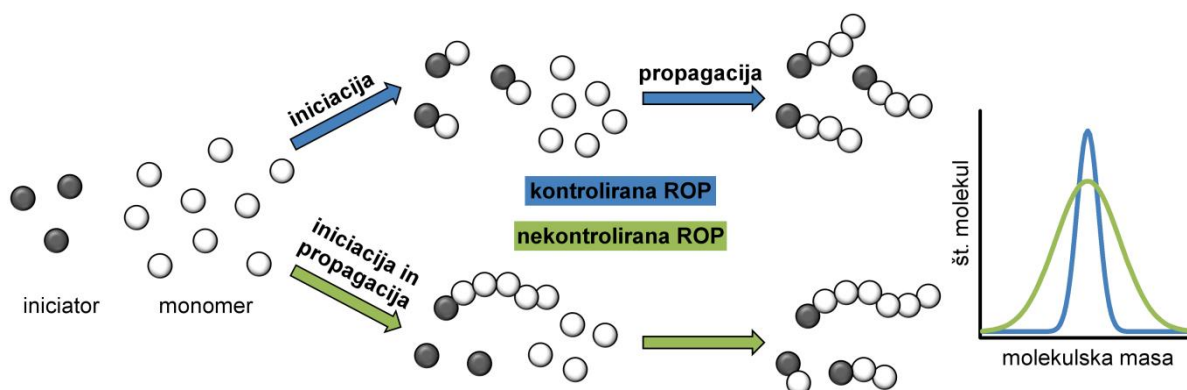
2.1 Polimerizacija z odpiranjem obroča (ROP)

Polimerizacija z odpiranjem obroča (ROP) zajema polimerizacijo heterocikličnih monomerov, kot so ciklični etri (epoksidi), ciklični estri (laktoni, laktidi), ciklični karbonati, ciklični amidi (laktami), NCA, ciklični siloksani in drugi (slika 2-1). Gonilna sila ROP je sprostitvev napetosti v obroču, ki je posledica izkrivljenega kota vezi in odboja med vodikovimi atomi. Napetost je najbolj izrazita v tri- in štiričlenskih obročih, medtem ko so pet- do sedemčlenski obroči napeti, če vsebujejo npr. estrsko vez, pri večjih obročih pa napetost in posledično reaktivnost monomera upadeta.²⁹⁻³¹



Slika 2-1: Primeri heterocikličnih monomerov in pripadajočih polimernih struktur, ki nastanejo po mehanizmu ROP.

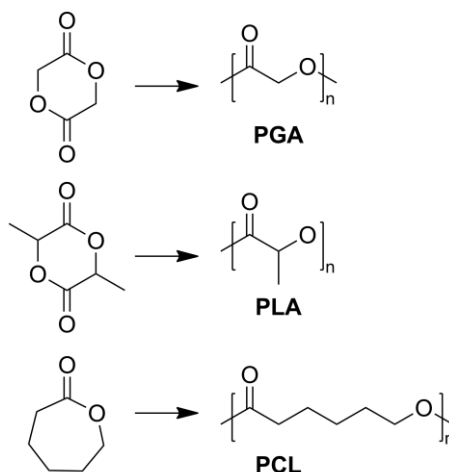
ROP je verižna (angl. *chain-growth*) polimerizacija, ki jo v splošnem razdelimo na tri korake: (i) iniciacija, pri čemer nastane aktivni center, (ii) propagacija, ki vključuje rast verig z dodajanjem monomernih enot na aktivni konec polimerne verige, ter (iii) terminacija, ki vključuje reakcijo na aktivnem koncu, s čimer je onemogočena nadaljnja rast verig.³¹ Kadar je reakcija iniciacije hitrejša od propagacije, je molekulska masa makromolekularnih verig odvisna od razmerja med monomerom in iniciatorjem (slika 2-2). Nastali polimer ima ozko porazdelitev molske mase in zato nizko disperznost (M_w/M_n , pri čemer je M_w utežno povprečje molske mase, M_n pa številčno povprečje molske mase). Če nastale verige ostanejo aktivne in ne pride do terminacije oziroma stranskih reakcij, govorimo o t.i. živi polimerizaciji. Razlogi za odstopanja od živega značaja polimerizacije so počasna iniciacija ali prisotnost stranskih reakcij, česar posledica je širitev porazdelitve molskih mas. Za kontrolirano ROP je značilno, da se po iniciaciji koncentracija aktivnih zvrsti ne spreminja, poraba monomera sledi kinetiki prvega reda, povprečje molskih mas pa raste linearno s konverzijo monomera.^{32,33}



Slika 2-2: Shematski prikaz poteka polimerizacije v primeru kontrolirane in nekontrolirane ROP.

Iniciacijo ROP lahko sprožijo spojine, ki povzročijo heterolizo polarizirane vezi med ogljikom in heteroatomom, pri čemer pride do odprtja monomernega obroča.³⁰ Glede na ionski naboj aktivne propagirajoče zvrsti ločimo anionski in kationski mehanizem ROP.³³ Za anionski mehanizem ROP je značilno, da negativno nabita zvrst oz. nukleofil napade ogljikov atom nizke elektronske gostote ob elektron-privlačni skupini (X). Pri tem se obroč odpre, nastali Y⁻ anion pa napade ogljikov atom z nizko elektronsko gostoto naslednjega monomernega obroča (slika 2-3A).³⁰ Pri kationskem mehanizmu ROP monomer deluje kot Lewisova baza, ki napade pozitivno nabit oz. elektrofilni iniciator. Nastane ciklična kationska zvrst, ki se spontano odpre v primeru, če pri tem nastane stabilen X⁺ kation, ki ga napade naslednja molekula monomera (mehanizem S_N1). Če X⁺ ni stabiliziran, bo propagacija potekla po mehanizmu S_N2, pri čemer bo naslednja molekula monomera napadla elektronsko bogat ogljik ob pozitivno nabitem heteroatomu (slika 2-3B).³⁰ Organski katalizatorji sodelujejo pri ROP na ta način, da aktivirajo monomer, konec verige ali oba.³² ROP lahko sprožijo tudi kovinski katalizatorji po mehanizmu koordinacije in vstavljanja, za katerega je značilno, da se monomer koordinira na kovino katalizatorja in se vstavi v vez med kovino in kisikom. Za razliko od anionskega in kationskega mehanizma, kjer gre za proste ione oz. ionske pare, je v tem primeru propagirajoča zvrst kovalentno vezana na protiion.³³

nastane 6-hidroksikaprojska kislina, ki jo telo lahko metabolizira v Krebsovem ciklu.⁹ Pri fizioloških pogojih traja razgradnja PCL od nekaj mesecev do nekaj let.¹⁰ PCL se uporablja predvsem v biomedicinski namene, npr. za ortopedske naprave, prostetiko in nadzorovano dostavo zdravilnih učinkovin.⁹ Za uporabo v tkivnem inženirstvu so materiali na osnovi poliestrov preveč hidrofobni, poleg tega v strukturi ne vsebujejo funkcionalnih skupin, zaradi česar je interakcija površine takšnega materiala s celicami slaba in posledično pričvrstitev celic na ogrodje nezadostna.

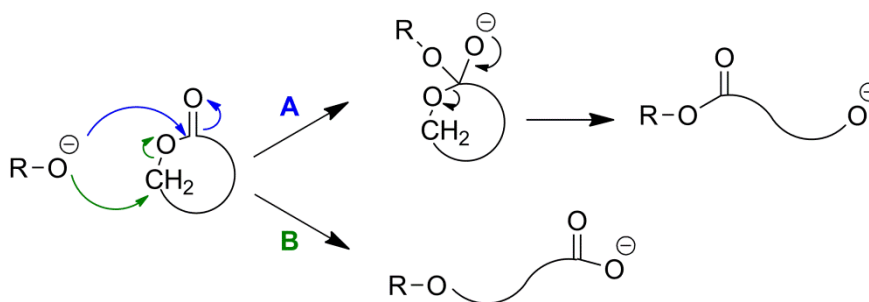


Slika 2-5. Primer alifatskih poliestrov, pripravljenih z ROP laktonov.

2.2.1 Mehanizmi ROP laktonov

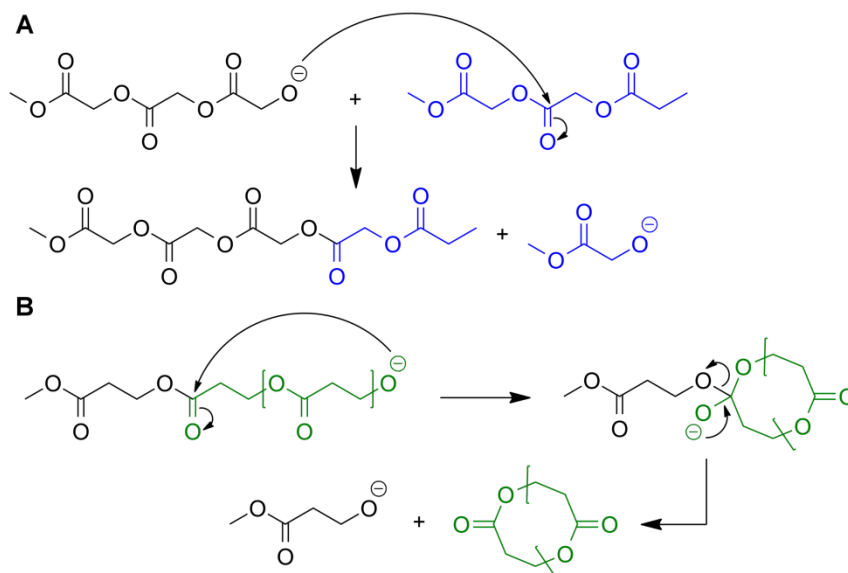
2.2.1.1 Anionska ROP laktonov

ROP laktonov lahko poteče po anionskem mehanizmu, ki ga sprožijo nukleofili, kot so alkoksidi alkalijskih kovin.³⁵ Negativno nabit nukleofilni iniciator aktivira monomer, tako da običajno napade ogljikov atom karbonylne skupine, čemur sledi prekinitev estrske vezi v obroču ter njegovo odprtje (slika 2-6A). V primeru β -laktonov poteče nukleofilni napad na alilni ogljikov atom ob kisiku, kar vodi v prekinitev C-O vezi in odprtje obroča (slika 2-6B). Propagirajoča zvrst pri anionskem mehanizmu je nastali alkoxidni ion ali karboksilatni ion, ki napade naslednjo molekulo monomera.⁹



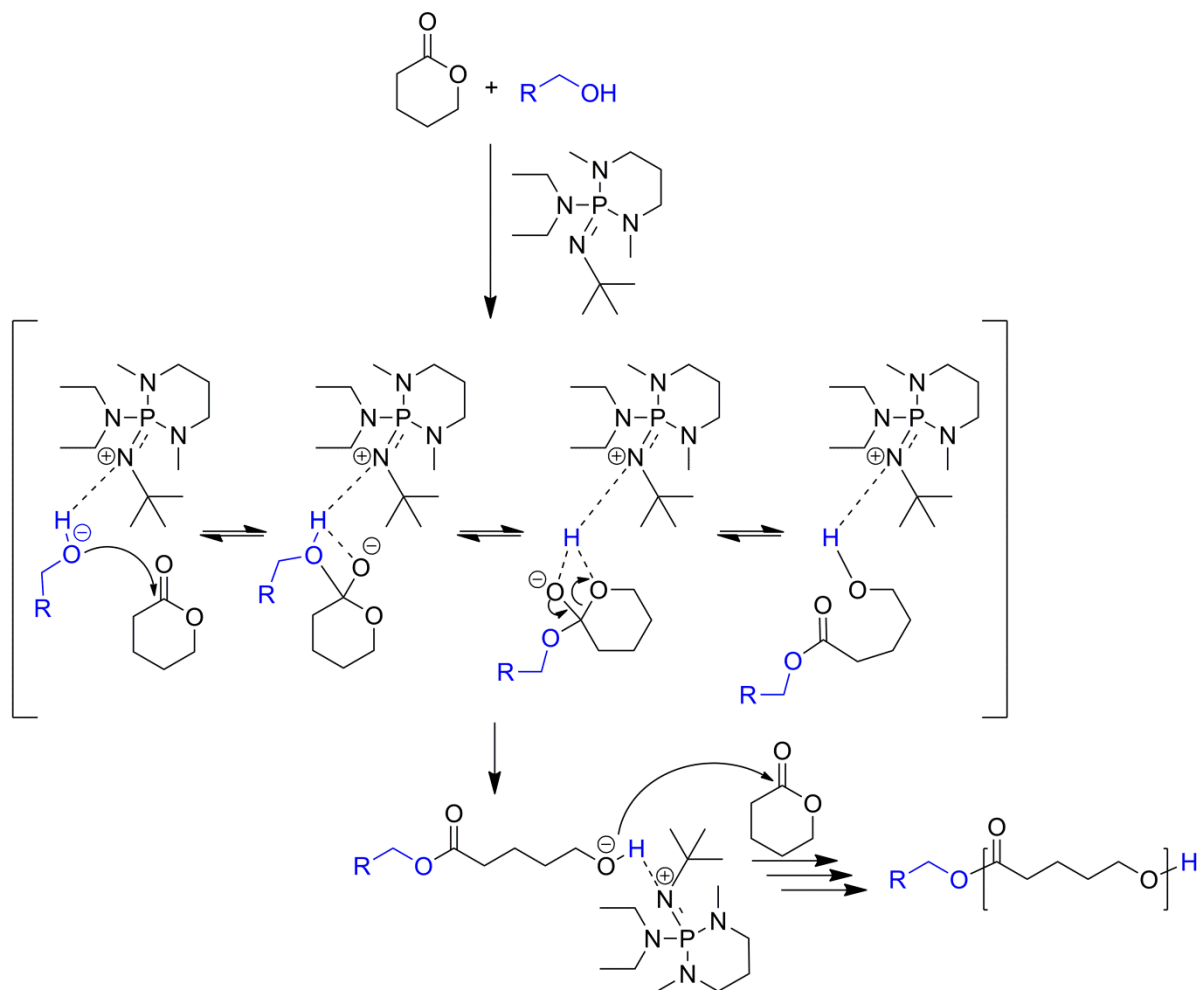
Slika 2-6: Anionski mehanizem ROP laktonov z napadom iniciatorja na ogljikov atom karbonylne skupine (A) ali na alilni ogljikov atom ob kisiku (B).³⁵

Alkoksidni ion lahko namesto karbonilne skupine v molekuli monomera napade tudi karbonilno skupino v poliestrski verigi. Če napade karbonilno skupino estrske vezi druge polimerne verige, pride do intermolekularne transesterifikacije (slika 2-7A), katere posledica je širša porazdelitev molskih mas, ki se odraža v višji disperznosti. Če napade karbonilno skupino v isti verigi, gre za intramolekularno transesterifikacijo (angl. tudi t.i. *backbiting*), ki vodi do nastanka cikličnih struktur in krajših verig (slika 2-7B).⁹



Slika 2-7: Stranski reakciji pri ROP laktonov: intermolekularna transesterifikacija (A) in intramolekularna transesterifikacija (B).³⁵

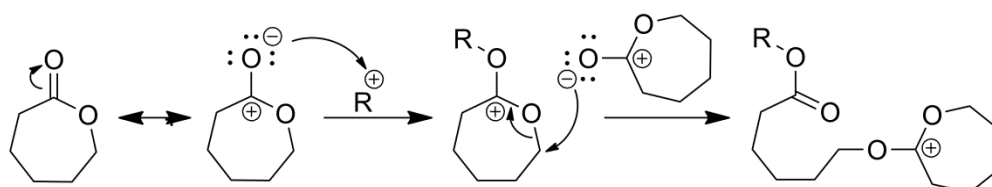
Manj nukleofilne zvrsti, kot so npr. alkoholi, iniciirajo ROP laktonov ob prisotnosti organskega katalizatorja. To so lahko močne baze, kot so fosfazeni, ki aktivirajo hidroksilno skupino iniciatorja.³³ Alkohol tako postane bolj nukleofil in napade laktonski monomer. Pri tem se sprost končna hidroksilna skupina, ki jo baza aktivira, da deluje kot nukleofil, preko katerega poteče rast verig (slika 2-8). Prednost uporabe ustreznih bazičnih organskih katalizatorjev namesto kovinskih alkoxidov je v tem, da je obseg transesterifikacije kot stranske reakcije manjši, poleg tega pa hitreje dosežemo visoke stopnje konverzije monomerov.³²



Slika 2-8: Mehanizem aktivacije alkoholnega iniciatorja oz. aktivnega konca verige za ROP laktonov s fosfazenom.³³

2.2.1.2 Elektrofилno katalizirana ROP laktonov

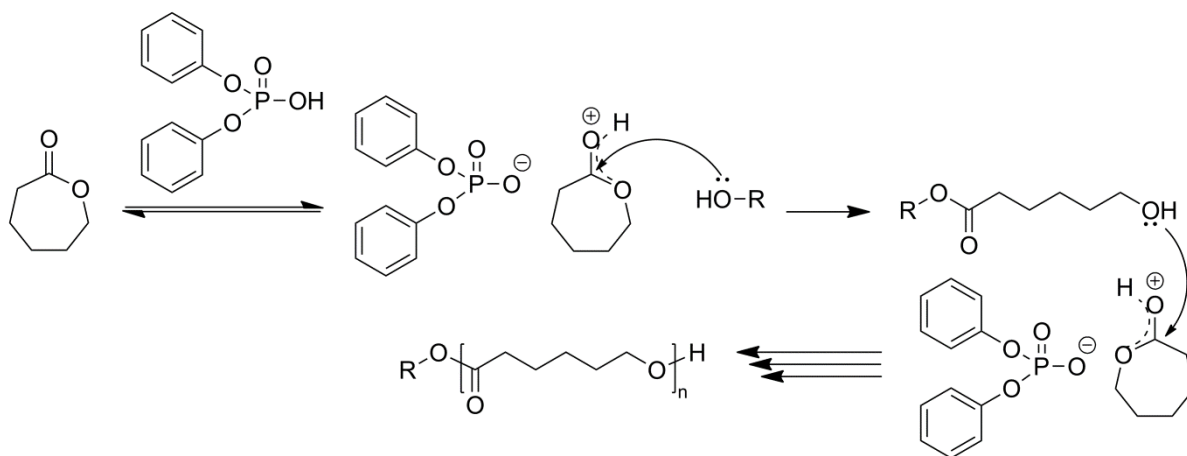
ROP laktonov lahko poteče tudi po kationskem mehanizmu, ki ga iniciirajo in/ali katalizirajo elektrofилni agenti, kot so alkilirajoča in acilirajoča sredstva ter Brønstedove ali Lewisove kisline.^{30,35} Na sliki 2-9 je prikazan primer iniciacije ROP laktona z alkilirajočim sredstvom, kjer karbonilni kisik estrske skupine monomera napade kation. Nastane dialkoksikarbokation, ki reagira z drugo molekulo monomera, pri čemer pride do cepitve C-O-vezi in sprostitve estrske skupine.



Slika 2-9: Mehanizem ROP laktona z alkilirajočim sredstvom.³⁵

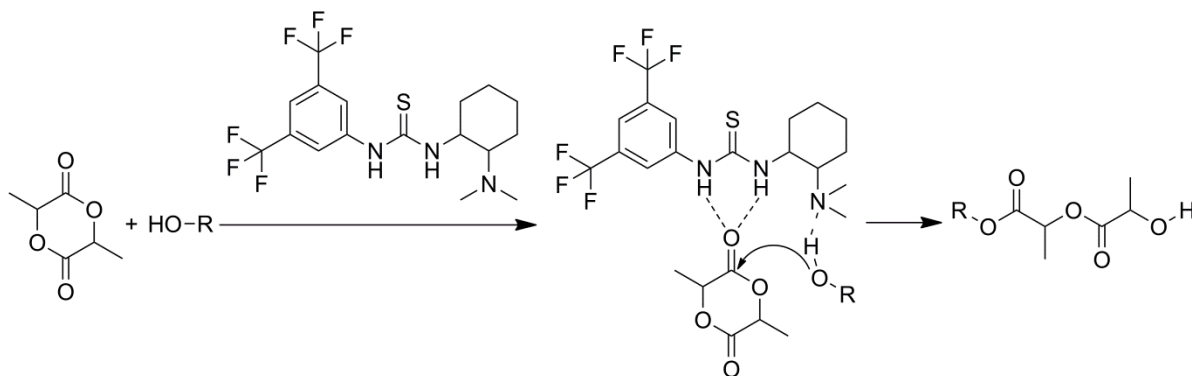
Protične kisline v prisotnosti alkohola delujejo kot organski katalizatorji, ki aktivirajo monomer. S protonacijo karbonilne skupine je lakton bolj dovzeten za nukleofilni napad alkohola kot iniciatorja, ki odpre obroč. Pri tem nastane končna hidroksilna skupina, ki

nadalje deluje kot nukleofil, preko katerega poteka propagacija.³² Uporabljajo se močne kisline, kot sta npr. trifluorometansulfonska kislina in trifluorometansulfonimid. Makiguchi in sodelavci³⁷ so pokazali, da dobro kontrolo nad ROP CL in δ -valerolaktona omogoča tudi šibka kislina difenil fosfat (DPP) (slika 2-10). ROP v tem primeru poteče pri sobni temperaturi, popolna konverzija monomerov pa je dosežena v roku nekaj ur. Polimerizacijo lahko opišemo kot živo, ki tako omogoča podaljševanje verig in pripravo blok kopolimerov. DPP je primeren tudi za ROP laktonov v talini.³⁸



Slika 2-10: Mehanizem ROP laktona, aktiviranega z DPP in iniciiranega z alkoholom.³⁷

Poleg elektrofilne aktivacije monomera lahko istočasno aktiviramo iniciator oz. aktivni konec verige z bazo. Dvojno aktivacijo lahko dosežemo z uporabo tiosečnine, ki s tvorbo vodikovih vezi aktivira monomer, in amina, ki aktivira alkoholni iniciator (slika 2-11).³²

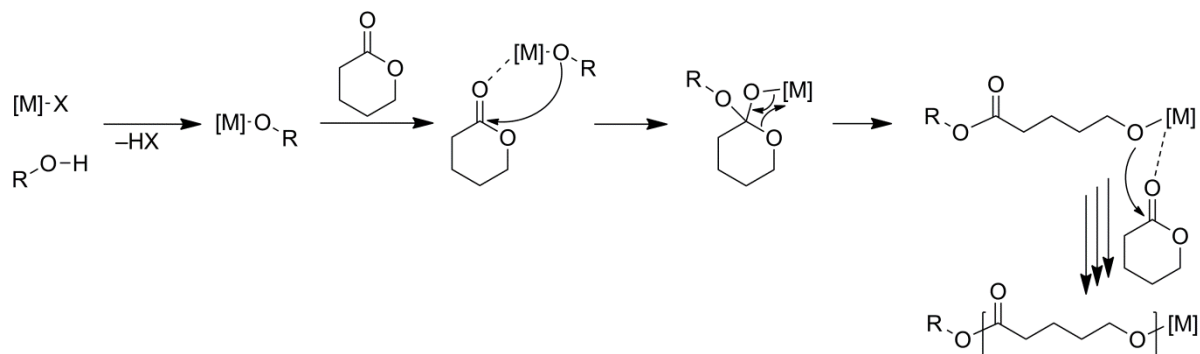


Slika 2-11: Mehanizem ROP laktona, aktiviranega s tiosečnino in aminom ter iniciiranega z alkoholom.³³

2.2.1.3 Koordinacijska ROP laktonov

ROP laktonov katalizirajo tudi kovinski alkoksidi, ki se koordinirajo na monomer in s tem povečajo elektrofilnost karbonilnega ogljikovega atoma estrske vezi (slika 2-12).⁹ Temu sledi adicija nukleofilnega alkoksida. Obroč se odpre in nastane nov alkoxid, ki nadalje deluje kot propagirajoča zvrst. Koordinacijski alkoksidi so manj reaktivni od anionskih, zato mehanizem koordinacije in vstavljanja omogoča boljše selektivnost kot anionski mehanizem.³⁵ Kot katalizator se najpogosteje uporablja kositrov(II) bis-(2-etilheksanoat), znan tudi kot kositrov oktanoat, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, ki je odobren s strani Uprave za hrano in zdravila

(FDA).^{9,29,35} Kot karboksilat je slab iniciator za ROP, zato običajno dodamo v reakcijsko zmes alkohol, reakcija pa poteka pri visokih temperaturah (>80 °C). Sn(Oct)₂ pri tem *in situ* reagira z alkoholom, da nastane alkoksid. Kovinske katalizatorje težko popolnoma odstranimo iz poliestrskega materiala. Ker so kovine že v sledovih lahko toksične za celice, se uporabi kovinskih katalizatorjev izogibamo pri pripravi poliestrov za biomedicinske aplikacije.⁹



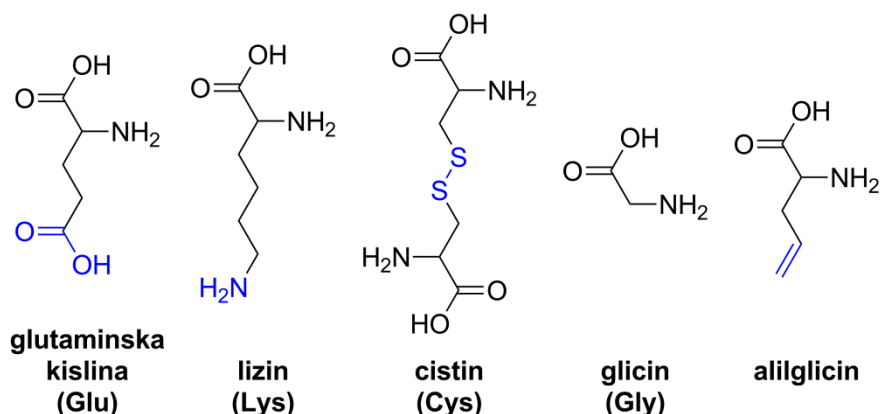
Slika 2-12: Mehanizem ROP laktona, kataliziranega s kovinskim alkoksidom, ki nastane iz kovinskega karboksilata in alkohola.³²

2.2.1.4 Encimsko katalizirana ROP laktinov

ROP lahko katalizirajo tudi encimi. Najbolj raziskane so lipaze, katerih vloga v naravi je kataliza hidrolize estrske vezi. Ker gre za ravnotežno reakcijo, lahko lipaze izkoristimo tudi za nastanek estrske vez. ROP, katalizirana z encimi, je značilna predvsem za laktone. Encimi delujejo kot katalizatorji, ki tvorijo kompleks z laktinom, medtem ko je iniciator običajno alkohol.³⁹ Prednost encimskega mehanizma je v tem, da omogoča polimerizacijo večjih laktinov (od 9- do 17-členskih obročev), ki sicer nimajo dovolj napetosti v obroču, da bi polimerizirali po ostalih znanih mehanizmih. Glavna pomanjkljivost je, da polimeri ne dosežejo visokih molskih mas, porazdelitev molskih mas pa je široka.⁹

2.3 Sintetični polipeptidi

V zadnjih letih so raziskave usmerjene v pripravo sintetičnih polipeptidov. Ker so biološko združljivi in biorazgradljivi, se uporabljajo predvsem v biomedicinskih aplikacijah, kot so nadzorovana dostava in sproščanje zdravilnih učinkovin in genov, tkivno inženirstvo in regenerativna medicina. Prednost polipeptidov pred drugimi materiali, ki se uporabljajo v te namene, je njihova funkcionalnost, ki izvira iz stranskih funkcionalnih skupin naravnih in sintetičnih α -aminokislin (slika 2-13).⁴⁰ Posledično lahko s spreminjanjem vrste α -aminokislin, uporabljenih za sintezo, prilagajamo hidrofilitnost oz. hidrofobnost materiala, ne nazadnje pa funkcionalne skupine omogočajo številne nadaljnje popolimerizacijske reakcije oziroma modifikacije, s katerimi lahko izboljšamo fizikalne lastnosti ali vplivamo na specifične biološke interakcije. Polipeptidi so odporni proti hidrolitski razgradnji, medtem ko jih encimi lahko razgradijo do α -aminokislin.¹²

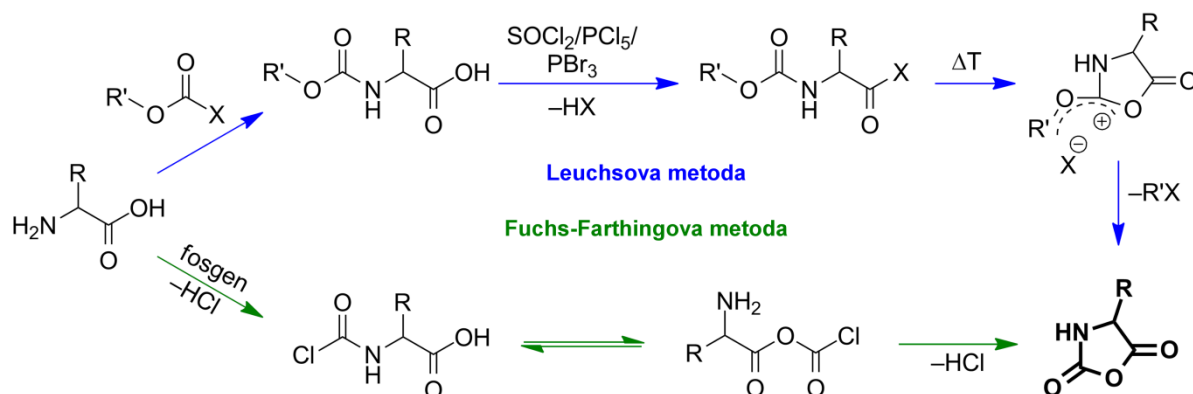
Slika 2-13: Primeri α -aminokislin.

Sinteza polipeptidov lahko poteka v bakterijah, v katere vnesemo ustrezne rekombinantne plazmide. Na ta način bakterija sintetizira polipeptide točno določene velikosti in sekvence, vendar je tak postopek zahteven, izkoristki pa nizki zaradi kompleksnih postopkov čiščenja. Izbira α -aminokislin je omejena predvsem na naravne α -aminokislino. Alternativni postopek priprave polipeptidov je sinteza na trdnem nosilcu (angl. *solid phase peptide synthesis*, SPPS), kjer lahko uporabimo tudi α -aminokislino, ki se v naravi ne pojavljajo. Tudi ta postopek omogoča nadzor nad sekvenco polipeptida, a ima pomanjkljivosti, saj vključuje potrebne vmesne korake odščite in čiščenja, ki znižajo izkoristek, dolžina verige pa je zaradi nepopolnih reakcij omejena na približno 50–100 aminokislin.^{12,41} Enostavnejši in cenovno ugodnejši pristop za pripravo sintetičnih polipeptidov na večji skali predstavlja ROP NCA-monomerov, ki jih pripravimo iz α -aminokislin. Z ROP NCA lahko dosežemo visoke molske mase, ne da bi prišlo do racemizacije na kiralnih centrih α -aminokislin. Širok nabor različnih NCA-monomerov nudi izjemno kemijsko raznolikost sintetičnih polipeptidov, čeprav na račun nekontroliranega aminokislinskega zaporedja in širše porazdelitve molskih mas kot v primeru polipeptidov, sintetiziranih po prejšnjih dveh postopkih.⁴¹

2.3.1 Sinteza *N*-karboksianhidridov (NCA)

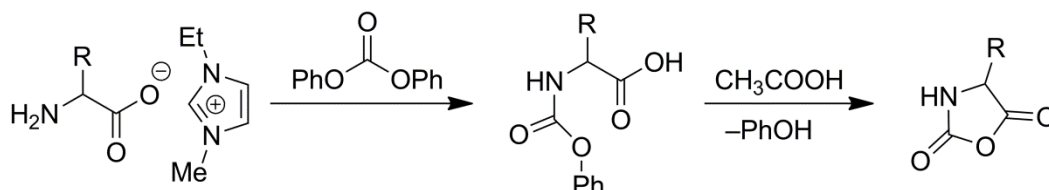
Da bi sinteza polipeptidov iz α -aminokislin potekala z odprtjem obroča, je α -aminokislino najprej potrebno pretvoriti v ciklične monomere. To je možno z uvedbo dodatne karbonilne skupine, ki omogoča ciklizacijo v 5-členski obroč – NCA-monomer (slika 2-14). Prve NCA-monomere je leta 1906 sintetiziral Leuchs iz *N*-karbamoil α -aminokislin.⁴² Kot halogenirno sredstvo je uporabil tionil klorid (SOCl_2), ki so ga kasneje nadomestili z bolj reaktivnim fosforjevim tribromidom (PBr_3) oz. fosforjevim pentakloridom (PCl_5), v uporabi pa je tudi diklorometil metil eter ($\text{Cl}_2\text{CHOCH}_3$).^{12,43} Sintezo NCA-monomerov so izboljšali z reakcijo s fosgenom, t.i. Fuchs-Farthing metoda, ki omogoča pripravo čistih NCA-monomerov z visokim izkoristkom.⁴⁴ Pri tem gre za neposredno fosgenacijo α -aminokislin v inertnem polarnem topilu, običajno tetrahidrofuranu (THF) ali etil acetatu. Ker je fosgen izredno toksičen plin, sta pogosteje v uporabi njegova derivata, tekoč difosgen ali trden trifosgen, ki reagirata kot dva oz. trije ekvivalenti fosgena.^{12,43} Pred nedavnim so Fuchs-Farthing metodo izboljšali z uporabo mikropretočnega reaktorja. S tem pristopom so odpravili potrebo po uporabi lovilcev kislin pri sintezi NCA-monomerov z občutljivimi stranskimi skupinami. α -Aminokislino so pretvorili v NCA-monomere v bazičnih pogojih, kar reakcijo ciklizacije pospeši, ključnega pomena pa je hitri prekop na kisle pogoje in redčenje raztopin, ki

preprečijo odprtje obroča NCA-monomerov. Na ta način so v blagih pogojih in kratkem času pripravili 25 različnih NCA-monomerov.⁴⁵



Slika 2-14: Ciklizacija α -aminokislin v NCA-monomere po Leuchsovi in Fuchs-Farthing metodi.¹²

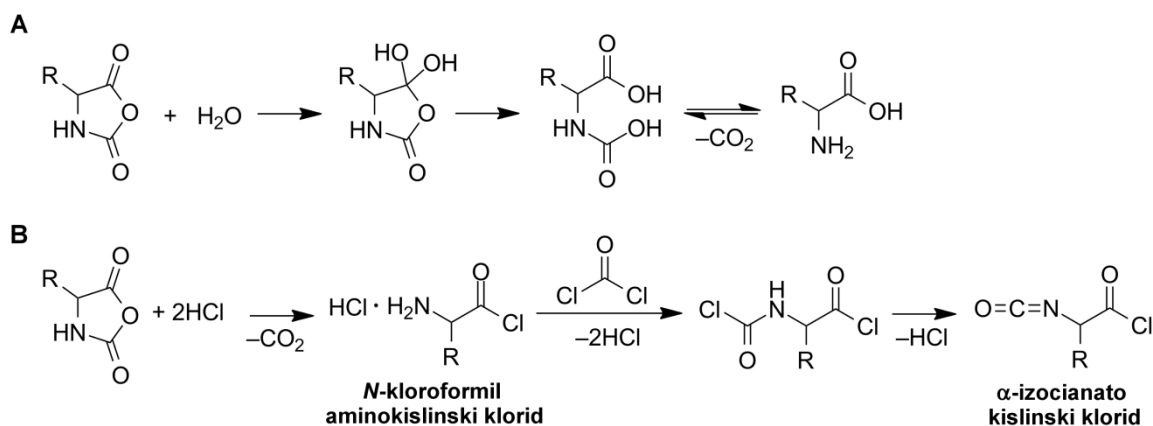
Poznan je tudi postopek priprave NCA-monomerov brez uporabe fosgena, kjer kot vir karbonylne skupine uporabimo difenil karbonat (slika 2-15). Gre za pretvorbo aminokislina v imidazolijevo ali tetrabutylamonijevo sol in reakcijo proste aminske skupine z difenil karbonatom. Pri tem nastane uretanski derivat, ki v prebitku kisline ciklizira v pripadajoč NCA-monomer.^{46,47}



Slika 2-15: Shema sinteze NCA-monomerov z uporabo difenil karbonata.^{46,47}

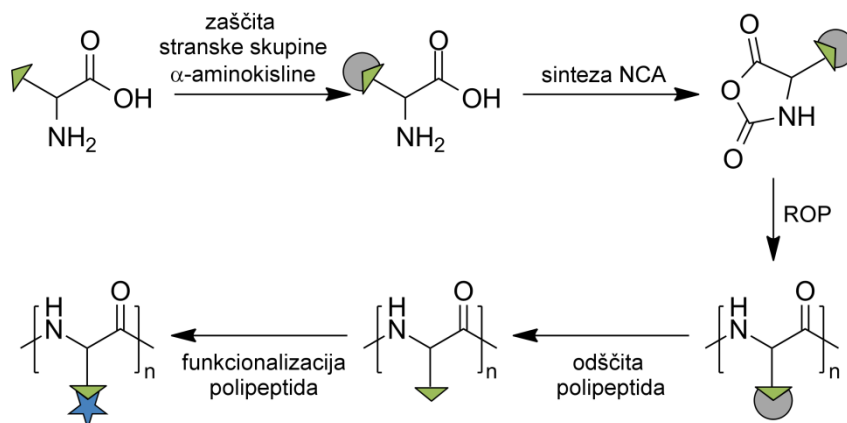
Bistveno pri uporabi NCA-monomerov za sintezo polipeptidov je njihova čistost, saj je ROP NCA izredno občutljiva reakcija na prisotnost nečistoč. Med sintezo NCA je nastali HCl možno odstraniti z uporabo lovilcev kisline, kot sta α -pinen in limonen. Odstranimo ga lahko tudi po končani reakciji s spiranjem reakcijske zmesi z vodo in/ali vodno raztopino NaHCO_3 .⁴⁸ Ta korak čiščenja je potrebno izvesti pri nizki temperaturi, da preprečimo hidrolizo NCA-monomerov (slika 2-16A), vodo pa je po spiranju potrebno popolnoma odstraniti.⁴⁹ Najpogosteje NCA-monomere čistimo z večkratno prekristalizacijo, pri čemer odstranimo morebitne nečistoče, nastale pri sintezi NCA-monomerov s fosgenom, npr. *N*-kloroformil aminokislinske kloride in α -izocianato kislinske kloride (slika 2-16B). Če gre za oljnate NCA produkte, kjer čiščenje s prekristalizacijo ni možno, uporabimo kolonsko »flash« kromatografijo.⁵⁰ Ta metoda je uporabna za čiščenje številnih NCA-monomerov, tudi takih s kompleksnimi stranskimi skupinami, a jo je potrebno izvajati v brezvodnih pogojih.^{12,43} Za zagotavljanje čistosti tako NCA-monomerov kot ostalih reagentov in topil so razvili tehniko čiščenja in polimerizacije v posebni stekleni aparaturi pod visokim vakuumom, ki zagotavlja živo polimerizacijo.⁵¹ Za čiščenje NCA-monomerov na večji skali je uporabna tudi filtracija skozi diatomejsko zemljo (celit).⁵² V posebnih primerih lahko NCA-monomere polimeriziramo z mehanizmom ROP brez predhodnih korakov čiščenja. V takšnih primerih NCA-monomere raztopimo v micelah miniemulzije v diklorometanu. HCl, ki

je prisoten v nečiščenem NCA, preferenčno difundira v vodno fazo, medtem ko površinsko aktivna snov preprečuje interakcijo NCA, ki se nahaja v oljni fazi, z vodo.⁵³ Nadalje so NCA v vodni emulziji z diklorometanom⁵⁴ ali kloroformom⁵⁵ stabilizirali s poli(etilen glikol)-*b*-poli(γ -benzil-L-glutamatom) (PEG-*b*-PBLG), ki je obenem deloval kot površinsko aktivna snov in iniciator ROP NCA. Pri tem so avtorji poročali, da vijačna struktura PBLG-bloka pospeši rast verig, tako da je polimerizacija potekla hitreje od stranskih reakcij NCA z vodo.



Slika 2-16: Stranske reakcije NCA-monomerov v prisotnosti nečistoč: hidroliza NCA-monomera (A)⁴⁹ ter nastanek *N*-kloroformil aminokislinskega klorida in α -izocianato kislinskega klorida (B).⁴³

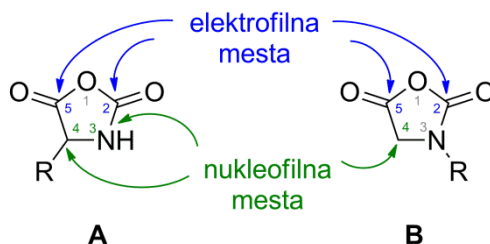
Ker pri sintezi NCA-monomerov uporabljamo zelo reaktivne reagente, morata biti edini reaktivni skupini α -aminokislina α -aminska in α -karboksilna skupina. V primeru uporabe naravnih α -aminokislina, ki v strukturi vsebujejo stranske funkcionalne skupine, kot je karboksilna kislina, amin, alkohol, tiol, imidazol ali gvanidin, je le-te pred sintezo NCA potrebno zaščititi, po polimerizaciji takšnih NCA-monomerov pa lahko zaščitne skupine odstranimo (slika 2-17).¹² Za zaščito karboksilne kisline pogosto uporabljamo benzilni (Bn) ali *tert*-butilni (*t*Bu) ester, ki ju lahko odstranimo z bromovodikovo kislino (HBr) oz. trifluoroocetno kislino (TFA). Za zaščito aaminskih skupin so v uporabi karbamati, kot je *tert*-butiloksikarbonil (Boc), ki ga odstranimo s TFA, karbobenziloksi (Cbz ali Z), ki ga odstranimo s HBr ali s hidrogeniranjem, in fluorenilmetiloksikarbonil (Fmoc), katerega odščita poteka s piperidinom.⁵⁶ Prisotnost stranskih funkcionalnih skupin v NCA-monomerih pa hkrati omogoča uvedbo novih funkcionalnosti, kar omogoča širitev nabora uporabe sintetičnih polipeptidov.¹²



Slika 2-17: Shematski prikaz zaščite stranske skupine α -aminokislina, sinteze NCA-monomera, sinteze in odščite polipeptida ter popolimerizacijske modifikacije polipeptida.

2.3.2 Mehanizmi ROP NCA

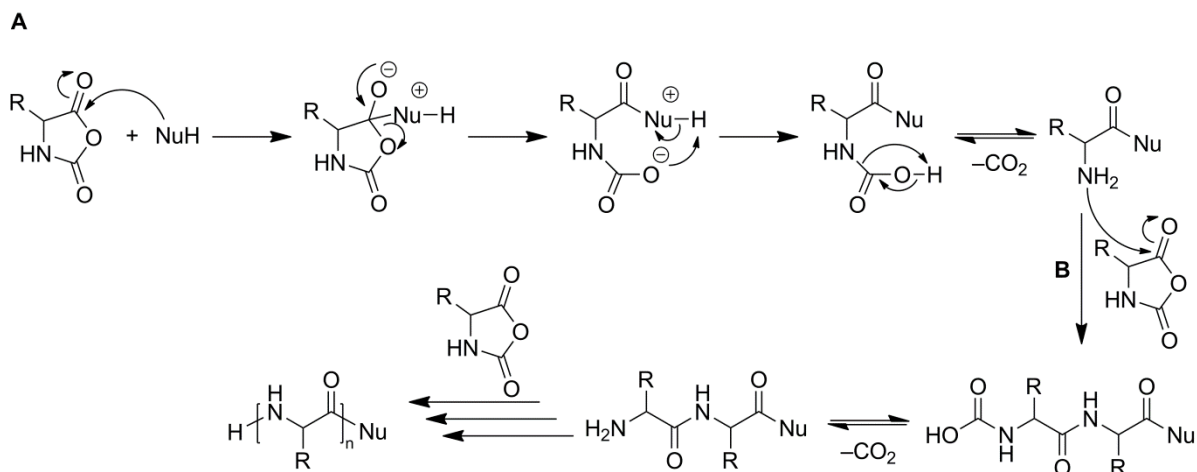
NCA-monomeri imajo več reaktivnih mest, in sicer dva elektrofilna ogljikova atoma (slika 2-18, C-2 in C-5), v primeru deprotonacije pa še nukleofilni dušikov in ogljikov atom (N-3 in C-4), zato lahko reagirajo na različne načine. *N*-substituirani NCA-monomeri imajo na mestu N-3 namesto vodika pripeto stransko skupino in se zato v reaktivnosti razlikujejo od običajnih NCA.^{43,48,49}



Slika 2-18: Reaktivna mesta *N*-nesubstituiranih (A) in *N*-substituiranih NCA-monomerov (B).

2.3.2.1 Normalni aminski mehanizem (NAM)

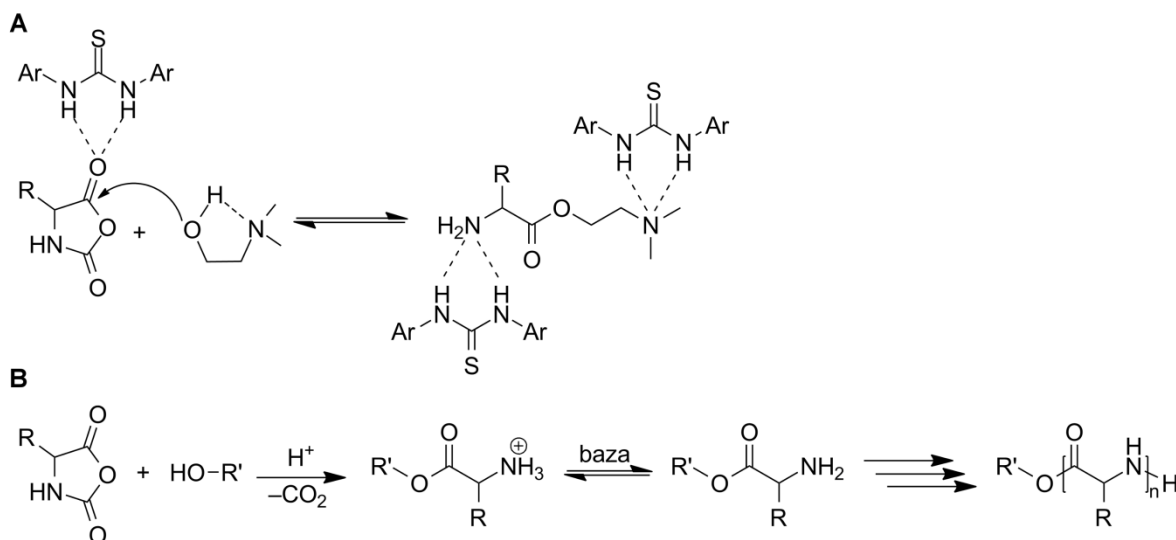
V večji meri so sintetični polipeptidi pripravljeni po normalnem aminskem mehanizmu (angl. *normal amine mechanism*, NAM). Po tem mehanizmu lahko polimerizirajo tako *N*-nesubstituirani kot *N*-substituirani NCA-monomeri. Reakcijo sproži neionski nukleofil z mobilnim vodikovim atomom. Običajno je to primarni amin, lahko pa tudi sekundarni amin, alkohol ali voda, ki napade obroč na C-5 mestu. Pri tem se obroč odpre in nastane nestabilna karbaminska kislina, ki dekarboksilira (slika 2-19A). Po dekarboksilaciji nastane nova aminska skupina, ki nato deluje kot propagirajoča zvrst z napadom na naslednjo molekulo NCA (slika 2-19B). V primeru primarnih aminov je iniciacija hitrejša od propagacije, saj je aminska skupina primarnega amina bolj nukleofilna od končne aminske skupine rastoče verige, kar omogoča dobro kontrolo nad molsko maso polipeptida in disperznostjo. Iz tega razloga je številčno povprečje molske mase makromolekul odvisno od molskega razmerja med monomerom in iniciatorjem.^{43,48,49}



Slika 2-19: NAM-mehanizem ROP NCA: iniciacija (A) in propagacija (B).

Med polimerizacijo lahko pride do stranskih reakcij kot posledica prisotnosti vode in nečistoč v monomeru, topilu in/ali aminu.^{41,48,49} Živi polimerizaciji se najbolj približamo z vodenjem polimerizacije pod visokim vakuumom,⁵⁷ kjer lahkolapne spojine destiliramo neposredno v reakcijsko zmes, poleg tega pa konstantno odstranjujemo nastali CO₂ pri reakciji in tako pomikamo reakcijo v smer dekarboksilacije karbaminske kisline. Obseg stranskih reakcij med ROP NCA-monomerov s primarnimi amini lahko zmanjšamo tudi z izvedbo polimerizacije pri nizki temperaturi.⁵¹ Aktivacijska energija za propagacijo verig je pri nizkih temperaturah nižja od aktivacijske energije stranskih reakcij, zato ostane večina verig živih.⁴⁹ Po drugi strani je slabost vodenja polimerizacije pri nizki temperaturi v tem, da je čas polimerizacije daljši in lahko traja več dni, da verige dosežejo končno molsko maso.⁴¹

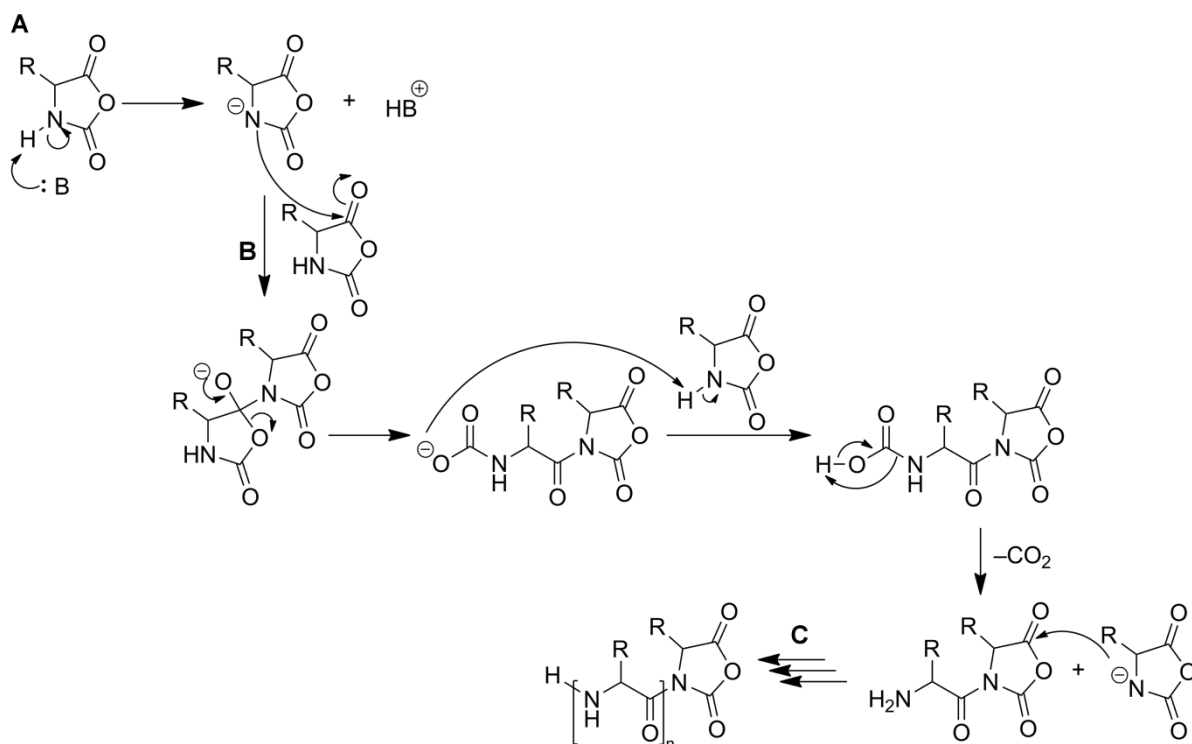
Nukleofili, kot so alkoholi, lahko prav tako sprožijo iniciacijo ROP NCA, vendar je le-ta v primerjavi s propagacijo prepočasna, da bi nastali dobro definirani produkti. Hidroksilna skupina je namreč slabši nukleofil od aminske skupine, ki nastane po dekarboksilaciji NCA. Eden izmed pristopov, ki omogoča uporabo alkohola kot iniciatorja za kontrolirano polimerizacijo *N*-substituiranih NCA, predstavlja uporabo močne baze kot katalizatorja, ki izboljša nukleofilnost alkohola. Ker močna baza lahko obenem deprotonira mesto N-3 NCA-monomera, je ta pristop uporaben le v primeru polimerizacije *N*-substituiranih NCA.⁵⁸ Po drugi strani pa je možno izboljšati tudi elektrofilni značaj NCA na mestu C-5, npr. z uporabo organokatalizatorja na osnovi tiosečnine^{59,60} ali fluoriranega alkohola.⁵⁹ *N,N'*-Bis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiosečnina tvori vodikove vezi, s čimer aktivira NCA-monomer in obenem deaktivira končno aminske skupine polimera, toda iniciacija deluje le v kombinaciji z aminoalkoholi (slika 2-20A).^{59,60} Na podoben način s tvorbo vodikovih vezi deluje tudi fluoriran alkohol, 1,3-bis(2-hidroksiheksafluoroizopropil) benzen.⁶⁰ Kontrolirano polimerizacijo NCA z alkoholi kot iniciatorji omogoča uporaba kislinkega katalizatorja.⁶¹ Le-ta aktivira NCA-monomer ter s protoniranjem končne aminske skupine na rastoči verigi preprečuje propagacijo. Po končani iniciaciji se propagacijo enostavno sproži z dodatkom baze, ki aktivira amski konec verige (slika 2-20B). Ta pristop omogoča uporabo različnih iniciatorjev s hidroksilno skupino ter sintezo dobro definiranih polipeptidov.



Slika 2-20: Inicijacija ROP NCA z alkoholom kot nukleofilom, katalizirana s tvorbo vodikovih vezi tiosečninskega organokatalizatorja (A)⁵⁹ in z uporabo kislinskega katalizatorja (B).⁶¹

2.3.2.2 Mehanizem aktiviranega monomera (AMM)

Kadar NCA-monomeri reagirajo z močno, aprotično bazo, kot so npr. terciarni amini, poteče polimerizacija po mehanizmu z aktiviranim monomerom (angl. *activated monomer mechanism*, AMM). Za razliko od NAM deluje baza zgolj kot katalizator, ki odvzame vodik z NCA na mestu N-3, in se ne vključuje v rastočo verigo (slika 2-21A). NCA mora na mestu N-3 vsebovati vodik, zato je ta mehanizem mogoč le pri *N*-nesubstituiranih NCA-monomerih.⁴⁸ Inicijator je nastali anion (aktiviran monomer), ki je nukleofil in napade novo molekulo NCA na mestu C-5 (slika 2-21B). Obroč dimera se odpre in odvzame proton novi molekuli NCA (nastane NCA-anion) ter dekarboksilira. Propagacija poteka z vnovičnim napadom aniona na rastočo verigo, pri čemer z vsakim dodanim monomerom nastane nov anion (slika 2-21C). V tem primeru je propagacija hitrejša od iniciacije, kar onemogoča nadzor nad polimerizacijo. Posledično so polipeptidi, sintetizirani z mehanizmom AMM, manj definirani ter izkazujejo visoko molsko maso in široko porazdelitev molske mase.⁴⁹

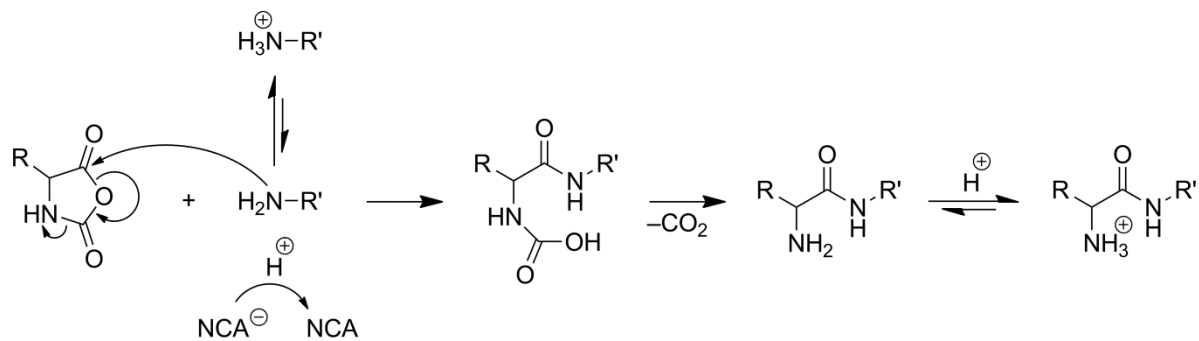


Slika 2-21: Mehanizem ROP NCA-monomerov z aktiviranim monomerom: prediniciacija (A), iniciacija (B) in propagacija (C).

Čprav AMM ne omogoča priprave dobro definiranih polipeptidov, je prednost tega mehanizma predvsem v hitri polimerizaciji. Ta se je izkazala za pomembno, kadar želimo prehiteti stranske reakcije, npr. z vodo.⁵³ Obenem je kontrola nad molsko maso makromolekul manj pomembna v zamreženih sistemih.⁶²

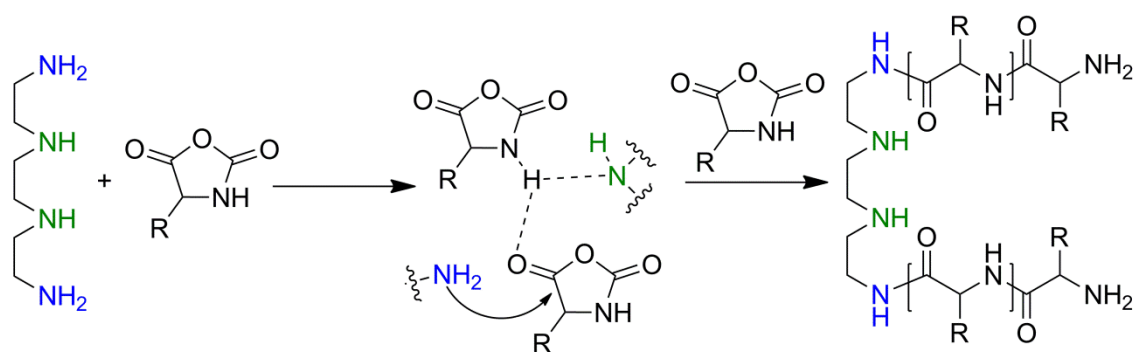
2.3.2.3 Soli primarnih aminov

Nukleofili, ki se uporabljajo kot iniciatorji za ROP NCA-monomerov po mehanizmu NAM, lahko delujejo tudi kot baza. Zato je možna polimerizacija po obeh mehanizmih, NAM in AMM, hkrati. Do polimerizacije po vzporednih mehanizmih pride predvsem pri uporabi sterično oviranih sekundarnih aminov. V manjšem obsegu lahko NCA-monomeri polimerizirajo po mehanizmu AMM tudi pri uporabi primarnih aminov kot iniciatorjev. Da bi se temu izognili, so razvili postopek ROP z uporabo soli primarnih aminov. Dodatni protoni namreč porinejo ravnotežje v prid protoniranim NCA-monomerov. Soli primarnih aminov niso aktivne za iniciacijo ali propagacijo, zato je potrebno polimerizacijo izvajati pri višjih temperaturah, ki omogočajo disociacijo amskih soli, kar je dovolj, da prosta aminska skupina sproži polimerizacijo (slika 2-22).⁶³ Uporaba soli primarnih aminov omogoča sintezo bolj definiranih, manj disperznih polipeptidov kot uporaba samega amina, kar so pokazali na primeru ROP NCA-monomerov s hidrokloridom ($-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$) makromolekularnega iniciatorja s končno primarno amsko skupino.^{49,63} Kloridni anioni lahko delujejo kot nukleofili in sprožijo iniciacijo polimerizacije NCA, zato so uporabo soli primarnih aminov s hidrokloridov razširili na manj nukleofilne tetrafluoroborate ($-\text{NH}_3^+\text{BF}_4^-$).⁶⁴ Podoben učinek kot dvig temperature pri solih primarnih aminov ima dodatek terciarnega amina, ki ravnotežno reakcijo favorizira v smer deprotonacije primarnih aminov.⁶⁵


 Slika 2-22: Inicijacija ROP NCA z uporabo soli primarnih aminov.⁶³

2.3.2.4 Pospešenaminski mehanizem z aktivacijo monomera (AAMMA)

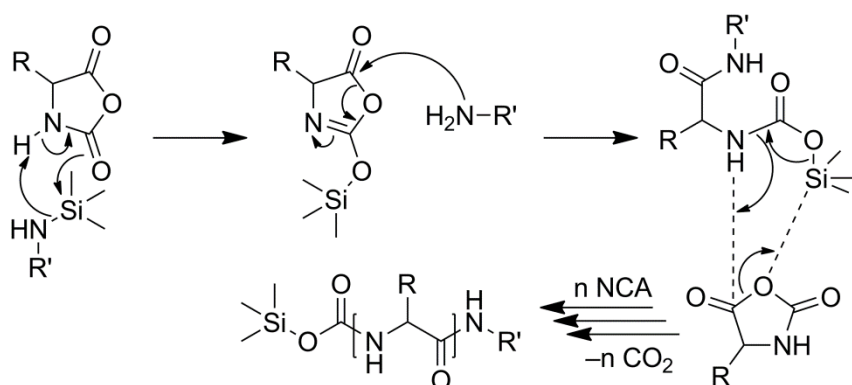
Hadjichristidis in sodelavci so razvili nov iniciacijski sistem, ki združuje primarni amin s sekundarnim⁶⁶ ali terciarnim,⁶⁷ in ga poimenovali pospešenaminski mehanizem z aktivacijo monomera (angl. *accelerated amine mechanism by monomer activation*, AAMMA). Inicijator, npr. trietilentetramin ali trietilamintriamin, je zasnovan tako, da so primarne aminske skupine pripete na osrednji del molekule, ki vsebuje vsaj en sekundarni oz. terciarni amin. Primarni amini omogočajo kontrolirano polimerizacijo, značilno za NAM, medtem ko sterično oviran sekundarni oz. terciarni amin ne odcepi protona kot pri AMM, temveč NCA-monomer zgolj aktivira s tvorbo vodikovih vezi ter s tem pospeši reakcijo (slika 2-23).⁶⁷


 Slika 2-23: Shematski prikaz ROP NCA po AAMMA s primarnim in sekundarnim aminom.²⁷

2.3.2.5 Silazani

Poseben primer uporabe sekundarnih aminov predstavlja uporaba silazanov, ki polimerizacije ne sprožijo po AMM, temveč gre za svojevrsten mehanizem. Silazan deprotonira NCA na mestu N-3, tako kot večina sekundarnih aminov na začetku AMM. Trimetilsililna (TMS) skupina se nato prenese na NCA na mesto C-2 in tvori intermediat. Tega napade nastali amin na mestu C-5 in tvori TMS-karbamat. Nadalje poteka propagacija s prenosom TMS iz karbamata na monomer, pri čemer nastane nov TMS-karbamat (slika 2-24).⁴⁹ Mehanizem ROP NCA z uporabo silazana so prvič pokazali na primeru heksametilidisilazana, s katerim so pripravili polipeptid visoke molske mase in nizke disperznosti.⁶⁸ Kontrolirana polimerizacija poteče tudi z uporabo funkcionaliziranih silazanov, ki omogočajo vnos različnih funkcionalnih skupin na C-konec polipeptida.⁶⁹ Na podoben način deluje tudi trimetilsilil fenilsulfid (PhS-TMS), ki omogoča še hitrejšo iniciacijo in boljšo kontrolo nad molsko maso produkta.⁷⁰ Da bi polimerizacijo po tem mehanizmu še

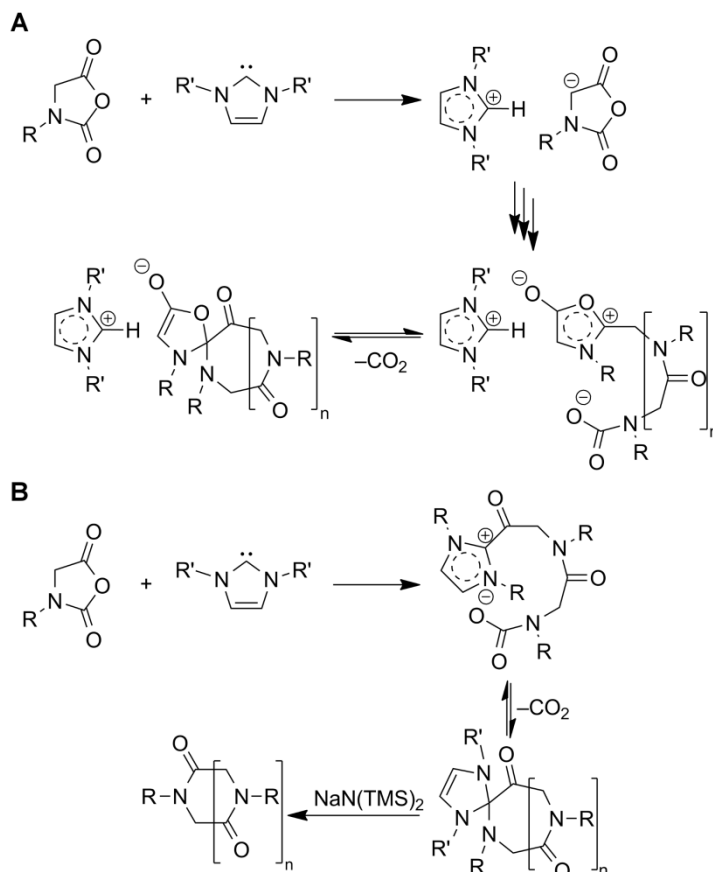
pospešili, so uporabili »mehkejšo« Lewisovo kislino, trimetil kositrov fenil sulfid (PhS-SnMe₃), ki tvori reaktivnejšo končno skupino.⁷¹



Slika 2-24: Mehanizem ROP NCA z uporabo silazanov.⁶⁹

2.3.2.6 N-Heterociklični karbeni (NHC)

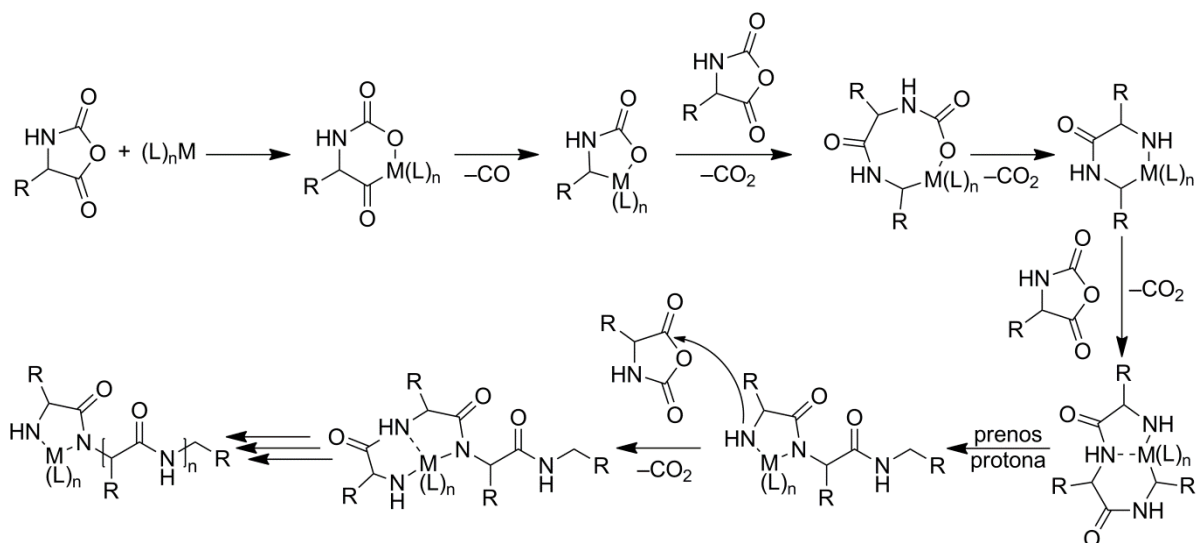
Kot primerni iniciatorji za ROP *N*-substituiranih NCA-monomerov so se izkazali *N*-heterociklični karbeni (NHC) na osnovi imidazola. Karbeni so dobri nukleofili, a so tudi zelo bazični, zato NCA-monomer zlahka deprotonirajo na N-3, pa tudi na C-4-mestu. Iz tega razloga jih uporabljamo le za polimerizacijo *N*-substituiranih NCA.⁴⁸ Mehanizem polimerizacije lahko poteka z deprotonacijo *N*-substituiranega NCA-monomera na mestu C-4 (slika 2-25A)⁷² ali z nukleofilnim napadom in odprtjem obroča *N*-substituiranega NCA (slika 2-25B).⁷³ V obeh primerih poteka propagacija preko zwitterionske ciklične strukture. Produkti so ciklični polipeptoidi. Linearne polipeptoide dobimo, če ROP z NHC poteka v prisotnosti primarnega aminskega iniciatorja.⁷⁴



Slika 2-25: ROP NCA z uporabo *N*-heterocikličnih karbenov. Mehanizem z deprotonacijo *N*-substituiranega NCA na mestu C-4 (A)⁷² in mehanizem z nukleofilnim napadom in odprtjem obroča *N*-substituiranega NCA (B).⁷³

2.3.2.7 Kompleksi kovin prehoda

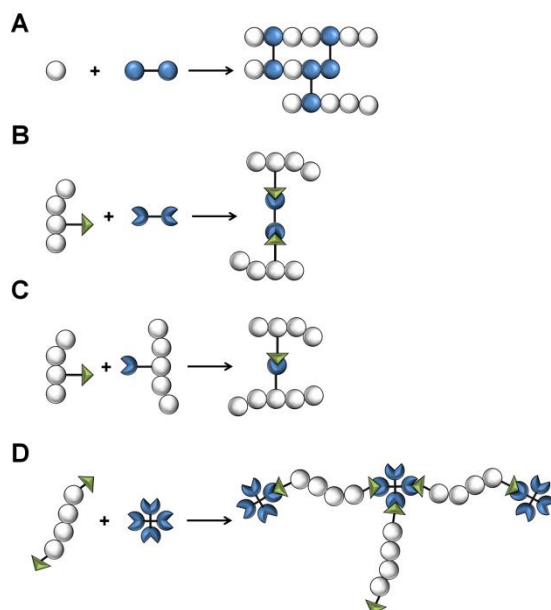
Da bi se izognili neželenim stranskim reakcijam, ki lahko spremljajo ROP pri uporabi nukleofilnih iniciatorjev, so razvili sintezno metodo z uporabo kovin prehoda.⁴¹ Začetne študije ROP NCA so se osredotočale na nikljeve komplekse,⁷⁵ enako učinkoviti pa so tudi kobaltovi in železovi kompleksi.⁷⁶ V prvem koraku poteče oksidativna adicija kovine na anhidridno skupino NCA-monomera. Sledi izstop CO in nato reakcija z novo molekulo NCA, pri čemer izstopi CO₂ in nastane t.i. amido-alkil metalacikel. Le-ta reagira z naslednjim NCA-monomerom in tvori nov, večji metalacikel. Pri tem pride do prenosa protona na dušika, kar vodi v nastanek amido-amidat kompleksa, ki predstavlja aktivno zvrst polimerizacije. Propagacija poteka z nukleofilnim napadom amido skupine na C-5-mesto NCA, kateremu znova sledi prenos protona. Veriga raste tako, da se kovina prestavlja na novo dodan NCA, medtem ko je kelirana na aktivnem koncu (slika 2-26). Metoda omogoča pripravo polipeptidov z visoko molsko maso in ozko disperznostjo iz različnih NCA-monomerov, primerna pa je tudi za pripravo blok kopolimerov. Poleg kompleksov na osnovi niklja, kobalta in železa so se kot učinkoviti iniciatorji izkazali tudi kompleksi na osnovi drugih kovin prehoda, npr. platine, ki pa polimerizacijo sprožijo po nekoliko drugačnem mehanizmu.⁷⁷



Slika 2-26: Mehanizem ROP NCA z uporabo kovin prehoda.⁴¹

2.4 Zamreženi poliestri in polipeptidi

ROP omogoča pripravo dobro definiranih polimerov, pri čemer gre običajno za linearne makromolekule. Z ROP lahko pripravimo tudi drugačne makromolekule arhitekture, npr. zvezde, graftirane polimere in mreže. Zamreženi polimeri so v primerjavi z linearnimi obstojnejši, saj se v topilih ne raztapljajo. Mrežo lahko tvorimo med samo polimerizacijo, pri čemer gre za kopolimerizacijo monomera z dvofunkcionalnim zamreževalcem. Popolimerizacijsko zamreževanje polimera preko stranskih funkcionalnih skupin izvedemo z uporabo nizkomolekularnega zamreževalca ali med različnimi funkcionaliziranimi polimeri. Iz polimerov, ki nimajo stranskih funkcionalnih skupin, pa pripravimo makromonomere, tako da funkcionaliziramo konce verig in jih zamrežimo preko končnih skupin (slika 2-27).

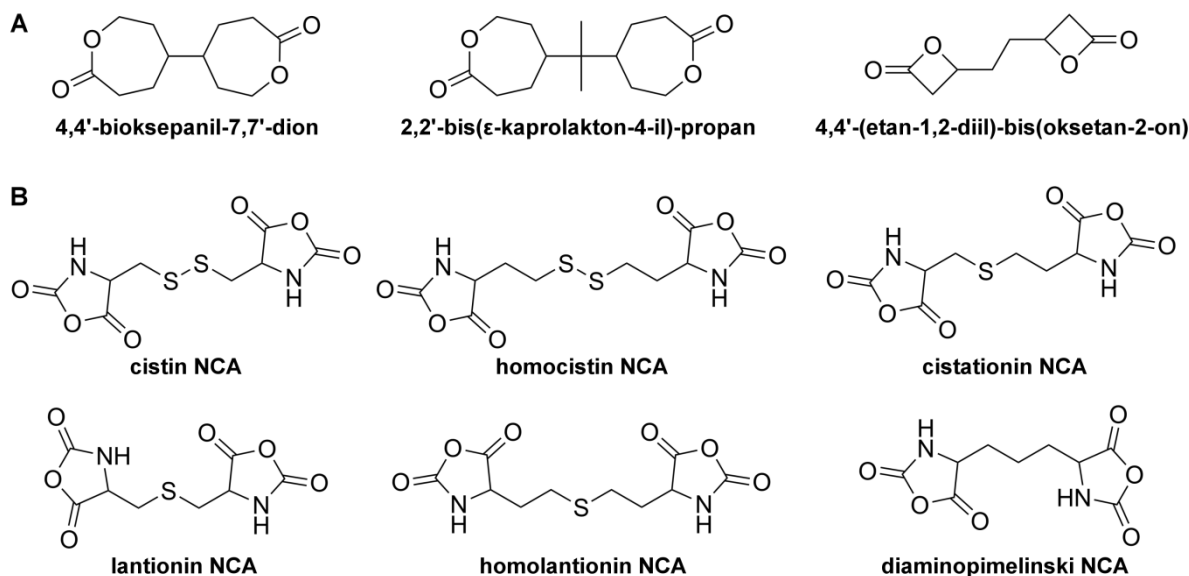


Slika 2-27: Shematski prikaz različnih pristopov zamreževanja polimerov: kopolimerizacija z dvofunkcionalnim zamreževalcem (A), popolimerizacijsko zamreževanje funkcionaliziranega

polimera (B), popolimerizacijsko zamreževanje preko različno funkcionaliziranih polimerov (C), uporaba makromonoma in nizkomolekularnega zamreževalca (D).

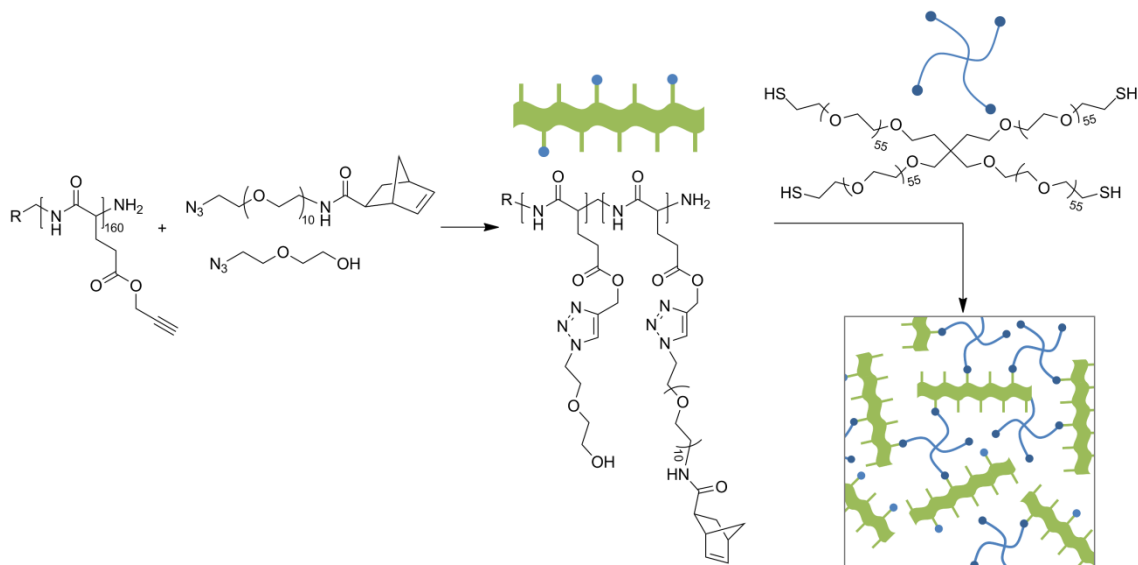
Zamreževanje lahko poteka že med samo polimerizacijo s kopolimerizacijo z dvofunkcionalnim zamreževalcem (slika 2-27A). Zamreževalec mora biti kemijsko podoben monomeru, da z njim kopolimerizira. Pri tem je pomembna tudi hitrost polimerizacije – za enakomerno premreženje morata monomer in zamreževalec izkazovati podobno reaktivnost. V primeru poliestrov, pripravljenih z ROP, dobimo zamreženo strukturo s kopolimerizacijo laktonov in bis-laktonov, kot so npr. 2,2-bis(ϵ -kaprolakton-4-il)-propan,⁷⁸⁻⁸¹ 4,4'-bioksepanil-7,7'-dion (BOD)^{82,83} in 4,4'-(etan-1,2-diil)bis(oksetan-2-on)⁸⁴ (slika 2-28A). Zamrežena struktura vpliva na lastnosti poliestrov, saj delno onemogoči zlaganje verig, zaradi česar je stopnja kristaliničnosti manjša od poliestra linearne arhitekture, kar posledično vpliva tudi na hitrost razgradnje.⁹

Kot zamreževalci za polipeptide so v uporabi difunkcionalni NCA-monomeri, pripravljene iz diaminokislin (slika 2-28B). Pogosto uporabljamo cistin NCA-monomer, ki izvira iz oksidirane oblike standardne aminokislone cisteina.⁸⁵ Raftery in sodelavci⁶² so nabor NCA-zamreževalcev razširili in pripravili gele na osnovi *terc*-butil-L-glutamata. Poleg cistin NCA-zamreževalca so uporabili homocistin, lantionin, cistationin in homolantionin NCA-monomerne zamreževalce. Gele so nato odščitili z odstranitvijo *terc*-butil zaščitne skupine, da so pripravili hidrogele. Mehanske lastnosti le-teh so bile odvisne od količine in vrste zamreževalca. Z višanjem deleža zamreževalca z 1 mol % na 5 mol % so hidrogeli postali trši; najtrši je bil v primeru cistationina, medtem ko je cistin pri enaki uporabljeni količini tvoril najmehkejše hidrogele. Hidrogeli, zamreženi s cistinom in homocistinom, ki v strukturi vsebujeta disulfidno vez, so bili dovzetni za degradacijo z redukcijo, medtem ko so ostali zamreževalci, ki v strukturi vsebujejo tioetrsko skupino, pri enakih pogojih ostali obstojni. Murphy in sodelavci⁸⁶ so pripravili NCA-zamreževalec iz diaminopimelinske kisline (DAP). Gele so pripravili s simultano kopolimerizacijo DAP NCA in N_{ϵ} -karbobenziloksi-L-lizin (ZLL) NCA-monomerov ter s sekvenčno polimerizacijo DAP NCA-monomera ob uporabi poli(N_{ϵ} -karbobenziloksi-L-lizin) (PZLL) ali polisarkozin makroiniciatorja. Po odščiti je najboljša mehanske lastnosti izkazoval gel iz blok kopolimera s poli(L-lizinom).



Slika 2-28: Dvofunkcionalni laktonski zamreževalci za poliestre (A) in dvofunkcionalni NCA-monomeri kot zamreževalci za polipeptide (B).

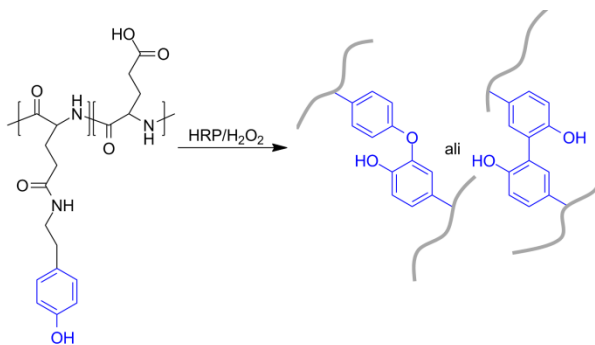
Polipeptidi lahko v strukturi vsebujejo stranske funkcionalne skupine, ki omogočajo popolimerizacijsko zamreževanje (slika 2-27B). Zamreževalci, ki povežejo polipeptidne verige v mrežo, so lahko različne vrste. Strudenovská in sodelavci^{87,88} so modificirane polipeptidne verige zamrežili s prosto radikalsko polimerizacijo. Najprej so pripravili polipeptid PBLG-*ko*-poli(L-alanin)-*ko*-poli(ε-ftaloil-L-lizin). Z 2-aminoetanolom so odščitili lizin in amidirali glutamat, na prosto stransko aminsko skupino lizina pa vezali metakrilno skupino. Metakrilne skupine so uporabili za kopolimerizacijo z 2-hidroksietil metakrilatom (HEMA). Rastoča poli(hidroksietil metakrilat) (poliHEMA) veriga se je povezala z metakrilatno skupino druge polipeptidne verige in tako vzpostavila polimerno mrežo. Podobno so Sedlačik in sodelavci¹⁹ s prosto radikalsko polimerizacijo zamrežili poli(L-glutamat), na katerega so preko 2-aminoetanela vezali metakrilno skupino. Na ta način so v material vključili do 20 % akrilatnega polimera, kar ima lahko, predvsem v biomedicinskih aplikacijah, negativne učinke. Ahrens in sodelavci^{89,90} so namesto proste radikalske polimerizacije uporabili tiol-en klik reakcijo. Polipeptid so modificirali z dvojnimi vezmi v obliki norbornena. V ta namen so izkoristili proste karboksilne skupine glutamata in jih zaestrili s propargil alkoholom, da so uvedli reaktivno trojno vez. Nanjo so z alkin-azid cikloadicijo vezali azid-PEG₁₀-norbornen, ki je predstavljal vir dvojnih vezi. Polipeptid so zamrežili s tetratiolom na osnovi štirikrakega PEG-polimera, da so pripravili polipeptid-PEG hidrogel (slika 2-29). Yan in sodelavci⁹¹ pa so zamreževalca za polipeptid pripravili iz naravnega polimera, alginata. Poli(L-glutaminsko kislino) (PLGA) so modificirali z adipin-dihidrazidom, da so v strukturo uvedli hidrazidne skupine, le-te pa so v naslednji stopnji reagirali z aldehidnimi skupinami modificiranega alginata.



Slika 2-29: Primer popolimerizacijskega zamreževanja polipeptida s tiol-en klik reakcijo.^{89,90}

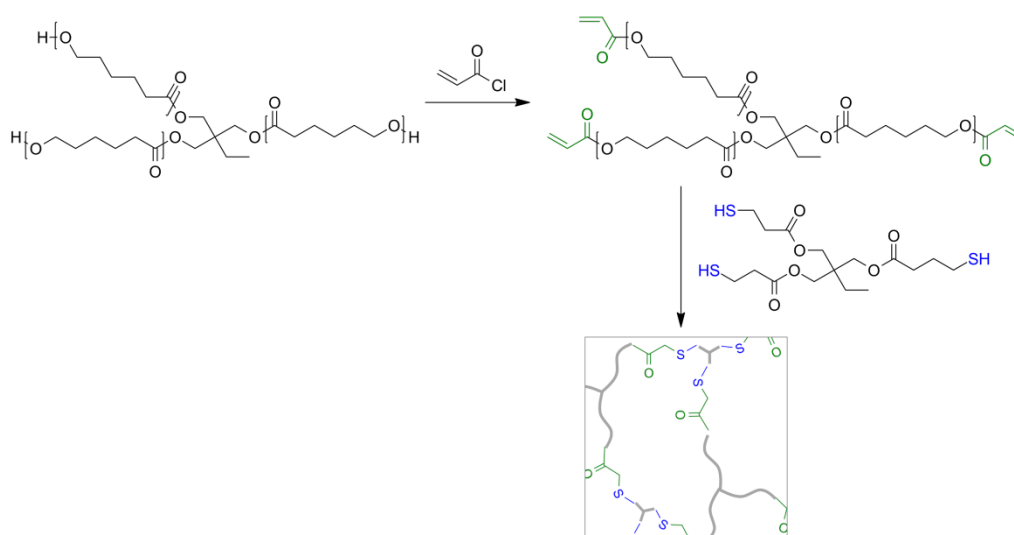
Za razliko od omenjenih primerov so Vacogne in sodelavci⁹² za zamreževanje uporabili nizkomolekularni zamreževalec. γ -Benzil-L-glutamat (BLG) NCA so kopolimerizirali z alilglicin NCA-monomerom, ki v strukturi vsebuje reaktivno dvojno vez. Na dvojne vezi so fotokemijsko vezali dvofunkcionalni nonanditiol, ki je med sabo povezal polipeptidne verige. Tudi Shirbin in sodelavci²⁰ so pripravili zamrežen polipeptid z nizkomolekularnim zamreževalcem, in sicer glutaraldehidom. Ta je reagiral s stranskimi aminskimi skupinami lizinskega bloka odščitenege poli(L-lizin)-*b*-poli(D,L-valina).

Popolimerizacijsko zamreževanje je možno tudi neposredno med polipeptidnimi verigami, brez uporabe nizkomolekularnega zamreževalca (slika 2-27C). Shirbin in sodelavci²¹ so pripravili kopolimer PLGA-*ko*-poli(L-lizin) in zamreževanje sprožili z reakcijo amidacije med aktiviranimi karboksilnimi stranskimi skupinami glutaminske kisline in aminskimi stranskimi skupinami lizina. V več delih so polipeptide zamreževali preko fenolnih obročev z encimsko katalizirano reakcijo z vodikovim peroksidom. Fenol so uvedli na PLGA z amidacijo s tiraminom⁹³⁻⁹⁵ (slika 2-30) ali z alkin-azid adicijo 3-(4-hidroksifenil)-*N*-(3-azidopropil) propanamida na poli(γ -propargil-L-glutamat) (PPLG).⁹⁶ Tak pristop zamreževanja je biološko združljiv in lahko poteka v živih tkivih, stopnjo zamreženja pa prilagajamo s količino peroksida in encima.



Slika 2-30: Primer neposrednega popolimerizacijskega zamreževanja polipeptidnih verig.⁹⁴

Tovrstni način zamreževanja je na poliestrih zaradi pomanjkanja funkcionalnih skupin možen zgolj s tvorbo radikalov.⁹⁷ Več nadzora nad zamreženjem nudi uporaba funkcionaliziranih poliestrskih makroiniciatorjev (slika 2-27D).³⁵ Nefunkcionaliziran PCL ima končne hidroksilne skupine, ki lahko reagirajo z diizocianati. Na ta način so zamrežili trikraki PCL-triol s heksametilen diizocianatom in tvorili PCL-poliuretansko mrežo.^{26,27} Busby in sodelavci²³ so PCL-diol funkcionalizirali z akrilol kloridom. Nastali PCL-akrilatni makromonomer, ki je deloval kot zamreževalec, so kopolimerizirali z metil metakrilatom (MMA) ali stirenom. Lumelsky in sodelavci^{24,25,98} so raziskali kopolimerizacijo PCL-akrilatnega makromonomera še z drugimi akrilatnimi monomeri, kot so stiren,^{24,25} divinilbenzen,^{25,98} *t*-butil akrilat⁹⁸ in 2-etilheksil akrilat.²⁴ Na ta način je večino materiala predstavljal akrilatni polimer in ne PCL. Johnson in sodelavci²⁸ so z akrilol kloridom funkcionalizirali trikraki PCL in ga zamrežili s tiol-en klik reakcijo z nizkomolekularnim tritriolom (slika 2-31). Dikici in sodelavci⁹⁹ pa so pripravili štirikraki PCL in ga funkcionalizirali z metakrilnim anhidridom ter ga fotokemijsko zamrežili brez dodatka komonomerov.



Slika 2-31: Primer zamreževanja makromonomera.²⁸

2.4.1 Oblikovni spomin

Posebnost zamreženih semi-kristaliničnih poliestrov je v tem, da izkazujejo oblikovni spomin (angl. *shape memory effect*). Gre za pojav, kjer polimer (slika 2-32A) nad temperaturo prehoda (slika 2-32B), v tem primeru tališča, oblikujemo v začasno obliko (angl. *temporary shape*) (slika 2-32C). Polimer se pri tem namreč zmežča, a ohrani mehansko obstojnost. Začasno obliko pod obremenitvijo ohladimo, da staljeni deli med ohlajanjem kristalizirajo in s tem fiksirajo začasno obliko, ki se ohrani tudi, ko obremenitev odstranimo (slika 2-32Č).¹¹ Uspešnost fiksacije začasne oblike (angl. *shape fixity*) ovrednotimo po enačbi 2.1:

$$R_f (\%) = 100 \cdot \frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1} \quad (2.1)$$

kjer je:

R_f faktor fiksacije (%),

ε_1 deformacija obremenjenega vzorca po ohlajanju (%),

ϵ_2 deformacija vzorca po ohlajanju in odstranitvi bremena (%).

Ko material v začasni obliki znova segrejemo nad temperaturo tališča, se kristalizirani deli stalijo in kovalentna mreža povrne material v prvotno, trajno obliko (angl. *permanent shape*) (slika 2-32D). Uspešnost povrnitve v trajno obliko (angl. *shape recovery*) določimo po enačbi 2.2:

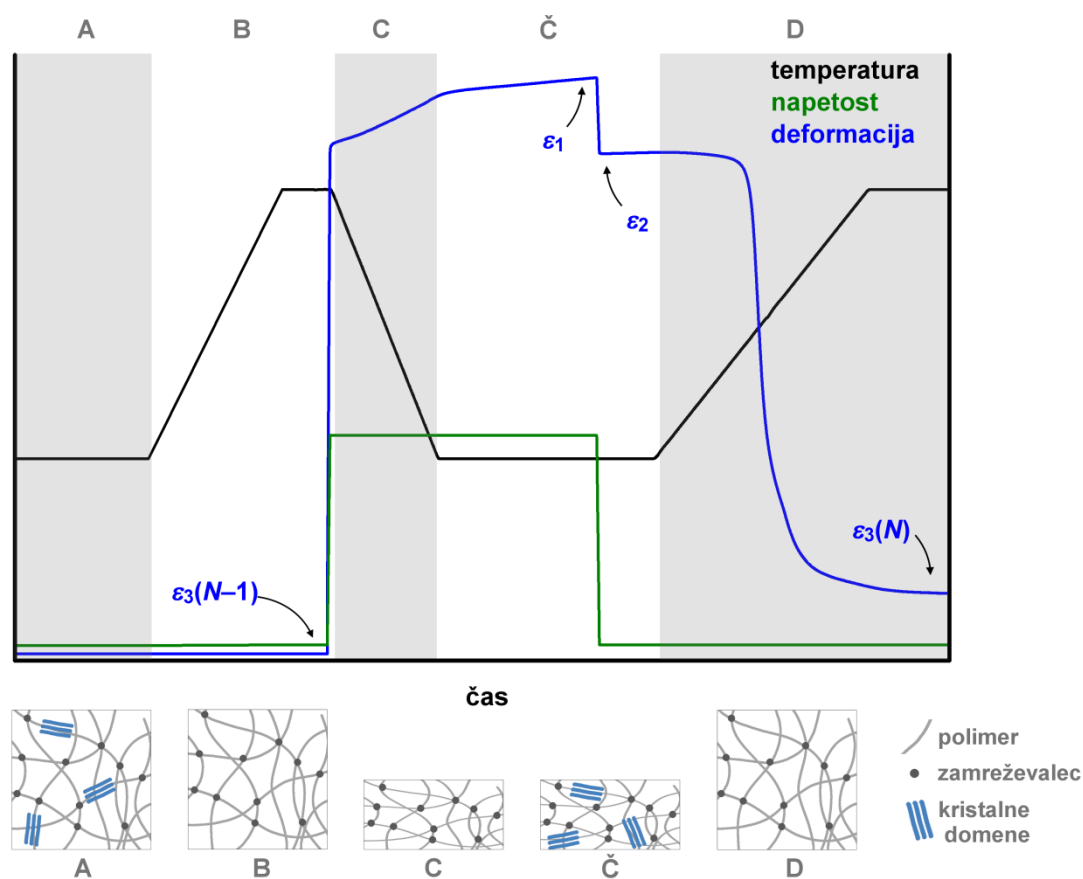
$$R_r (\%) = 100 \cdot \frac{\epsilon_1 - \epsilon_3(N)}{\epsilon_1 - \epsilon_3(N-1)} \quad (2.2)$$

kjer je:

R_r faktor povrnitve (%),

$\epsilon_3(i)$ in $\epsilon_3(N-1)$ končni deformaciji vzorca nad temperaturo tališča dveh zaporednih ciklov.

Za $N = 1$ velja $\epsilon_3(N) = 0$. Za celokupno povrnitev velja $\epsilon_3(N-1) = 0$.



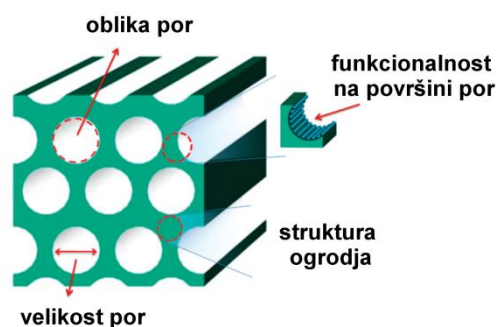
Slika 2-32: Potek enega cikla oblikovnega spomina. Semi-kristalinični polimer (A) segrejemo nad temperaturo tališča in stalimo kristalinične domene (B). Nato ga stisnemo (C) in ohladimo, da kristalizira (Č). Silo odstranimo, pri čemer polimer obdrži začasno obliko. Ko material segrejemo, se povrne v prvotno obliko (D).

Cikle oblikovnega spomina lahko večkrat ponovimo. V prvem ciklu je povrnitev oblike običajno slabša, kar je verjetno posledica reorganizacije molekul in je odvisna od zgodovine materiala, tj. procesiranja in hrambe.¹⁰⁰ Za enosmerni oblikovni spomin (angl. *one-way shape memory*) je značilno, da je vsakič potreben zunanji dražljaj (sila) za vzpostavitev oblike. Če za oblikovni spomin zadostuje sprememba temperature, brez potrebe po vzpostavljanju in odstavljanju sile, gre za dvosmerni oblikovni spomin (angl. *two-way shape memory*).

Polimere z oblikovnim spominom uporabljamo za temperaturne senzorje, tekstil, aeronavtiko¹¹ in biomedicinske aplikacije.¹⁰¹ Dobro raziskan poliester z oblikovnim spominom je PCL.^{102–104} Njegov oblikovni spomin lahko prilagajamo s kemijsko sestavo, molekulsko maso oz. stopnjo zamreženosti, ki vplivajo na temperaturo prehoda med prvotno in začasno obliko.^{105,106} PCL je pogosto je pripravljen v porozni obliki, saj je kot pena dobro stisljiv.^{105–117} To med drugim omogoča manj invazivne operativne posege, material pa lahko zapolni prostor nepravilnih oblik.¹¹⁸

2.5 Porozni polimeri na osnovi poliestrov in polipeptidov

Poliestri in polipeptidi so kot biorazgradljivi in biološko združljivi materiali uporabni kot nosilci za celične kulture in tkivno inženirstvo. Poleg ustrezne kemijske sestave, ki omogoča pričvrstitev, proliferacijo in diferenciacijo celic, ter mehanskih lastnosti, ki so primerljive tarčnim tkivom, je izrednega pomena porozna morfologija polimernega ogrodja.^{8,119} Strukturne značilnosti poroznih materialov so poroznost, oblika por, velikost in porazdelitev velikosti por ter funkcionalnost na površini por (slika 2-33).²



Slika 2-33: Strukturne značilnosti poroznega materiala.²

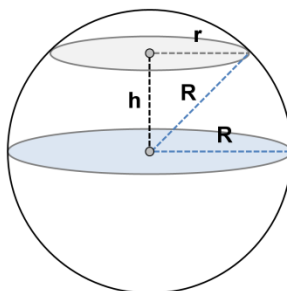
Poroznost je definirana kot odstotek praznin v materialu in jo določimo gravimetrično po enačbi 2.3:^{68,69}

$$\Phi(\%) = \left(1 - \frac{\rho(\text{ogrodje})}{\rho(\text{material})}\right) \cdot 100 \quad (2.3)$$

kjer je:

- Φ poroznost (%),
- $\rho(\text{ogrodje})$ navidezna gostota poroznega ogrodja, določena iz mase in volumna (g cm^{-3}),
- $\rho(\text{material})$ gostota neporoznega polimera (g cm^{-3}).

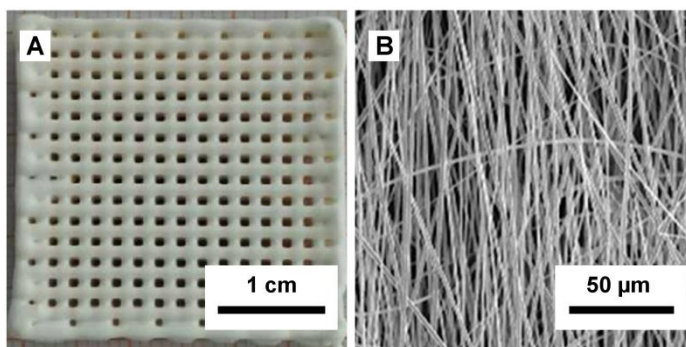
Obliko in velikost por določimo z vrstično elektronsko mikroskopijo (angl. *scanning electron microscopy*, SEM).^{119,120} Pri tem je potrebno upoštevati, da prerez, ki ga opazujemo, ne predstavlja prave širine pore. V primeru sferičnih por namesto dejanskega polmera (R) opazujemo polmer (r), ki je na naključni globini pore (h) (slika 2-34). Globina pore lahko znaša od 0 do R , kar da povprečno vrednost $h = R/2$. Če le-to vstavimo v zvezo $R^2 = h^2 + r^2$, dobimo $R = 2r/\sqrt{3}$. Vrednost $2/\sqrt{3}$ uporabimo kot statistični korekcijski faktor, s katerim pomnožimo izmerjene velikosti por.¹²¹



Slika 2-34: Prikaz izvora statističnega korekcijskega faktorja, ki upošteva, da namesto dejanskega polmera (R) opazujemo polmer (r) na naključni globini pore (h).

Da je porozen material uporaben kot nosilec za celične kulture in v tkivnem inženirstvu, mora omogočati pričvrstitev in rast celic po celotnem materialu, pore pa morajo biti medsebojno povezane, da omogočajo prenos hranil in odvajanje metabolnih izločkov.^{8,119} Velikost por je za celice bistvenega pomena, saj vpliva na njihovo pričvrstitev, širjenje po materialu, proliferacijo in diferenciacijo.¹²² Te lastnosti so odvisne od vrste poroznosti.¹¹⁹

Znana so ogrodja na osnovi PCL, pripravljena s tridimenzionalnim tiskanjem (slika 2-35A), ki omogoča dobro kontrolo nad porozno morfologijo,¹²³ a je pristop omejen na pore velikosti nekaj 100 μm , postopek pa je drag in počasen. Pogosteje se uporablja tehnika predenja iz raztopine, s čimer dobimo nespletene vlaknaste mreže s porami velikostnega reda 10 μm (slika 2-35B).¹⁰ Vlaknasti nosilci na osnovi PCL so že dobro raziskani, a ima PCL pomanjkljivost, saj je hidrofoben in brez funkcionalnih skupin na površini. Kot boljša alternativa poliestrom so se za uporabo v tkivnem inženirstvu izkazali sintetični polipeptidi, pripravljene iz NCA-monomerov. Lin in sodelavci¹³ so primerjali morfološko podobne vlaknaste mreže na osnovi PCL poliestra s tistimi na osnovi sintetičnega polipeptida, PBLG-ko-poli(natrijevega L-glutamata). Pokazali so, da se feokromocitomske celice na PCL slabše pričvrstijo in posledično na njem manj rastejo, medtem ko so na polipeptidnih vlaknih uspešno rastle, se diferencirale in tvorile nevrone. S tehniko predenja iz raztopine so pripravili tudi PBLG,¹⁴ ki so ga modificirali z 2-aminoetanolom za izboljšanje hidrofilitnosti in s trojno vezjo (propargilaminom), preko katere so s klik kemijo vezali arginin-glicin-aspartat (RGD) tripeptidno zaporedje. Ustrezni delež vezanega RGD-zaporedja je izboljšal rast hrustančnih celic, tako da se je material izkazal kot potencialno uporaben za tkivno inženirstvo hrustanca.

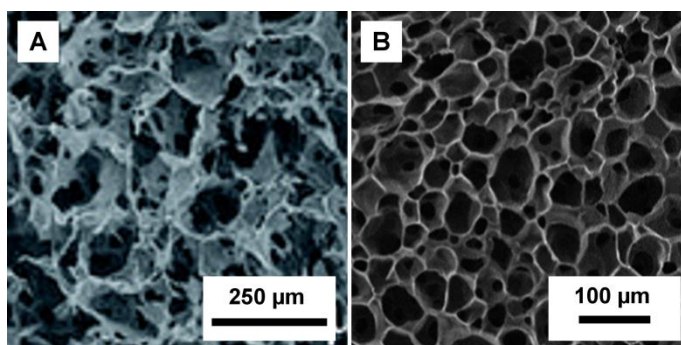


Slika 2-35: Primer poroznih materialov na osnovi PCL, pripravljenega s tridimenzionalnim tiskanjem¹²³ (A) in s predenjem iz raztopine¹³ (B).

ROP NCA-monomerov je pogosta tehnika za pripravo poroznih hidrogelnih ogrodij, ki lahko služijo kot ogrodja za rast celic. Hidrogeli imajo tridimenzionalno mrežno strukturo na osnovi šibkih privlačnih nekovalentnih sil ali kovalentnih vezi. Absorbirajo in zadržijo lahko velike količine vode ter so po strukturi podobni izvenceličnemu matriksu.¹⁵ Hidrogeli na osnovi šibkih privlačnih sil so pogosto pripravljene iz amfifilnih blok kopolimerov polipeptida in biološko združljivega polimera PEG. Amfifilni blok kopolimeri se v vodnih raztopinah samoorganizirajo in pri višji koncentraciji ali temperaturi tvorijo hidrokele. PEG s končno aminsko skupino so uporabili kot makroiniciator za ROP različnih NCA-monomerov in pripravili blok kopolimere, sestavljene iz PEG-bloka in poli(L-valin),¹²⁴ poli(L-alanin),^{125–129} poli(L-lizin)¹²⁹ ali PPLG-bloka.¹³⁰ Trojne vezi PPLG-bloka so izkoristili za nadaljnjo biofunkcionalizacijo, in sicer so s klik reakcijo nanj vezali z azidom modificiran biotin ali galaktozo.¹³⁰ Kopolimeri so se v vodni raztopini samoorganizirali in tvorili hidrokele, ki so omogočali rast celic. Podobno se obnašajo tudi amfifilni polipeptidni kopolimeri, kjer k nastanku gela pripomorejo α -vijačnice ali β -listi določenega peptidnega segmenta. Poli(L-lizin) so kopolimerizirali s poli(L-alaninom), poli(L-leucinom) in poli(L-fenilalaninom).¹⁶ Nastale hidrokele so uporabili za dostavo hidrofobnih spojin, kot sta holesterol in zdravilna učinkovina temozolomid. Spreminjanje kemijske sestave kopolimera je vplivalo na količino absorbirane zdravilne učinkovine in hitrost sproščanja le-te. Hidrogeli s polielektrolitskim blokom, kot sta poli(L-lizin) ali PLGA, niso bili primerni za pričvrstitev in rast celic.¹⁷ Hidrofilni blok so nato pripravili iz racemata glutaminske kisline, na katero so vezali po dve enoti etilen glikola, hidrofoben oz. α -vijačni blok pa so sestavljali L-glutamat, L-leucin in/ali L-alanin.¹⁸ Raztopine so pri segrevanju do 40 °C reverzibilno zaželirale. Nastali hidrogeli so omogočali dostavo tako hidrofobnih kot hidrofilnih učinkovin, obenem pa se število mezenhimskim matičnih celic, sidranih na gele, po enem dnevu ni zmanjšalo. Hidrokele so pripravili tudi s samoorganizacijo molekul po principu gosta in gostitelja (angl. *host-guest chemistry*) med holesterolom in β -ciklodekstrinom, ki so ju vezali na PLGA-*b*-PEG-*b*-PLGA blok kopolimer.¹³¹ Molekule holesterola se vstavijo v notranjost β -ciklodekstrina, kar tvori nekovalentno povezano polimerno mrežo. Ker je vezava reverzibilna, ima hidrogel sposobnost samoobnavljanja (angl. *self-healing*). Nevalentno zamreževanje lahko temelji tudi na elektrostatskem privlaku, kar so izkoristili v primeru PLGA, ki so ga fizikalno zamrežili z naravnim polisaharidom, hitosanom (slika 2-36A).^{132,133} Nastali hidrogel so uspešno uporabili za celjenje hrustančnega tkiva.

Mehansko stabilnejšo alternativo predstavljajo kovalentno zamrežena hidrogelna ogrodja. Na primeru hibridnih polipeptid-PEG hidrogelov, kjer so z norbornenom funkcionaliziran

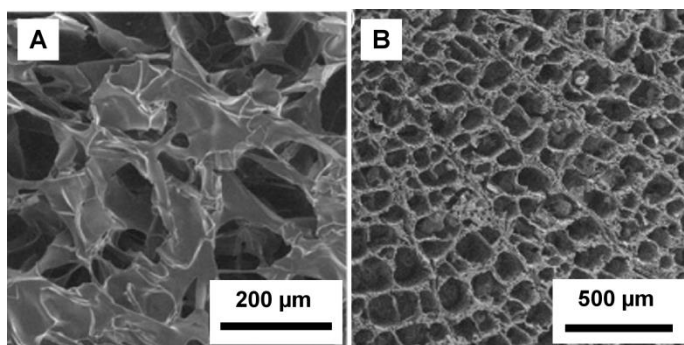
glutamat zamrežili s PEG-tiolom, so s kemijsko sestavo kopolimera prilagajali hidrofilnost in togost hidrogela.^{89,90} Kopolipeptid PBLG-ko-poli(alil glicin) so kovalentno zamrežili z ditiolom in na ta način fiksirali fibrilarno morfologijo polipeptida, ki se je ohranila tudi po odščiti BLG-segmetov.⁹² Hidrogele so pripravili tudi iz polipeptida na osnovi L-glutamata, L-lizina in L-alanina, ki so ga zamrežili z akrilatnim monomerom HEMA.⁸⁸ Takšni hidrogeli zaradi vsebnosti akrilatnega polimera sami po sebi niso omogočali pričvrstitve velikega števila celic, zato so za boljšo pričvrstitev celic hidrogela modificirali z RGD ali tirozin-izolevcin-glicin-serin-arginin (YIGSR) sekvenco.⁸⁷ Bolj biološko združljive hidrogela so pripravili osnovi PLGA, ki so ga zamrežili z alginatom.⁹¹ Po injiciranju raztopine pod kožo miši je *in situ* nastal hidrogel, iz katerega se je po več tednih pričelo razvijati hrustancu podobno tkivo. Obetavne rezultate so dali tudi polipeptidni hidrogeli, ki so jih z encimi zamrežili preko fenolnih obročev (slika 2-36B).^{93,94} Pokazali so, da morfologija hidrogela, ki so jo spreminjali s koncentracijo polimera, bistveno vpliva na diferenciacijo mezenhimskih zarodnih celic. Nadalje so na hidrogel vezali ciklično RGD-sekvenco preko disulfidne vezi.⁹⁵ Celice NIH 3T3 so se na zamrežene hidrogela s pripetim RGD-motivom odlično pričvrstile, z redukcijo disulfidne vezi v strukturi hidrogela pa so celice lahko kontrolirano odstranili. Podobno so zamrežili tudi PPLG, ki so ga modificirali s klik reakcijo ter pripeli še manozo, katere vloga je ublažiti začetni vnetni odziv tkiva.⁹⁶



Slika 2-36: Primer poroznega hidrogela na osnovi nekovalentno zamreženega PLGA in hitosana¹³² (A) in kovalentno zamreženega PLGA (B).⁹³

Če zamreževanje hidrogela poteka pod temperaturo ledišča vode, služijo kristali ledu kot trden templat in tvorijo pore, polimerne verige pa se skoncentrirajo na fazni meji med kristali, kar vodi do nastanka t.i. kriogelov. Sedlačik in sodelavci¹⁹ so primerjali hidrogel in kriogel na osnovi enakega polipeptidnega materiala – funkcionaliziranega glutamata, zamreženega z akrilatnim monomerom HEMA. Za razliko od hidrogela se struktura kriogela med mehanskim stiskanjem ni porušila, po končani obremenitvi pa se je kriogel vrnil v prvotno obliko. Do podobne ugotovitve glede prednosti kriogelacije so prišli tudi Shirbin in sodelavci,²⁰ ki so pripravili poli(L-lizin)-*b*-poli(D,L-valin) in stranske aminske skupine lizina zamrežili z glutaraldehidom. Nadalje so pokazali, da bi material lahko bil uporaben za čiščenje vod. Večina bakterij, inkubiranih na kriogelu, je namreč po eni uri pomrla, kar je posledica tako protimikrobnih lastnosti poli(L-lizina) kot makroporozne strukture kriogela. Shirbin in sodelavci²¹ so pripravili tudi polipeptidni kriogel na osnovi PLGA-ko-poli(L-lizina), zamreženega z reakcijo amidacije med prostimi karboksilnimi in aminskimi skupinami (slika 2-37A). Stopnja zamreženosti, ki so jo prilagajali s spreminjanjem sestave kopolimera, je bistveno vplivala na morfologijo kriogela. Fibroblasti so se na kriogele uspešno vezali, razraščali in prodirali v notranjost kriogela.

Enostaven primer trdnih templatov je tudi NaCl sol, s katerim so pripravili porozen PCL¹⁰ kot tudi sintetične polipeptide.^{134,135} Qian in sodelavci¹³⁴ so iz NaCl pripravili negativen templat na osnovi trsa in na njem polimerizirali raztopino BLG NCA v kloroformu. Material so posušili in NaCl odstranili s spiranjem z vodo, da je nastalo bimodalno porozno PBLG-ogrodje s kanali na račun templata in mikroporami zaradi prisotnosti topila (slika 2-37B). Celice MC3T3-E1 so se na njem uspešno pričvrstile in rastle. Podobno so Cui in sodelavci¹³⁵ v raztopino PBLG ali PBLG-*ko*-poli(L-fenilalanina) z dodatkom delcev biostekla v kloroformu dispergirali sintran NaCl kot templat. Nastali so biokompatibilni porozni nosilci, na katerih so celice MC3T3-E1 uspešno rastle in se tudi diferencirale do kostnega tkiva.

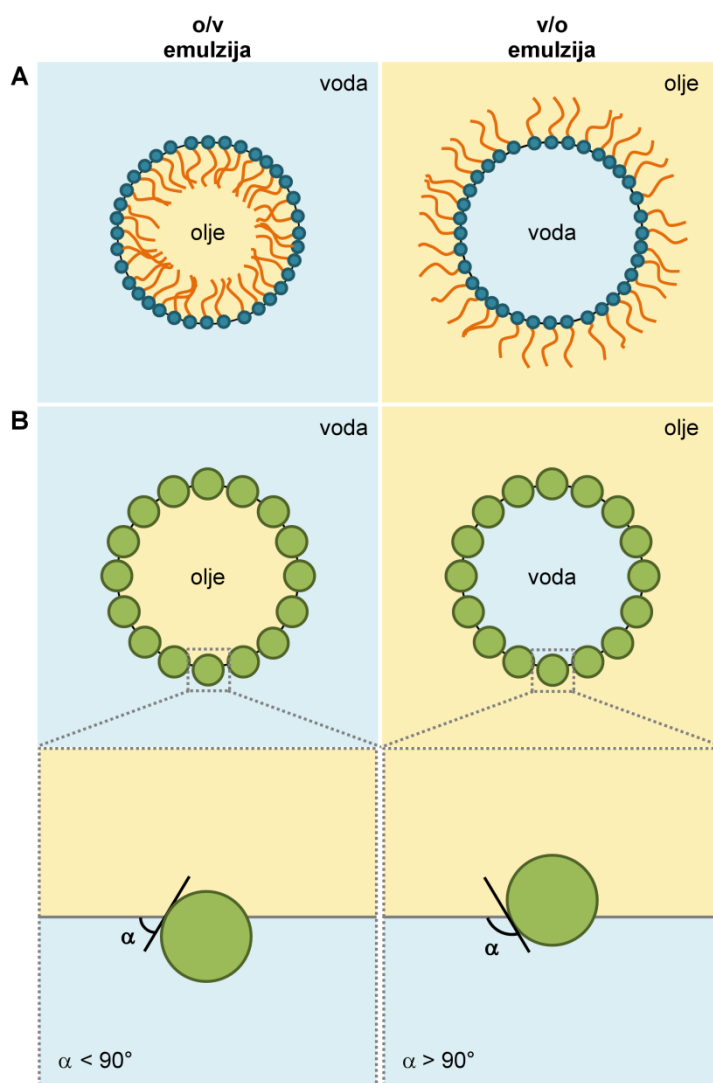


Slika 2-37: Primer poroznega kriogela na osnovi kovalentno zamreženega PLGA-*ko*-poli(L-lizina)²¹ (A) in poroznega PBLG, pripravljenega z negativnim templatom na osnovi trsa (B).¹³⁴

2.5.1 Polimerizirana emulzija z visokim deležem notranje faze (poliHIPE)

V zadnjem času je veliko pozornosti usmerjene v pripravo ogrodij iz emulzij z visokim deležem interne faze (angl. *high internal phase emulsion*, HIPE), kjer eno izmed topil služi kot mehak templat v dvofaznem sistemu.⁶ HIPE-i so definirani kot emulzije, katerih notranja (interna, kapljična) faza zavzema vsaj 74,04 % volumna celotne emulzije. 74,04 % predstavlja največji delež, ki ga lahko zavzamejo enako velike kapljice, ne da bi se pri tem deformirale. Zvezna (eksterna, kontinuirna) faza je v večini primerov organska (oljna), notranja pa vodna. V takšnih primerih govorimo o emulzijah voda v olju (v/o); nasprotno pa je v primeru emulzij olja v vodi (o/v), kjer je zvezna faza voda. Poznamo tudi brezvodne olje v olju (o/o) HIPE, ki so sestavljeni iz dveh nemešljivih organskih topil.⁴ Emulzije so termodinamsko nestabilni sistemi, saj nemešljivi fazi težita k temu, da bi se fazno ločili. Pri tem prihaja do pojava koalescence kapljic in/ali Ostwaldovega zorenja, kjer se pričnejo kapljice iste faze združevati in večati.³ Fazno separacijo lahko prepreči površinsko aktivna snov oz. surfaktant (angl. *surface-active agent*). Gre za neionske, anionske ali kationske amfifilne spojine, ki tvorijo okoli notranje faze zvezno plast. Ta deluje kot pregrada med fazama ter s tem zmanjša medfazno napetost in stabilizira emulzijo (slika 2-38A).⁸ Stabilnost HIPE-a je kinetsko pogojena in je odvisna od (ne)mešljivosti faz, vrste surfaktanta, količine surfaktanta, deleža notranje faze, temperature, viskoznosti in prisotnosti stabilizacijskih soli.³ Za stabilen HIPE včasih zadostuje že manj kot 1 mas. % surfaktanta, v nekaterih primerih pa mora preseči tudi 30 mas. %. Pri izbiri ustreznega surfaktanta si pomagamo z vrednostjo hidrofilnega-lipofilnega ravnotežja (angl. *hydrophile-lipophile balance*, HLB).¹³⁶ Surfaktanti z nizko vrednostjo HLB običajno dobro stabilizirajo HIPE tipa v/o, medtem ko so tisti z visokim HLB primernejši za emulzije tipa o/v.⁸ Brezvodni (o/o) HIPE so manj raziskani, saj je že sama izbira topil bistveno manjša. Za stabilizacijo o/o emulzij iz ogljikovodikov in

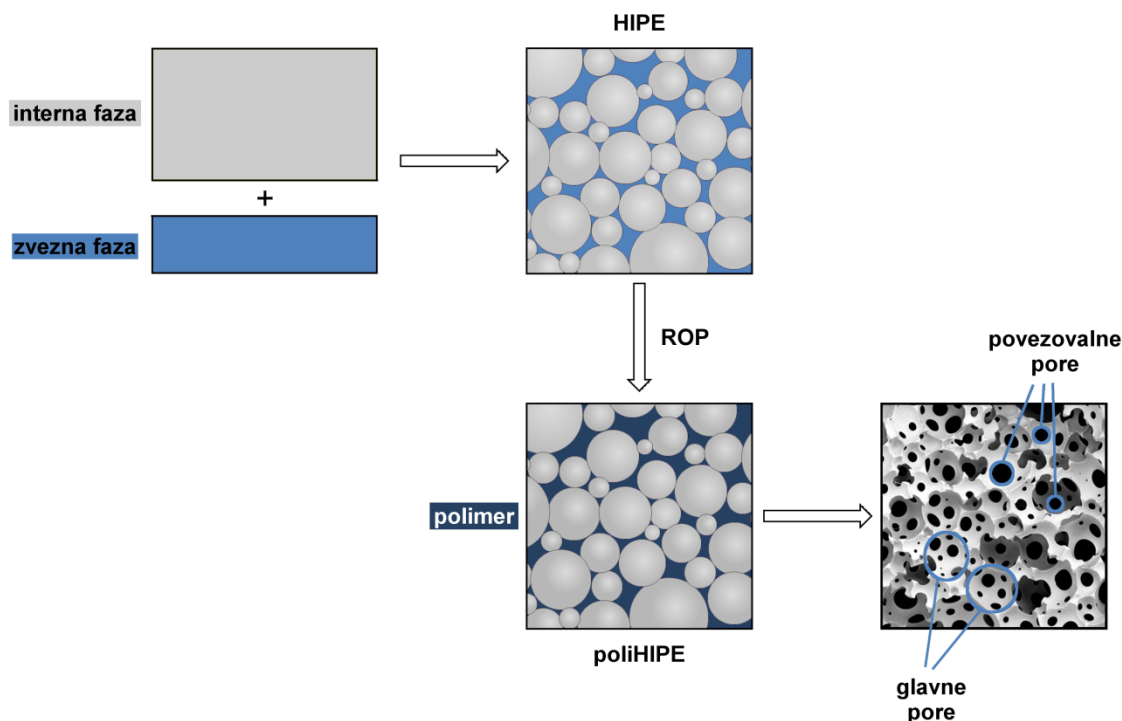
polarnih topil, kot so *N,N*-dimetil formamid (DMF), dimetil sulfoksid (DMSO) in formamid, so se izkazali t.i. Pluronic® surfaktanti, ki so blok kopolimeri PEG-*b*-PPG-*b*-PEG različnih molskih mas.¹³⁷ Stabilizacijo emulzij lahko dosežemo tudi z uporabo trdnih delcev (slika 2-38B); v tem primeru govorimo o Pickering HIPE-ih.¹³⁸ Trdni delci v emulziji preferenčno migrirajo na površino med dvema tekočima fazama. Za razliko od amfifilnih surfaktantov v klasičnih emulzijah, ki zmanjšajo površinsko napetost, tvorijo trdni delci lupino okoli dispergirane faze in s tem onemogočijo, da bi se kapljice združile. Stabilnost Pickering emulzij je odvisna od oblike in velikosti delcev, interakcije med njimi ter od omočljivosti delcev.¹³⁹ Bolj hidrofilni delci bodo preferenčno tvorili o/v emulzijo, bolj hidrofobni pa v/o.¹⁴⁰



Slika 2-38: Stabilizacija emulzije s surfaktantom (A) in trdnimi delci (B).

Če zunanjo fazo HIPE-a polimeriziramo, nastalo zvezno domeno polimera z značilno hierarhično porazdelitvijo por imenujemo poliHIPE (slika 2-39). Kapljična faza tvori glavne pore (angl. *voids* ali *cavities*), ki so običajno premera od 1 μm do 100 μm . Ta velikost sovpada z velikostjo kapljic v emulziji v točki želiranja, kjer strditev polimera prepreči nadaljnjo fazno separacijo. Značilnost poliHIPE-polimerov je odprta struktura, saj so glavne pore med seboj povezane z manjšimi povezovalnimi porami, imenovanimi tudi okna (angl.

interconnects ali *windows*). Do nastanka povezovalnih por pride domnevno med polimerizacijo kontinuirne faze, ko se le-ta zaradi razlike v gostoti skrči in posledično pretrga na najtanjši točki, tj. na stiku med glavnimi porami.⁴



Slika 2-39: Prikaz nastanka poliHIPE-a.

PoliHIPE-materiali so večinoma pripravljene na osnovi nerazgradljivih stirenskih ali akrilatnih monomerov,⁸ a se v zadnjem času povečuje zanimanje za pripravo razgradljivih poliHIPE-ogrodij.⁷ Razgradljivo enoto lahko predstavljajo različne zvrsti, kot so naravni polisaharidi in polipeptidi, npr. dekstran,¹⁴¹ želatina,^{142,143} kopolimer želatine in glikozaminoglikanov,¹⁴⁴ ali disulfidna vez v zamreževalcu.¹⁴⁵ V zadnjem času so pogosto pripravljene tudi poliestrski poliHIPE-materiali, npr. na osnovi poli(propilen fumarata),^{146–149} tiol-en polimerizacije estrskih monomerov^{150–156} ali PCL. PoliHIPE-ogrodja na osnovi PCL-poliestra so bila večinoma pripravljena iz raztopine polimera ali makromonomera. Raztopino nereaktivnega visokomolekularnega PCL-poliestra so emulgirali z vodo s pomočjo površinsko aktivnega sredstva¹⁵⁷ ali nanodelcev (Pickering HIPE),^{123,123,158} po čiščenju pa dobili porozen, nezamrežen PCL. Za pripravo zamreženega poliHIPE-ogrodja na osnovi PCL so uporabili PCL-makromomere s končnimi funkcionalnimi skupinami. Slabost pristopa je visoka viskoznost raztopine PCL, ki otežuje učinkovito mešanje emulzij. V izogib problemu viskoznosti ene od faz emulzij so PCL s končnimi diakrilatnimi skupinami redčili in izvedli kopolimerizacijo z akrilnimi komonomeri, vendar so na ta način zmanjšali delež PCL v poliHIPE-u na 40–50 %.^{23–25} Prav tako tudi redčenje s toluenom ni bilo učinkovito, ker so nastali poliHIPE-polimeri z zaprto poroznostjo.²³ PoliHIPE-nosilce z odprto porozno strukturo so dobili, ko so reagirali PCL-triol z diizocianatom v toluenu²⁶ ali topilu THF,²⁷ vendar delež PCL v končnem materialu ni presegel 50 %. Višji delež (76 %) PCL so uspešno vključili v poliHIPE s tiol-en klik reakcijo PCL-triakrilata in tritiola, ki sta bila redčena s topilom za učinkovitejše mešanje emulzije.²⁸ Iz štirikrakega PCL-makromonomera s končnimi metakrilnimi skupinami so s prilagajanjem vrste in količine topila pripravili

poliHIPE-ogrodja, ki so bila izključno iz PCL.⁹⁹ V nadaljevanju so ogrodja obdelali s plazmo, s čimer so površino primerno funkcionalizirali. Takšna ogrodja so uporabili za rast celic in pokazali, da fibroblasti na njih uspešno rastejo. Znaná sta tudi primera polimerizacije samega CL-monomera v HIPE-u. CL je tekoč, zato ni potrebe po uporabi dodatnega topila v zvezni fazi. Poleg tega je CL mešljiv z vodo, ki lahko deluje kot iniciator ROP CL, kar pa zahteva pripravo in polimerizacijo v o/o HIPE-u. Z ROP evtektične zmesi CL in L-laktida so tako pripravili nezamrežen poliHIPE.¹⁵⁹ V drugem delu so CL kovalentno zamrežili v HIPE-u z bis-laktonom preko ROP s kositrovim oktoatom kot katalizatorjem, ki je učinkovit pri visoki temperaturi polimerizacije, kar pa je močno zmanjšalo stabilnost emulzije in posledično negativno vplivalo na morfologijo.¹⁶⁰

Polipeptidna poliHIPE-ogrodja so bila pripravljena iz naravnega polipeptida, želatine. V vodni zvezni fazi HIPE-a so želatino zamrežili z encimsko reakcijo med aminskimi in hidroksilnimi skupinami, ali s prosto radikalsko polimerizacijo makromonomera, ki so ga predhodno pripravili s funkcionalizacijo aminskih skupin želatine z anhidridom metakrilne kisline.^{142,143} S prosto radikalsko polimerizacijo so imeli boljšo kontrolo nad morfologijo poliHIPE-materiala, a so se hepatocite bolje razvijale na nosilcu, ki je bil encimsko zamrežen. Želatino so emulgirali tudi v Pickering HIPE z nanodelci, zamrežili pa z uporabo naravnega zamreževalca, genipina, ter pokazali, da material omogoča rast fibroblastov.¹⁶¹ Kljub dobri biološki združljivosti pa ima uporaba naravnih polipeptidov svoje pomanjkljivosti, kot so pomanjkanje nadzora nad kemijsko sestavo in slaba ponovljivost fizikalno-kemijskih karakteristik materialov;²² kar pa so lastnosti, ki odlikujejo sintetične polipeptide.

PoliHIPE-ogrodja, pripravljena z ROP NCA-monomerov, še niso bila pripravljena. Do sedaj so zgolj modificirali površino stirenskih poliHIPE-ov, ki so bili na površini ustrezno funkcionalizirani z aminskimi skupinami, iz katerih so iniciirali ROP BLG NCA-monomera oz. ϵ -benziloksikarbonil-L-lizin NCA-monomera, da so modificirali hidrofobno površino polistirenskega monolita s hidrofilnimi polipeptidnimi grafti, ki so jih kasneje tudi odščitili.¹⁶² ROP NCA-monomerov v emulzijah je do sedaj slabo raziskano področje, saj so NCA-monomeri v prisotnosti vode podvrženi hidrolizi.⁴⁹

3 Eksperimentalni del

3.1 Materiali

Uporabili smo naslednje kemikalije in topila:

- [1,1'-bi(cikloheksan)]-4,4'-dion (98 %, TCI Chemicals)
- 1,4-dioksan (99,8 %, Fluka)
- 2,5-dihidroksibenzojska kislina (99 %, Sigma-Aldrich)
- 2-propanol (J. T. Baker)
- brezvodni dimetil sulfoksid (DMSO, 99,9 %, Sigma-Aldrich)
- brezvodni etil acetat (EtOAc, 99,8 %, Sigma-Aldrich)
- brezvodni etilen glikol (99,8 %, Sigma-Aldrich)
- brezvodni *N,N*-dimetil formamid (DMF, 99,8 %, Sigma-Aldrich)
- brezvodni tetrahidrofuran (THF, 99,9 %, Sigma-Aldrich)
- bromovodikova kislina (HBr, 33 mas. % v očetni kislini, Acros Organic)
- devteriran dimetil sulfoksid (DMSO-*d*₆, 0,03 vol. % TMS, Eurisotop)
- devteriran kloroform (CDCl₃, 0,03 vol. % TMS, 99,8 %, Merck)
- devterirana očetna kislina (99,5 %, Sigma-Aldrich)
- dietil eter (Merck)
- difenil fosfat (DPP, 99 %, Aldrich)
- di-*terc*-butil dikarbonat (Boc₂O, 99 %, Sigma-Aldrich)
- etanol (absolutni, Carlo Erba)
- glicin (Gly, 98,5 %, Sigma-Aldrich)
- izodipeptid med glutaminsko kislino in lizinom (H-Glu(H-Lys-OH)-OH, Bachem)
- jodometan (CH₃I, 99,5 %, stabiliziran z bakrom, Sigma-Aldrich)
- kalcijev hidrid (CaH₂, 95 %, Sigma-Aldrich)
- kalijev hidrogensulfat (KHSO₄, Aldrich)
- kalijev karbonat (K₂CO₃, 99 %, Merck)
- kalijev klorid (KCl, Fluka)
- kloroform (CHCl₃, 99,0 %, Honeywell)
- klorovodikova kislina (HCl, 37 %, Merck)
- L-homocistin (Hcys, Iris Biotech)
- magnezijev sulfat (MgSO₄, 99,5 %, Sigma-Aldrich)
- mravljična kislina (98 %, Honeywell)
- *N,N*-diizopropiletil amin (DIPEA, 98,0 %, Sigma-Aldrich)
- natrijev bikarbonat (Na₂CO₃, 99,5 %, Acros Organic)
- natrijev hidrid (NaH, 60 % oljna disperzija, Sigma-Aldrich)
- natrijev hidrogensulfat (NaHSO₄, 95 %, Fluka)

- natrijev hidroksid (NaOH, 99 %, Merck)
- natrijev klorid (NaCl, Fluka)
- natrijev tiosulfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck)
- *n*-heksan (Merck)
- N_{α}, N_{α}' -di-*terc*-butiloksikarbonil-L-cistin ((Boc-Cys-OH)₂, 98 %, Sigma-Aldrich)
- N_{δ} -karbobenziloksi-L-ornitin (ZLO, Irish Biotech)
- N_{ϵ} -karbobenziloksi-L-lizin (ZLL, Iris Biotech)
- očetna kislina (100 %, Merck)
- *O*-metilizošečnina bisulfat (MIU, 99 %, Aldrich)
- pentan (99 %, Honeywell)
- petrol bencin (PB, vrelišče 100 °C – 140 °C, Merck)
- piperidin (99 %, Sigma-Aldrich)
- Pluronic® F127 (Sigma)
- sečnina-vodikov peroksid (97 %, Aldrich)
- *terc*-butiloksikarbonil-glicin (Boc-Gly, 99,0 %, Aldrich)
- tetrahidrofuran (THF, Merck)
- trietil amin (Et₃N, 99,5 %, Sigma-Aldrich)
- trifluoroocetna kislina (TFA, 99,5 %, Acros Organic)
- trifosgen (98 %, Aldrich)
- α -pinen (98 %, Aldrich)
- β -benzil-L-aspartat (BLA, 99 %, Iris Biotech)
- γ -benzil-L-glutamat (BLG, 99 %, Acros Organics)
- ϵ -kapolakton (CL, 97 %, Aldrich, sušen s CaH₂ in vakuumsko destiliran)

3.2 Metode karakterizacije

3.2.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H in ^{13}C NMR-spektri so bili izmerjeni pri 25 °C na spektrometru Varian Unity Inova 300 MHz (Varian) v pulznem načinu s Fourierjevo transformacijo. Meritve so bile izvedene v CDCl_3 ali v $\text{DMSO}-d_6$ (po potrebi z nekaj kapljicami TFA). Kemijski premiki (δ , ppm) so podani glede na interni standard tetrametilsilan (TMS, $\delta = 0$).

3.2.2 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR)

FTIR-spektre smo izmerili na spektrometru Spectrum One (Perkin Elmer) oz. Vertex 80 (Bruker) v območju od 650 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} v ATR-načinu merjenja (angl. *attenuated total reflectance*).

3.2.3 Ramanska spektroskopija

Ramanski spektri so bili izmerjeni na instrumentu Bruker RAM II FT-Raman, sklopljenim z Vertex 80 IR-spektrometrom. Vzbujevalni vir je bil NIR-laser z valovno dolžino 1064 nm in močjo 200 mW. Spektre smo izmerili pri sobni temperaturi z nominalno resolucijo 4 cm^{-1} . Sipana svetloba je bila izmerjena z Ge-diodnim detektorjem, hlajenim s tekočim dušikom. Povprečili smo 64 interferogramov in jih apodizirali s štiričlensko Blackman-Harris funkcijo.

3.2.4 MALDI-TOF masna spektrometrija

Masni spektri so bili izmerjeni na Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF masnem spektrometru (Bruker Daltonik). Pripravili smo raztopino vzorca v THF s koncentracijo 10 mg mL^{-1} . Dodali smo 10-kratno količino raztopine matrice, tj. 2,5-dihidroksibenzojske kisline v THF (30 mg mL^{-1}), in 3-kratno količino raztopine natrijevega trifluoroacetata v THF (10 mg mL^{-1}). Na ploščo smo nanесли 0,4 μL pripravljene raztopine. Za kalibracijo smo uporabili PMMA-standarde.

3.2.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Termične lastnosti polimerov smo določili z Mettler Toledo DSC 1 (Mettler Toledo). Vzorce PCL smo segrevali od -80 °C do 100 °C s hitrostjo 10 °C min^{-1} , držali na 100 °C 1 min, nato ohladili na -80 °C s hitrostjo -10 °C min^{-1} ali -2 °C min^{-1} . Po 1 min na -80 °C smo vzorec znova segreli do 100 °C s hitrostjo 10 °C min^{-1} .

Polipeptidne vzorce smo segrevali od -80 °C do 150 °C s hitrostjo 20 °C min^{-1} , držali na 150 °C 1 min, nato pa ohladili na -80 °C s hitrostjo -200 °C min^{-1} . Na -80 °C smo vzorec držali 15 min, nato ga segreli do 150 °C s hitrostjo 20 °C min^{-1} .

Temperature taljenja, kristalizacije in steklastega prehoda ter površine pod krivuljami (entalpijo) smo določili s programsko opremo STARe.

3.2.6 Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologijo vzorcev poliHIPE smo opazovali s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa Zeiss Supra 35 VP (Carl Zeiss). Prelomljeno površino vzorcev smo pred snemanjem naprašili z 12 nm debelim slojem zlata na instrumentu Q150T ES (Quorum Technologies).

3.2.7 Mehanska analiza

Mehanske lastnosti smo določali na dinamičnem termomehanskem analizatorju DMA Q800 (TA Instruments), opremljenim z diski za kompresijo premera 15 mm. Pri kompresijskih testih smo cilindrične vzorce premera (7–8) mm in višine (6–7) mm stiskali pri različnih temperaturah (–30 °C, 20 °C, 37 °C in 60 °C) s postopno obremenitvijo 0,5 N min⁻¹ (PCL) in 1 N min⁻¹ (polipeptidi) do 18 N. Youngov modul (*E*) smo določili iz naklona začetnega linearne delu krivulje napetost-deformacija.

Termomehanske cikle za študij oblikovnega spomina PCL poliHIPE-ov smo sprogramirali na sledeč način. Vzorec smo obremenili z minimalno silo 0,005 N in ga segreli na 60 °C za PCL-5,0 oz. 40 °C za PCL-7,5 ter držali silo pri tej temperaturi 10 min. Pomerili smo višino vzorca in ga v času 1 min obremenili s silo 0,3 N (PCL-5,0) oz. 0,6 N (PCL-7,5). Nato smo temperaturo s hitrostjo –1 °C min⁻¹ znižali do 0 °C ali 20 °C za PCL-5,0 oz. –30 °C za PCL-7,5 in temperirali vzorec pri tej temperaturi 20 min, da je kristaliziral. Silo smo nato zmanjšali do minimalne sile (0,005 N) in vzorec držali izotermno še 20 min, da smo se prepričali o fiksiranju začasne oblike. Sledilo je segrevanje vzorca s hitrostjo 0,5 °C min⁻¹ do 60 °C za PCL-5,0 oz. 40 °C za PCL-7,5, da smo lahko odčitali temperaturo prehoda iz začasne v prvotno obliko, nakar smo vzorec temperirali še 60 min, da se je povrnil v originalno obliko. Cikle smo ponovili enkrat do šestkrat, začenši s stiskanjem segretega vzorca.

3.2.8 Test toksičnosti

Za test toksičnosti smo 15 mg poliHIPE PBLG_{2,0} 80-3 sterilizirali čez noč v etanolu in nato etanol izmenjali s sterilno milli-Q vodo. Vzorec smo sprali z brezbarvnim medijem Dulbecco's Modified Eagle's Medium D5921 z 10 vol. % FBS, 1 vol. % Na-Pyruvate S8636 in 1 vol. % Glutamax 35050061 ter ga prestavili v ploščo z 12 vdolbinicami in 1 mL testnega medija. Inkubacija je potekala čez noč pri normalnih pogojih (5 % CO₂, 37 °C, vlažnost zraka skoraj 100 %). Vzporedno smo na ploščo s 96 vdolbinicami prenesli po ~10000 celic celične linije mišjih fibrosarkom L929 v vdolbinico, dodali 100 µL testnega medija in inkubirali čez noč. Naslednji dan smo celicam dodali 100 µL medija, inkubiranega s poliHIPE-om ali brez (kontrola). Po enem dnevu inkubacije smo dodali 20 µL celičnega reagenta Presto blue (Invitrogen) in inkubirali še 3 h, da so žive celice tvorile fluorescenčni produkt. Fluorescenčni signal smo izmerili s pomočjo 270–120 nm vzbujevalnega filtra in 590 nm emisijskega filtra. Viabilnost celic, inkubiranih z medijem, ki je bil predhodno inkubiran s poliHIPE-om, je podana kot odstotek signala kontrolnega testa.

3.2.9 Konfokalna mikroskopija

Vzorec PBLG_{2,0} 80-3 in celice mišjih fibrosarkom L929 smo pripravili na enak način kot za test toksičnosti. Na površino poliHIPE-materiala smo nato prenesli 12 µL medija s ~30000 celicami celične linije mišjih fibrosarkom L929 in jih inkubirali (1–7) dni. Po določenem času smo si vzorce ogledali z Leica TCS SP5 konfokalnim mikroskopom na Leica DMI 6000 CS modulu (Leica Microsystems) z objektivom HCX PL Fluotar L (20x; NA, 0.4) pri različnih povečavah. Vsa celična jedra smo označili z barvilom Hoechst 33342 (4 µM), mrtva celična jedra pa z barvilom SYTOX® Green (1 µM). Za vzbujevanje smo uporabili diode pri valovni dolžini 405 nm in argon laser z valovno dolžino 476 nm. Emisijo barvila Hoechst 33342 smo zaznavali med 440 nm in 480 nm, emisijo barvila SYTOX® Green pa med 520 nm in 550 nm.

3.2.10 Rast celic

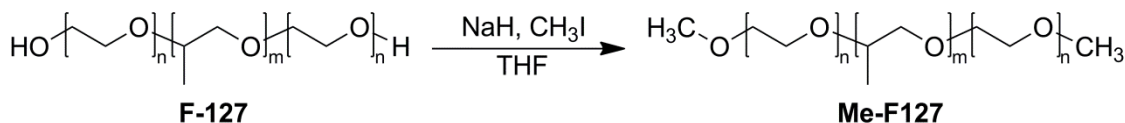
Celice mišjih fibrosarkom L929 smo inkubirali in sadili na PBLG_{2,0} 80-3 na enak način kot za konfokalno mikroskopijo. Po 2, 4 in 6 dneh inkubacije smo poliHIPE s sajenimi celicami ali brez njih (kontrola) prenesli v 900 µL svežega medija v ploščo s 24 vdolbinicami in po 30 min dodali 100 µL reagenta Presto blue. Takoj po dodatku reagenta in po 3 h inkubacije smo odvzeli po 100 µL medija ter pomerili fluorescenco na enak način kot za test toksičnosti. Fluorescenčni signal medija, odvzetega takoj po dodatku reagenta, smo odšteli od fluorescenčnega signala po 3 h inkubacije. Odziv je podan v relativnih fluorescenčnih enotah in predstavlja naraščanje števila celic s časom.

3.2.11 Optična mikroskopija

Celice mišjih fibrosarkom L929 smo inkubirali in sadili na PBLG_{2,0} 80-3 na enak način kot za konfokalno mikroskopijo. Po 8 dneh inkubacije smo poliHIPE namočili v raztopino za fiksiranje (3 % glutaraldehid v 0,1 M fosfatnem pufru) in ga narezali na rezine debeline (2–3) mm. Kot kontrolo smo uporabili poliHIPE, na katerega nismo sadili celic. Vzorce smo označili z 1 % OsO₄ v 0,1 M fosfatnem pufru in vgradili v smolo Agar 100 (Agar Scientific). Na ultramikrotomu (Reichert Ultracut S, Leica) smo odrezali rezine fiksiranega poliHIPE-a debeline 0,6 µm. Celice smo označili z barvilom Azure II – metilen modro in si jih ogledali z optičnim mikroskopom AxioCam HR (Carl Zeiss).

3.3 Sinteze

3.3.1 Modifikacija surfaktanta

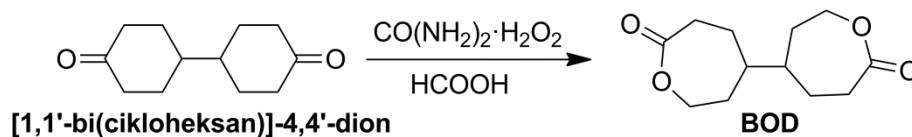


Surfaktant poli(etilen glikol)-*b*-poli(propilen glikol)-*b*-poli(etilen glikol) (PEG-*b*-PPG-*b*-PEG) Pluronic® F127 (10 g, 0,8 mmol) smo raztopili v 30 mL brezvodnega THF in dodali natrijev hidrid (0,63 g 60 % oljne disperzije, 15,9 mmol), ki je bil v raztopini Pluronica® F127 v THF dispergirani. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledu in dodali jodometan (0,74 mL, 15,9 mmol). Reakcijo smo pustili teči 48 h na sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo nato znova ohladili na ledu in prebitni natrijev hidrid reagirali z 2-propanolom (30 mL), etanolom (2 mL) in očetno kislino (do nevtralnega pH). Pri tem koraku se je raztopina obarvala oranžno. Topila smo vakuumsko odstranili, ostanek pa raztopili v svežem THF (75 mL) in tega znova vakuumsko odstranili. Dobro osušen surfaktant smo raztopili v kloroformu (200 mL) in nečistoče trikrat previdno ekstrahirali v sveže pripravljeno raztopino natrijevega tiosulfata (5 % m/m, 3×100 mL), dokler se organska faza ni razbarvala, kar je nakazovalo na popolno redukcijo prebitnega joda. Organsko fazo smo sprali še z deionizirano vodo (100 mL), nato pa posušili z brezvodnim magnezijevim sulfatom, filtrirali in skoncentrirali pod vakuumom. Produkt smo oborili v hladnem heksanu (250 mL), filtrirali in posušili. Produkt Me-F127 je bel prah (izkoristek 89 %).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ (ppm)): 3,72–3,60 (m, -CH₂-CH₂-O-), 3,60–3,46 (m, -CH-CH₂-O-), 3,46–3,30 (m, -CH-CH₂-O-), 3,38 (s, -O-CH₃), 1,18–1,08 (m, -CH-CH₃).

3.3.2 Sinteza monomerov

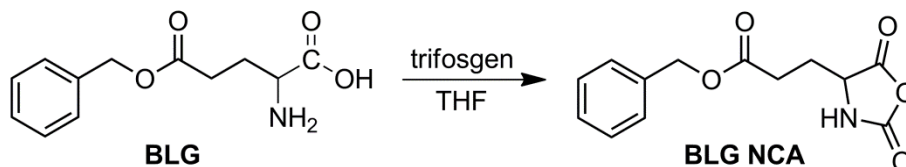
3.3.2.1 Sinteza 4,4'-bioksepanil-7,7'-diona (BOD)



BOD smo pripravili po prirejeni znani metodi.¹⁶³ Kompleks sečnina-vodikov peroksid (20,00 g, 0,21 mol) in mravljično kislino (100 mL) smo mešali 2 h na sobni temperaturi. Zmes smo ohladili na ledu in počasi dodali [1,1'-bi(cikloheksan)]-4,4'-dion (10,00 g, 0,05 mol). Reakcijsko zmes smo mešali nadaljnje 4 h, pri čemer se je segrela do sobne temperature. Nato smo zmes razredčili z vodo (200 mL) in produkt ekstrahirali v kloroform (1×200 mL in 4×40 mL). Zbrano organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino natrijevega bikarbonata (4×150 mL) in z raztopino natrijevega klorida (1 M, 200 mL), posušili z brezvodnim magnezijevim sulfatom ter filtrirali. Topilo smo delno odparili pod vakuumom in raztopino spustili čez plast silikagela, pri čemer smo kot eluent uporabili kloroform. V zadnji stopnji smo kloroform odparili pod vakuumom ter dobili BOD produkt v obliki belega prahu (izkoristek 66 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm)): 4,38–4,12 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$), 2,78–2,55 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$), 1,98–1,79 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2-$), 1,74–1,41 (m, 3H, $-\text{CH-CH}_2-$).

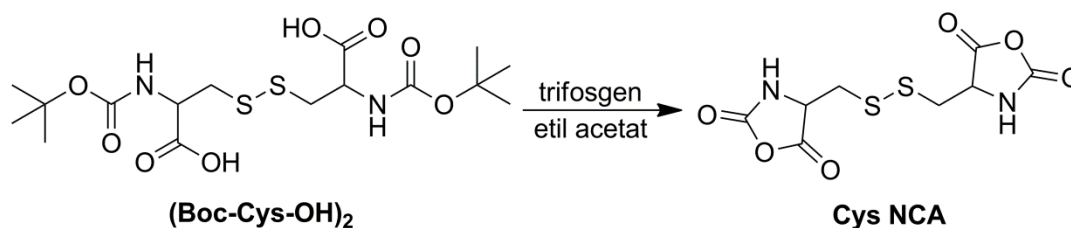
3.3.2.2 Sinteza γ -benzil-L-glutamat N-karboksianhidrida (BLG NCA)



V prežarjeni Schlenk bučki smo suspendirali BLG (10,00 g, 42,2 mmol) v brezvodni THF (90 mL) in segreli na 50 °C. Posebej smo pripravili in dodali raztopino trifosgena (6,76 g, 22,8 mmol) v brezvodnem THF (10 mL). Reakcijska zmes se je po 20 min zbistnila, nakar smo jo mešali še 1 h. Raztopino smo nato koncentrirali pod vakuumom in BLG NCA prekristalizirali s hladnim *n*-heksanom. Prekristalizacijo iz THF/*n*-heksana smo ponovili še dvakrat. BLG NCA produkt v obliki belih kristalčkov smo osušili (izkoristek 96 %).

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ (ppm)): 9,11 (s, 1H, $-\text{NH-}$), 7,37 (m, 5H, aril $-\text{CH-}$), 5,11 (s, 2H, benzil $-\text{CH}_2-$), 4,48 (ddd, $J_1 = 7,8$ Hz, $J_2 = 5,5$ Hz, $J_3 = 1,1$ Hz, 1H, $-\text{CH-}$), 2,49 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2,02 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$).

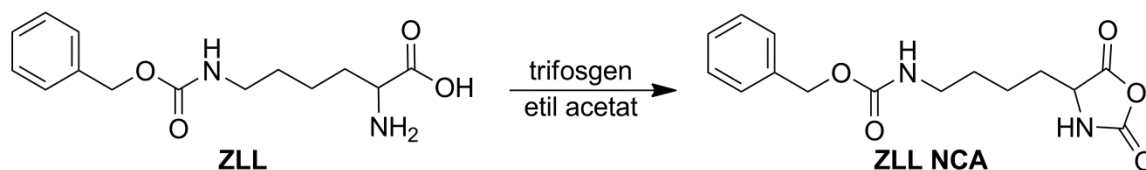
3.3.2.3 Sinteza L-cistin N-karboksianhidrida (Cys NCA)



V prežarjeni Schlenk bučki smo suspendirali (Boc-Cys-OH)₂ (1,00 g, 2,3 mmol) v brezvodnem acetatu (15 mL). Dodali smo trifosgen (0,91 g, 3,1 mmol) in reakcijsko zmes segreli na 60 °C. Po 12 h smo raztopino filtrirali preko PTFE-filtra (0,45 μm , Chromafil) neposredno v centrifugirko s 40 mL hladnega *n*-heksana. Zmes smo centrifugirali (8000 rpm, 7 min), supernatant oddekantirali in osušili oborjen produkt. Produkt smo še enkrat raztopili v brezvodni etil acetat, obarjali v *n*-heksan in osušili (izkoristek 83 %).

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ (ppm)): 9,26 (s, 2H, $-\text{NH-}$), 4,79 (ddd, $J_1 = 6,6$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz, $J_3 = 1,3$ Hz, 2H, $-\text{CH-}$), 3,22 (m, 4H, $-\text{CH}_2-$).

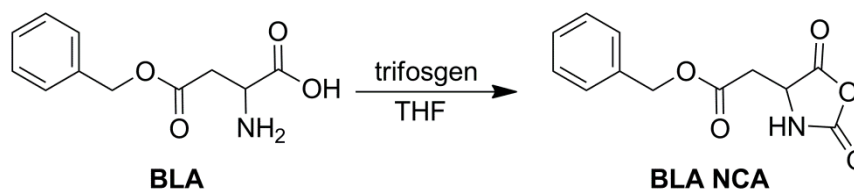
3.3.2.4 Sinteza *N*_ε-karbobenziloksi-L-lizin *N*-karboksianhidrida (ZLL NCA)



V prežarjeni Schlenk bučki smo suspendirali ZLL (10,00 g, 35,7 mmol) v brezvodni etil acetat (90 mL) in segreli na 78 °C. Dodali smo raztopino trifosgena (4,70 g, 15,9 mmol) v brezvodnem etil acetatu (10 mL). Reakcijsko zmes smo mešali 4 h, pri čemer se je raztopina zbistrla. Raztopino smo nato koncentrirali pod vakuumom in ZLL NCA prekristalizirali s hladnim *n*-heksanom. Produkt smo osušili in še dvakrat prekristalizirali iz etil acetata/*n*-heksana ter osušili (izkoristek 70 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ (ppm)): 9,08 (s, 1H, -NH-), 7,34 (m, 5H, aril -CH-), 7,35 (t, 1H, -NH-), 5,01 (s, 2H, benzil -CH₂-), 4,43 (ddd, *J*₁ = 6,5 Hz, *J*₂ = 5,2 Hz, *J*₃ = 1,1 Hz, 1H, -CH-), 3,00 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H, -CH₂-), 1,70 (m, 2H, -CH₂-), 1,38 (m, 4H, -CH₂-).

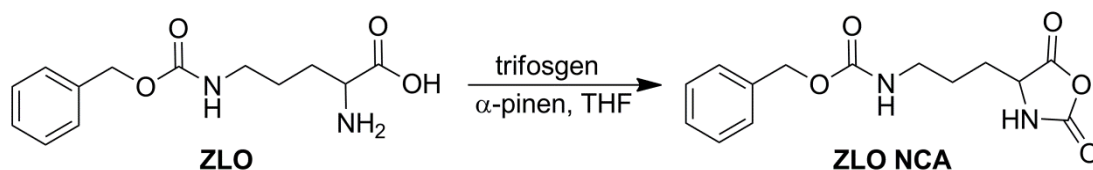
3.3.2.5 Sinteza β-benzil-L-aspartat *N*-karboksianhidrida (BLA NCA)



V prežarjeni Schlenk bučki smo suspendirali BLA (5,00 g, 22,4 mmol) v brezvodni THF (50 mL) in reakcijsko zmes segreli na 55 °C. Dodali smo raztopino trifosgena (3,55 g, 12,0 mmol) v brezvodnem THF (10 mL). Zmes se je po nekaj minutah zbistrla, nakar smo jo mešali še 1 h. Raztopino smo nato koncentrirali pod vakuumom in BLA NCA prekristalizirali s hladnim *n*-heksanom. Produkt smo osušili in še dvakrat prekristalizirali iz THF/*n*-heksana ter osušili (izkoristek 84 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ (ppm)): 8,99 (s, 1H, -NH-), 7,37 (m, 5H, aril -CH-), 5,13 (s, 2H, benzil -CH₂-), 4,69 (td, 1H, *J*₁ = 4,4 Hz, *J*₂ = 2,2 Hz, -CH-), 3,09–2,89 (ddd, 2H, *J*₁ = 100,9 Hz, *J*₂ = 17,8 Hz, *J*₃ = 4,6 Hz, -CH₂-).

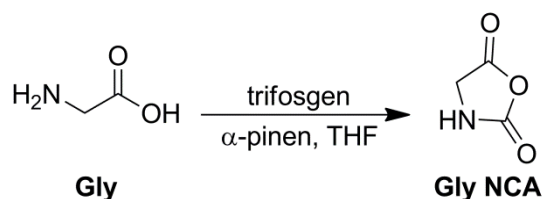
3.3.2.6 Sinteza N_5 -karbobenziloksi-*L*-ornitin *N*-karboksianhidrida (ZLO NCA)



V prežarjeni Schlenk bučki smo suspendirali ZLO (5,00 g, 18,8 mmol) v brezvodni THF (40 mL) in zmes segreli na 55 °C. Nato smo dodali raztopino trifosgena (2,05 g, 6,9 mmol) v brezvodnem THF (10 mL) in α -pinen (6 mL, 37,8 mmol). Po 1,5 h smo dodali prebitek raztopine trifosgena (0,20 g, 0,7 mmol) v brezvodnem THF (4 mL). Po 1 h se je reakcijska zmes bistrila, nakar smo jo mešali še 2 h. Raztopino smo nato filtrirali skozi PTFE-filtr (0,45 μ m, Chromafil), koncentrirali pod vakuumom in prekristalizirali z ledenim *n*-heksanom. Produkt smo še dvakrat prekristalizirali iz brezvodnega etil acetata/*n*-heksana ter osušili (izkoristek 80 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ (ppm)): 9,10 (s, 1H, -NH-), 7,35 (m, 5H, aril -CH-), 6,96 (t, 1H, -NH-), 5,02 (s, 2H, benzil, -CH₂-), 4,45 (m, 1H, -CH-), 3,03 (q, 2H, $J = 6,4$ Hz, -CH₂-), 1,80–1,60 (m, 2H, -CH₂-), 1,49–1,42 (m, 2H, -CH₂-).

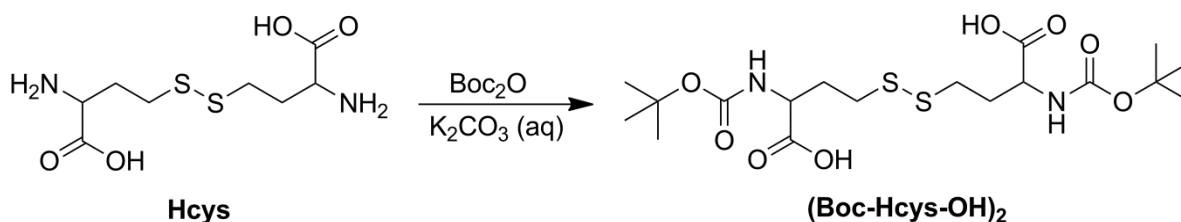
3.3.2.7 Sinteza glicin *N*-karboksianhidrida (Gly NCA)



V prežarjeni Schlenk bučki smo suspendirali glicin (2 g, 26,6 mmol) v brezvodnem THF (20 mL) in dodali α -pinen (8,4 mL). Reakcijsko zmes smo segreli na 65 °C in mešali 1 h. Nato smo počasi dodajali raztopino trifosgena (2,64 g, 8,9 mmol) v brezvodnem THF (8 mL). Zmes smo mešali 2 h, nato pa filtrirali preko PTFE-filtra (0,45 μ m, Chromafil) in raztopino koncentrirali pod vakuumom. Produkt smo dvakrat prekristalizirali iz THF/pentana in osušili (izkoristek 25 %).

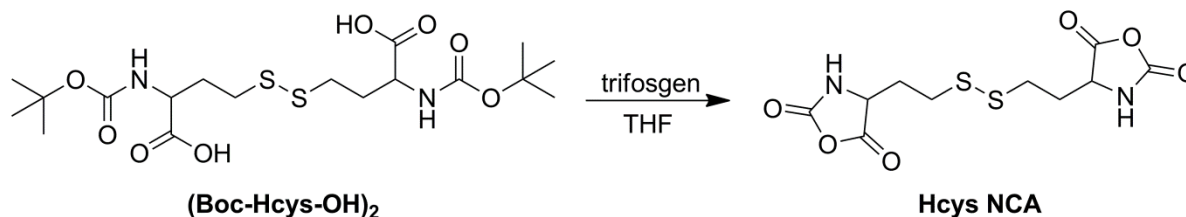
^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ (ppm)): 8,83 (s, 1H, -NH-), 4,20 (s, 1H, -CH-).

3.3.2.8 Sinteza L-homocistin N-karboksianhidrida (Hcys NCA)



(Boc-Hcys-OH)₂ smo pripravili po prirejeni znani metodi.¹⁶⁴ L-Homocistin (2,85 g, 10,6 mmol) smo suspendirali v vodni raztopini kalijevega karbonata (40 mL, 10 % m/m) in dodali raztopino di-*tert*-butil dikarbonata (Boc₂O) (5,82 g, 26,7 mmol) v THF (35 mL). Reakcijsko zmes smo mešali 24 h pod refluksom (80 °C). Zmes smo razredčili z deionizirano vodo (70 mL) in nato nakisali z nasičeno raztopino kalijevega hidrogensulfata do pH 3–4, da se je (Boc-Hcys-OH)₂ s protonirano karboksilno skupino oboril iz vodne raztopine, ne da bi pri tem prišlo do neželene odščite. Produkt smo ekstrahirali v kloroform (3×30 mL) in zbrane organske faze osušili z brezvodnim magnezijevim sulfatom. Suspenzijo smo filtrirali, topilo vakuumsko odpareli in (Boc-Hcys-OH)₂ vakuumsko osušili do suhega (izkoristek 86 %).

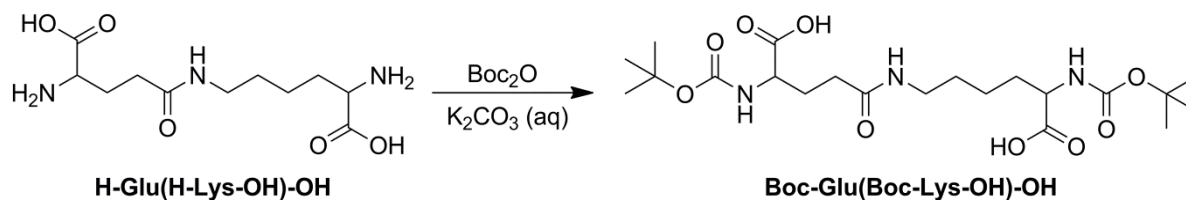
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ (ppm)): 7,16 (m, 2H, -NH-), 4,01 (m, 2H, -CH-), 2,74 (m, 4H, -S-CH₂), 2,06–1,92 (m, 4H, -CH₂-), 1,39 (s, 18H, -CH₃).



(Boc-Hcys-OH)₂ (0,40 g, 0,9 mmol) smo zatehtali v prežarjeno Schlenk bučko, raztopili v brezvodnem THF (3 mL) in segreli na 50 °C. Dodali smo raztopino trifosgena (0,34 g, 1,1 mmol) in reakcijo mešali 24 h. Hcys NCA smo dvakrat prekrystalizirali iz THF/*n*-heksana (izkoristek 62 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ (ppm)): 9,13 (s, 1H, -NH-), 4,54 (dd, 1H, *J*₁ = 7,9 Hz, *J*₂ = 5,1 Hz, -CH-), 2,85–2,77 (m, 2H, -S-CH₂-), 2,18–2,04 (m, 2H, -CH₂-).

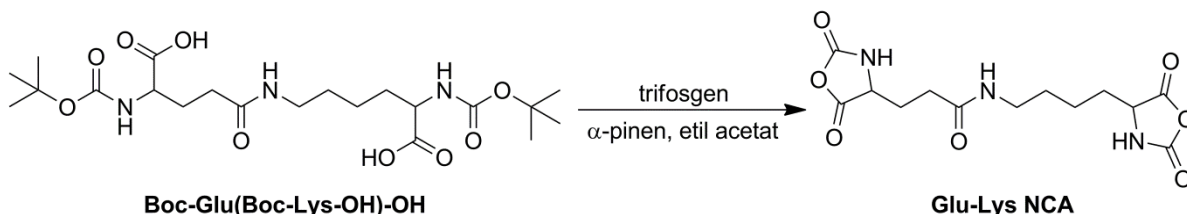
3.3.2.9 Sinteza izodipeptid glutaminska kislina-lizin N-karboksianhidrida (Glu-Lys NCA)



H-Glu(H-Lys-OH)-OH (0,40 g, 1,5 mmol) smo raztopili v vodni raztopini kalijevega karbonata (6,3 mL, 10 % m/m). Dodali smo raztopino Boc₂O (0,79 g, 3,6 mmol) v THF (5,4 mL) in reakcijsko zmes mešali 24 h pod refluksom (80 °C). Zmes smo razredčili z deionizirano vodo

(11 mL) in nato nakisali z nasičeno raztopino kalijevega hidrogensulfata do pH 3–4. Produkt smo ekstrahirali v kloroform (4×6 mL) in zbrane organske faze osušili z brezvodnim magnezijevim sulfatom. Suspenzijo smo filtrirali in topilo vakuumsko odpareli. Boc-Glu(Boc-Lys-OH)-OH smo osušili do suhega (izkoristek 80 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ (ppm)): 7,79 (m, 1H, amid -NH-), 7,05 (m, 2H, -NH-), 3,84 (m, 2H, -CH-COOH), 3,00 (m, 2H, Lys -NH-CH $_2$ -), 2,13 (t, 2H, Glu -CH $_2$ -), 1,92–1,73 (m, 2H, Glu -CH $_2$ -), 1,64–1,52 (m, 2H, Lys -CH $_2$ -), 1,38 (s, 18H, -CH $_3$), 1,31 (m, 2H, Lys -CH $_2$ -).



Boc-Glu(Boc-Lys-OH)-OH (0,11 g, 0,22 mmol) smo raztopili v brezvodnem etil acetatu (4 mL) in segreli na 70 °C. Dodali smo α -pinen (0,28 mL) in nato postopoma, v roku 5 h, po kapljicah dodajali raztopino trifosgena (0,11 g, 0,40 mmol) v brezvodnem etil acetatu (2 mL). Po 24 h smo reakcijsko zmes filtrirali preko PTFE-filtra (0,45 μm , Chromafil), raztopino koncentrirali pod vakuumom in produkt prekrystalizirali iz hladnega *n*-heksana.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ (ppm)): 9,09 (s, 1H, Glu -NH-), 9,06 (s, 1H, Lys -NH-), 7,87 (s, 1H, -NH-CO-), 4,47 (t, 2H, Glu -CH-), 4,43 (t, 2H, Lys -CH-), 3,02 (m, 2H, Lys -CH $_2$ -NH-), 2,19 (m, 2H, Glu -CH $_2$ -CO-), 1,97 (m, 2H, Glu -CH $_2$ -CH-), 1,75 (m, 2H, Lys -CH $_2$ -), 1,55 (m, Lys -CH $_2$ -), 1,30 (m, 2H, Lys -CH $_2$ -).

3.3.3 Sinteza PCL poliHIPE-ov

Primer priprave poliHIPE z 90 vol. % interne faze, 16 mas. % surfaktanta in 5,0 mol % BOD je sledeč. BOD (0,16 g, 0,7 mmol) in Me-F127 (0,34 g, 0,02 mmol) smo raztopili v CL (1,5 mL, 13,5 mmol) ter dodali etilen glikol (18,1 μL , 0,3 mmol) in DPP (0,05 g, 0,2 mmol). Med mešanjem z mehanskim mešalom (EUROSTAR 20 digital, IKA) smo po kapljicah dodajali petrol bencin (13,5 mL). Po dodatku vse interne faze smo HIPE mešali še 10 min. Nato smo emulzijo vlili v več plastičnih 2 mL centrifugirk in segrevali na 50 °C čez noč. Nastale poliHIPE-monolite smo čistili z ekstrakcijo v Soxhletovem aparatu, pri čemer smo prvih 24 h uporabili topilo dietil eter, ki odstrani petrol bencin in DPP. Za odstranitev surfaktanta smo čiščenje v Soxhletovem aparatu nadaljevali s 24 h ekstrakcijo z etanolom. Etanol smo v končni fazi difuzijsko izmenjali z deionizirano vodo ter monolite osušili s sušenjem z zamrzovanjem, da smo preprečili skrčenje monolita.

3.3.4 Hidrolitska razgradnja PCL poliHIPE-ov

Očiščen in posušen poliHIPE-monolit (60 mg) smo namočili v 0,1 M vodno raztopino NaOH (7 mL). Po določenem času smo poliHIPE odstranili iz bazične raztopine, ga temeljito sprali z deionizirano vodo in osušili s sušenjem z zamrzovanjem.

3.3.5 Linearni polipeptidi

Linearne polipeptide smo pripravili s polimerizacijo 0,5 M raztopine NCA (BLG ali ZLL) v brezvodnem DMF, ki smo ji dodali 0,5 mol % DIPEA. Polimerizacija je potekala na sobni temperaturi 24 h. Raztopino polimera smo oborili v vodno raztopino natrijevega klorida (5 mas. %). Zmes smo centrifugirali, supernatant oddekanirali in oborino večkrat sprali z deionizirano vodo ter osušili.

3.3.6 Spremljanje kinetike ROP NCA

Za spremljanje kinetike ROP smo pripravili raztopino NCA v brezvodnem DMF ali DMSO. Dodali smo katalizator in po določenem času odvzeli alikvot reakcijske zmesi. Reakcijo smo ustavili z devterirano očetno kislino in raztopino razredčili z DMSO- d_6 ter takoj analizirali z ^1H NMR-spektroskopijo.

3.3.7 Sinteza polipeptidnih DMF/PB poliHIPE-ov

Primer priprave polipeptidnega poliHIPE PBLG_{2,0} 80-3, zamreženega s 5 mol % cistina, je sledeč. V brezvodnem DMF (1175 μL) smo raztopili BLG NCA (0,60 g, 2,3 mmol), Cys NCA (0,04 g, 0,12 mmol) in Me-F127 (0,05 g). Raztopino smo pod argonom prenesli v dvogrlo bučko, opremljeno z mehanskim mešalom (EUROSTAR 20 digital, IKA). Med mešanjem s hitrostjo 330 rpm smo po kapljicah v reakcijsko zmes, ki smo jo preprihovali z argonom, dodajali PB (4,8 mL). Po dodatku vsega PB smo emulzijo mešali še 10 min in nato dodali raztopino DIPEA v brezvodnem DMF (24 μL , 0,5 M). Mešanje smo po 30 s ustavili in HIPE previdno odpipetirali v 2 mL centrifugirke, ki smo jih zaprli z gumijasto septo. V septo smo vstavili votlo iglo, da je nastali CO_2 lahko izhajal iz reakcijske zmesi. Polimerizacija je potekala na sobni temperaturi 24 h. PoliHIPE smo nato sprali z 1,4-dioksanom, ga čistili še 48 h z 1,4-dioksanom na Soxhletovem aparatu, nato pa osušili s sušenjem z zamrzovanjem.

3.3.8 Sinteza polipeptidnih DMSO/PB poliHIPE-ov

Primer priprave polipeptidnega poliHIPE PBLA, zamreženega z 10 mol % cistina, je sledeč. V brezvodni DMSO (1020 μL) smo dodali raztopino TFA v brezvodnem DMSO (60 μL , 0,2 M). Raztopili smo BLA NCA (0,54 g, 2,2 mmol), Cys NCA (0,07 g, 0,2 mmol) in Me-F127 (0,04 g). Raztopino smo pod argonom prenesli v dvogrlo bučko, opremljeno z mehanskim mešalom (EUROSTAR 20 digital, IKA). Med mešanjem s hitrostjo 330 rpm smo po kapljicah v reakcijsko zmes, ki smo jo preprihovali z argonom, dodajali PB (4,8 mL). Po dodatku vsega PB smo emulzijo mešali še 10 min in nato dodali raztopino Et_3N v brezvodnem DMSO (120 μL , 0,5 M). Mešanje smo po 30 s ustavili in HIPE previdno odpipetirali v 2 mL centrifugirke, ki smo jih zaprli z gumijasto septo. V septo smo vstavili votlo iglo, da je nastali CO_2 lahko izhajal iz reakcijske zmesi. Polimerizacija je potekala na sobni temperaturi 24 h. PoliHIPE smo nato sprali s THF, ga 48 h čistili na Soxhletovem aparatu s THF, nato pa sprali z 1,4-dioksanom in osušili s sušenjem z zamrzovanjem.

3.3.9 Odščita polipeptidnih poliHIPE-ov

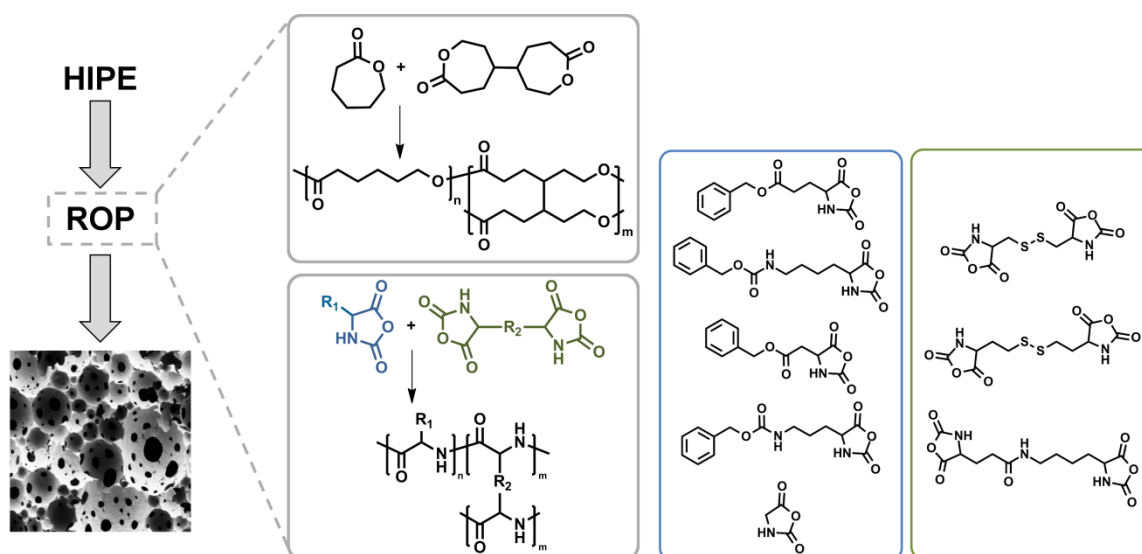
Polipeptidni poliHIPE v obliki monolita (30 mg) smo namočili v zmes TFA (3 mL) in HBr (0,3 mL) in pustili 90 min na ledu. PoliHIPE smo nato večkrat sprali s THF in ga nevtralizirali s piperidinskim pufrom pH 11,0 in nato še s PBS-pufrom pH 6,5. Nazadnje smo monolite temeljito sprali z vodo in osušili s sušenjem z zamrzovanjem.

3.3.10 Gvanidizacija polipeptidnih poliHIPE-ov

Reakcijo gvanidizacije smo izvedli po znanem postopku.¹⁶⁵ Polipeptidni poliHIPE v obliki monolita (20 mg) smo namočili v deionizirano vodo (6 mL). Dodali smo MIU (0,03 g, 0,17 mmol) in pH raztopine s pomočjo NaOH/HCl uravnali na 9,5. Reakcijsko zmes smo mešali pri 40 °C.

4 Rezultati in razprava

V sklopu raziskovalnega dela smo razvili postopek za pripravo poliHIPE-materialov na osnovi PCL-a in polipeptidov z ROP v kontinuirni fazi HIPE-a. V prvem sklopu smo na primeru laktona CL raziskali sistem brezvodnega HIPE-a, pri čemer smo upoštevali omejitve ROP.¹⁶⁶ V drugem sklopu smo HIPE-e, primerne za ROP, razširili na uporabo za ROP NCA-monomerov (slika 4-1). Vsak NCA zahteva optimizacijo pogojev, zato smo se najprej osredotočili na BLG NCA, zamrežen s Cys NCA.¹⁶⁷ V tretjem sklopu smo razširili nabor NCA-monomerov in NCA-zamreževalcev ter izpostavili dejavnike, ki so pogoj za pripravo obstojnega polipeptidnega poliHIPE-materiala.



Slika 4-1: Shematski povzetek raziskovalnega dela.

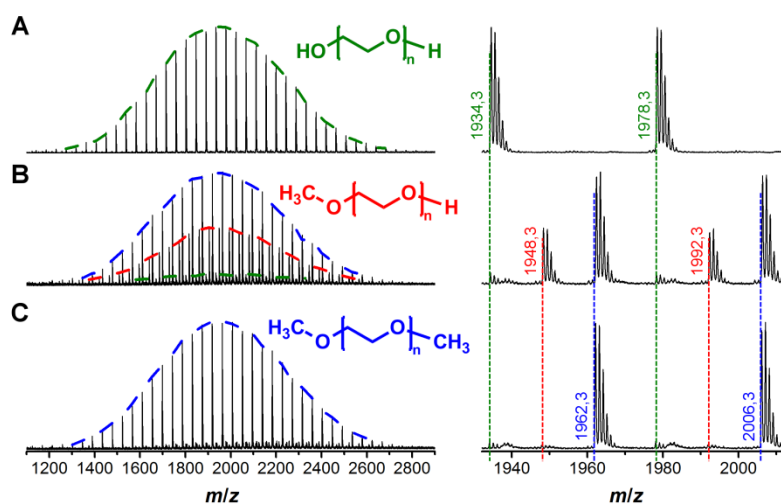
4.1 PoliHIPE na osnovi PCL

Za uspešno ROP CL v HIPE-u ne smejo biti prisotne spojine, ki bi sprožile neželjeno iniciacijo ali stranske reakcije. Ker voda lahko deluje kot iniciator ROP CL, smo se odločili, da pripravimo brezvodne emulzije, tipa o/o. CL je tekoč monomer in lahko polimerizira v talini, zato smo ga uporabili kot takega za kontinuirno fazo HIPE, brez raztapljanja v topilu. CL ni mešljiv z ogljikovodiki, zato smo za interno fazo izbrali zmes ogljikovodikov (petrol bencin, PB) s temperaturo vrelišča (100–140) °C. Primerni surfaktanti za stabilizacijo o/o HIPE-ov so se izkazali PEG-*b*-PPG-*b*-PEG polimeri (Pluronic).¹³⁷ Končne hidroksilne skupine Pluronicov lahko sodelujejo v ROP CL kot iniciatorji,¹⁶⁸ kar bi vodilo do neželene kovalentne vezave surfaktanta v poliHIPE-ogrodje,¹⁶⁹ kar smo preprečili z metilacijo končnih skupin surfaktanta.

4.1.1 Metilacija surfaktanta

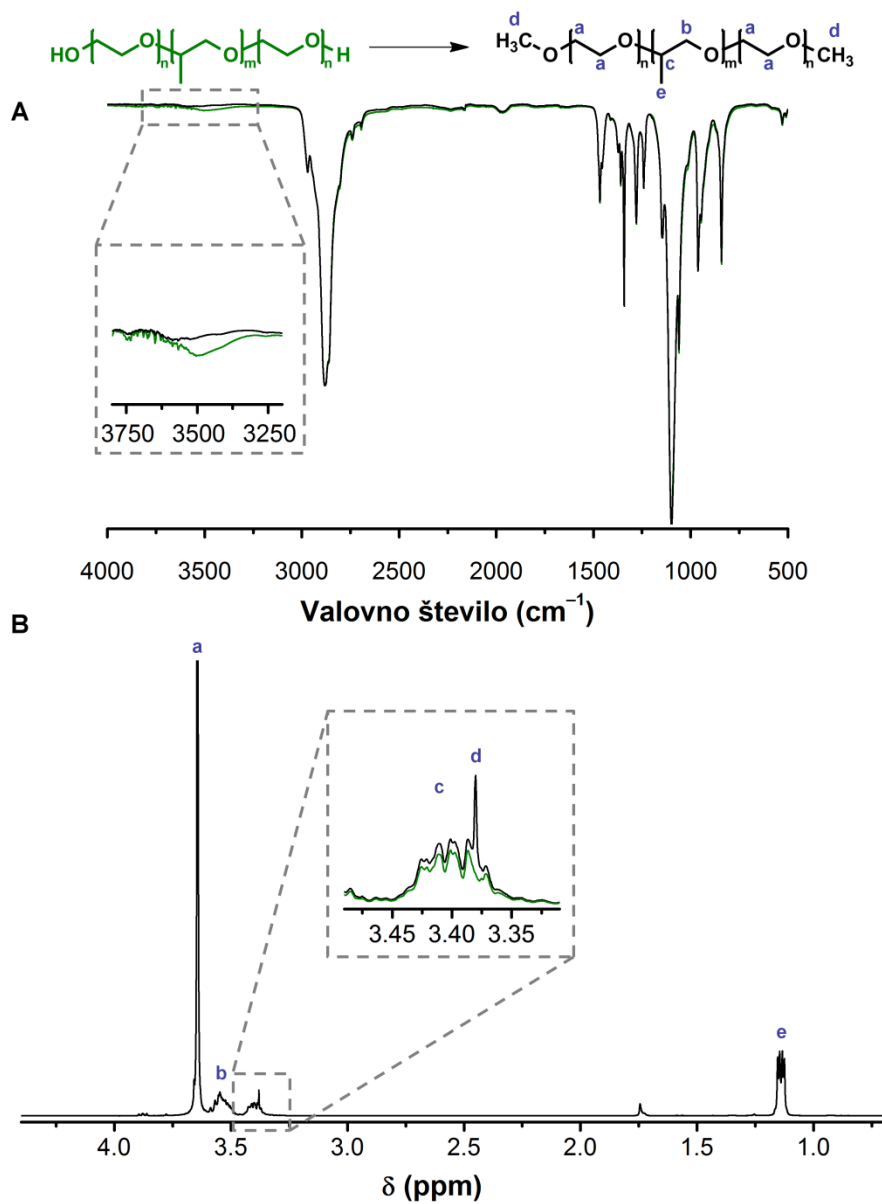
Končne hidroksilne skupine izbranega surfaktanta Pluronica F127 smo modificirali z reakcijo metilacije. Hidroksilni skupini sta na PEG-blokkih Pluronica, zato smo pogoje reakcije določili na modelnem PEG molekulske mase 2 kDa, ki je omogočal lažjo spremljanje poteka reakcije z MALDI-TOF MS (slika 4-2A). Kot bazo smo uporabili natrijev hidrid (NaH), saj z natrijevim karbonatom in natrijevim hidroksidom reakcija metilacije hidroksilnih skupin ni bila

kvantitativna. Za uspešno reakcijo je bil potreben tudi zadosten prebitek jodometana (CH_3I). Pri 1,8 ekvivalentih NaH in 2,0 ekvivalentih CH_3I je po 4 h reakcije večina produkta metiliranega na obeh koncih verige, kar v MALDI-TOF masnem spektru vidimo kot povečanje molekulskih mas PEG-a za 28 Da, kar ustreza dvema $-\text{CH}_3$ skupinama (slika 4-2B). Spekter kaže tudi monometiliran produkt, katerega molekulske mase so večje od PEG-a za 14 Da, kot tudi izhodno spojino v sledovih. V nadaljnjih 18 h ni prišlo do sprememb, kar je nakazovalo na nezadostno količino reagenta za metilacijo. Po dodatku še 1,0 ekvivalenta CH_3I je bila razlika opazna že po 1,5 h. V naslednjih 24 h je reakcija potekla kvantitativno, saj v MALDI-TOF masnem spektru vidimo le eno populacijo molekulskih mas, ki ustreza strukturi MeO-PEG-OMe (slika 4-2C).



Slika 4-2: MALDI-TOF masni spektri izhodnega PEG-polimera (A), reakcijske zmesi po 4 h (2,0 ekvivalenta CH_3I) (B) in reakcijske zmesi po 48 h (3,0 ekvivalenti CH_3I).

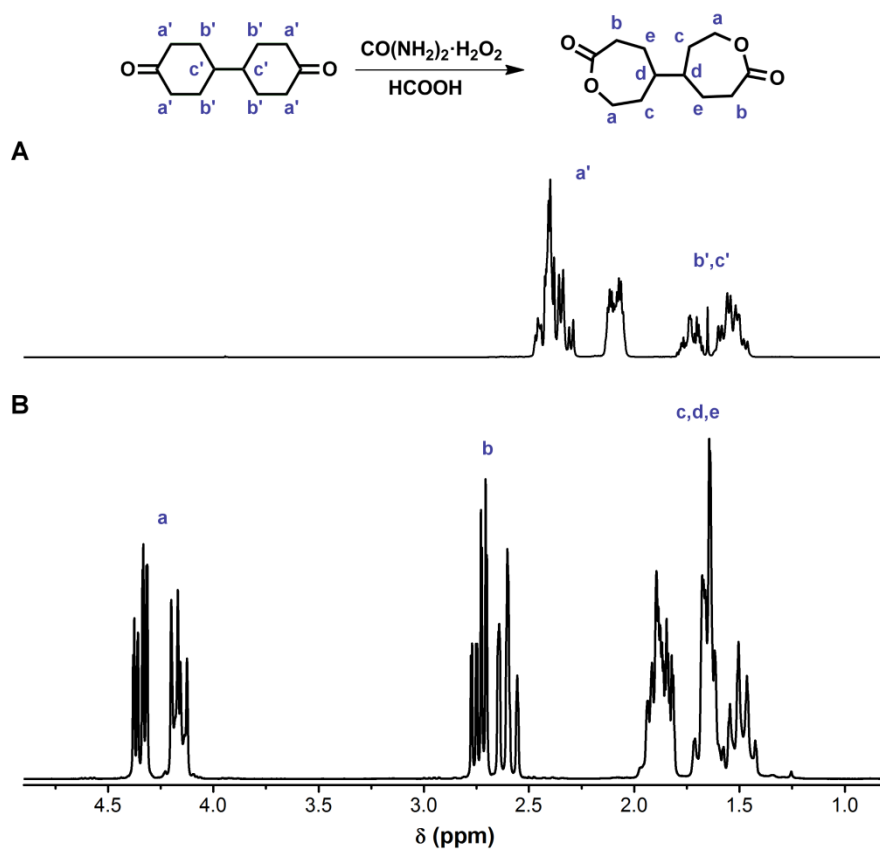
Za metilacijo Pluronic F127 surfaktanta, ki ima molsko maso 12,7 kDa in ni popolnoma topen v THF, smo uporabili 10 ekvivalentov NaH in 10 ekvivalentov CH_3I ter reakcijo pustili teči 48 ur. Med izolacijo produkta je bila raztopina polimera v organskem topilu obarvana oranžno, kar nakazuje na oksidacijo jodidnih ionov v jod ter tvorbo trijodidnih ionov ($2\text{I}^- \leftrightarrow \text{I}_2$ ter $\text{I}^- + \text{I}_2 \leftrightarrow \text{I}_3^-$). Čistost surfaktanta, namenjenega za uporabo v kombinaciji z ROP, je izjemno pomembna, zato smo raztopino metiliranega F127 (Me-F127) ekstrahirali z vodno raztopino natrijevega tiosulfata, ki je jod reduciral v vodotopne jodidne ione. Ker je metiliran produkt amfifilne narave, smo ekstrakcijo morali izvesti izjemno previdno, da ne bi nastala emulzija. Za izolacijo produkta v obliki prahu je bilo potrebno še obarvanje. S FTIR-spektroskopijo smo preverili, da Me-F127 ne vsebuje v strukturi hidroksilnih skupin, ki kažejo trak v spektru pri valovnem številu okoli 3500 cm^{-1} (slika 4-3A). Uspešnost metilacije smo potrdili tudi z ^1H NMR, saj spekter kaže nov signal, ki pripada protonom metilnih skupin pri kemijskem premiku 3,38 ppm (slika 4-3B). Me-F127 smo uporabili za pripravo o/o HIPE-ov na osnovi CL in kasneje tudi NCA-monomerov.



Slika 4-3: FTIR-spekter (A) in ^1H NMR-spekter (B) surfaktanta pred metilacijo in po njej.

4.1.2 Sinteza BOD

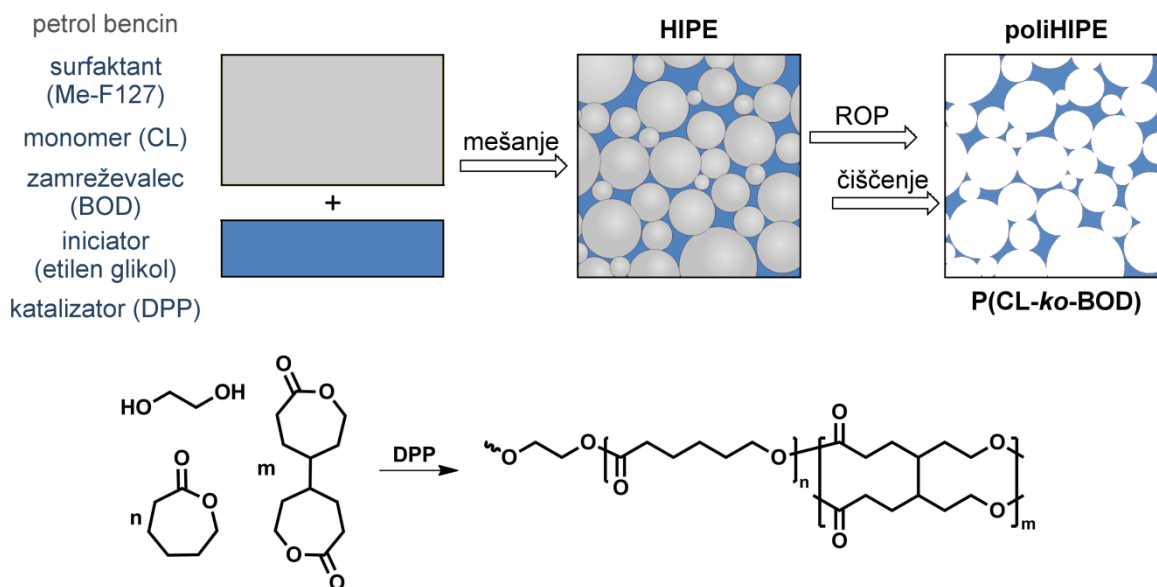
Za zamreževanje PCL verig, nastalih med ROP CL v HIPE-u, smo uporabili CL-monomeru soroden bis-laktonski zamreževalec BOD. Tega smo predhodno sintetizirali po znanem postopku z Baeyer-Villiger oksidacijo [1,1'-bi(cikloheksan)]-4,4'-diona.¹⁶³ BOD smo ekstrahirali iz reakcijske zmesi in ga dodatno očistili na plasti silikagela, da smo odstranili morebitne ostanke kisline in sečnine. ¹H NMR-spektra [1,1'-bi(cikloheksan)]-4,4'-diona in zamreževalca BOD kažeta, da se signal iz 2,3 ppm (a'), ki pripada protonom metilenske skupine ob karbonilni skupini [1,1'-bi(cikloheksan)]-4,4'-diona, premakne k višjemu kemijskemu premiku (4,3 ppm, a), ki je značilen za metilensko skupino ob estrski skupini v BOD (slika 4-4).



Slika 4-4: ¹H NMR-spektra [1,1'-bi(cikloheksan)]-4,4'-diona (A) in zamreževalca BOD-a (B).

4.1.3 Priprava PCL poliHIPE-ov

Za pripravo HIPE-ov smo kot kontinuirno fazo uporabili CL, kot interno fazo PB, za stabilizacijo emulzij pa Me-F127. Za iniciator ROP smo izbrali dvofunkcionalni alkohol, to je etilen glikol, v molskem razmerju iniciator : monomer 1 : 88, kot organokatalizator pa smo uporabili DPP (slika 4-5).



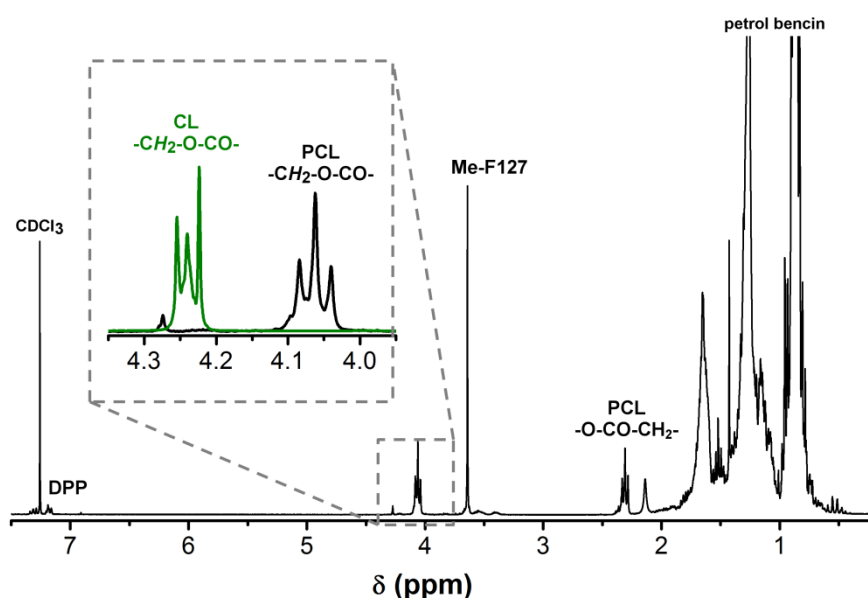
Slika 4-5: Shematski prikaz ROP CL-monomera in BOD-zamreževalca, kjer etilen glikol deluje kot iniciator in DPP kot organokatalizator. Reaktanti in modificiran surfaktant so raztopljeni v CL, ki predstavlja zvezno fazo HIPE-a, medtem ko PB predstavlja interno fazo.

DPP omogoča polimerizacijo pri nižjih temperaturah in nudi dober nadzor nad ROP tako v raztopini³⁷ kot v talini.³⁸ Stabilnost HIPE-a je namreč odvisna od temperature, saj se pri višji temperaturi poveča mobilnost delcev (kapljic), kar pospeši ločevanje faz.⁸ Zato je, še posebej v primeru brezvodnih emulzij, zaželena nižja temperatura polimerizacije. Za uspešno pripravo poliHIPE-ov je potrebna ravno pravšnja količina organokatalizatorja, saj ROP CL poteka že na sobni temperaturi med pripravo emulzije. Viskoznost zvezne faze se med polimerizacijo CL povečuje, kar lahko onemogoči mešanje in dodajanje interne faze. Koncentracija DPP mora torej biti dovolj nizka, da ostane viskoznost zvezne faze primerna za učinkovito mešanje emulzije, po drugi strani pa mora biti katalizatorja dovolj, da kontinuirna faza zaželira v času stabilnosti emulzije. Ko polimer zaželira, se fazi namreč ne moreta več ločiti in morfologija emulzije se na tej točki fiksira. Pripravili smo HIPE s 75 vol. % interne faze, 16 mas. % surfaktanta, 5 mol % zamreževalca ter od 0 mol % do 5 mol % katalizatorja. Emulzije z nizkim deležem DPP so se čez čas fazno ločile, in sicer hitreje pri 50 °C kot pri sobni temperaturi (tabela 4-1). Izkazalo se je, da so 3 mol % DPP dovolj za pravočasen nastanek PCL-mreže, ki prepreči razpad emulzije tudi pri temperaturi polimerizacije 50 °C. Prednost polimerizacije na 50 °C je v tem, da je PCL staljen, medtem ko pri vodenju reakcije na sobni temperaturi kristalizira. Kristalizacija med polimerizacijo neugodno vpliva na morfologijo, kar se je kazalo v krhkosti poliHIPE-monolita, polimeriziranega na sobni temperaturi.

Tabela 4-1: Stabilnost PCL HIPE-ov (75 vol. % interne faze, 16 mas. % surfaktanta, 5 mol % zamreževalca) med polimerizacijo pri različnih količinah uporabljenega katalizatorja ($x(\text{DPP})$) v odvisnosti od temperature (T).

T (°C)	$x(\text{DPP})$ (mol %)			
	0	1	3	5
20	4 h	22 h	∞	∞
50	0,5 h	6 h	∞	∞

Za popolno konverzijo CL s 3 mol % DPP pri temperaturi reakcije 50 °C zadostuje reakcijski čas 16 h, kar smo preverili z ^1H NMR. V ta namen smo v CDCl_3 ekstrahirali topen del poliHIPE-a, to je nezreagirani CL, nepremrežene verige PCL, surfaktant, DPP in PB. Odsotnost signala v ^1H NMR spektru ekstrakta na δ 4,22 ppm, značilnega za CL, potrjuje popolno konverzijo monomera v kontinuirni fazi (slika 4-6).



Slika 4-6: ^1H NMR-spekter CDCl_3 ekstrakta neočiščenega PCL HIPE-a s 3 mol % DPP po 16 h polimerizacije na temperaturi 50 °C ter povečan spekter s primerjavo spektra CL.

Za nadaljnje eksperimente smo za polimerizacijo emulzij uporabili 3 mol % DPP in temperaturo 50 °C. Najnižji delež surfaktanta, ki je pri teh pogojih še stabiliziral HIPE s 75 vol. % interne faze, je bil 5 mas. %. Z višanjem deleža interne faze se poveča medfazna površina, kar zahteva več surfaktanta za stabilizacijo emulzije. Prekomerne količine surfaktanta v HIPE-u niso zaželeni, saj ga je po polimerizaciji potrebno odstraniti iz poliHIPE-materiala. Poleg tega postane poliHIPE zaradi previsokega deleža surfaktanta manj povezan in drobljiv.¹⁷⁰ Stabilen HIPE s še smotrno količino surfaktanta je bilo možno pripraviti do 90 vol. % PB (tabela 4-2).

Tabela 4-2: Najnižji masni delež surfaktanta ($w(\text{surf.})$) v kontinuirni fazi za stabilizacijo PCL HIPE-ov z različnimi deleži interne faze ($x(\text{PB})$). HIPE-i so polimerizirani s 3 mol % DPP na temperaturi 50 °C ter označeni kot stabilni, če po 16 h polimerizacije ni vidne fazne separacije.

$x(\text{PB})$ (vol. %)	$w(\text{surf.})$ (mas. %)	Stabilnost HIPE
75	5	✓
80	6	✓
85	13	✓
90	16	✓
95	19	✗

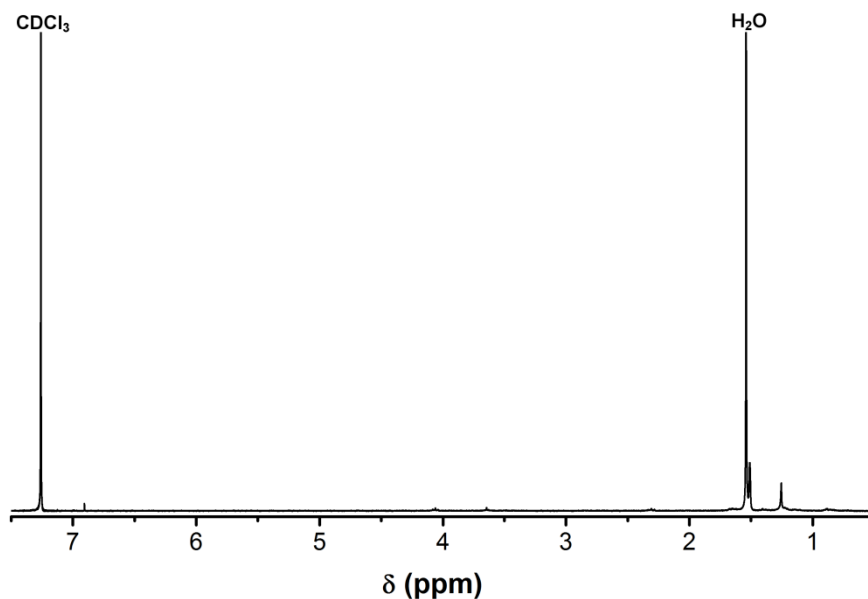
Po polimerizaciji HIPE-a sledi čiščenje monolitov, pri čemer odstranimo katalizator, topila (v tem primeru le interno fazo), surfaktant in morebitne nepremrežene verige polimera. Pri tem je bistveno, da ne vplivamo preveč na dimenzije monolita. Odstranitev katalizatorja po ROP laktonov je izredno pomembna, saj bi sicer lahko prišlo do neželene stranske reakcije transesterifikacije med poliestrskimi verigami oziroma degradacije.³³ Kot prvo topilo smo zato izbrali dietil eter, ki odstrani tako DPP kot PB. Po čiščenju z dietil etrom je sledilo čiščenje z etanolom, ki odstrani surfaktant in linearni PCL. Etanol smo nato difuzijsko izmenjali z deionizirano vodo in vzorce osušili z zamrzovanjem, da smo preprečili skrček monolitov. Delež gela PCL poliHIPE smo izračunali po enačbi 4.1:

$$\text{delež gela (\%)} = 100 \cdot \frac{m(\text{poliHIPE}) \cdot m(\text{EG+CL+BOD+DPP+surf.+PB})}{m(\text{HIPE}) \cdot m(\text{EG+CL+BOD})} \quad (4.1)$$

kjer je:

$m(\text{HIPE})$	masa vzorca pred polimerizacijo (g),
$m(\text{poliHIPE})$	masa vzorca po polimerizaciji in čiščenju (g),
$m(\text{EG+CL+BOD})$	vsota mas etilen glikola, CL in BOD v HIPE-u (g),
$m(\text{EG+CL+BOD+DPP+surf.+PB})$	vsota mas etilen glikola, CL, BOD, DPP, surfaktanta in PB v HIPE-u (g).

Delež gela je znašal nad 91 %, kar nakazuje, da smo med čiščenjem odstranili tudi nekaj nezamreženih verig. Čistost monolitov smo dokazali z ¹H NMR ekstrakta suhega poliHIPE-a v CDCl₃, v katerem ni videti nobenih signifikantnih ostankov (slika 4-7).

Slika 4-7: ^1H NMR-spekter CDCl_3 ekstrakta čistega in osušenega PCL poliHIPE-a.

4.1.4 Karakterizacija PCL poliHIPE-ov

Pri nadaljnjem delu smo se osredotočili na HIPE z najvišjim deležem interne faze, tj. 90 vol. % PB, 16 mas. % Me-F127 in 3 mol % DPP. Pri teh pogojih smo spreminjali količino BOD oz. stopnjo zamreženja poliHIPE-vzorcev, kar vpliva na termomehanske lastnosti PCL. HIPE-i z manj kot 5 % BOD niso bili dovolj stabilni, kar je verjetno posledica slabše premreženih polimernih verig. Zgornjo mejo deleža BOD, ki smo ga lahko uporabili, določa topnost BOD-a v CL v prisotnosti surfaktanta, ki je pri temperaturi do 50 °C znašala 7,5 mol %. Podrobneje smo raziskali dva vzorca: PCL poliHIPE s 5 mol % BOD (oznaka PCL-5,0) in PCL poliHIPE s 7,5 mol % BOD (oznaka PCL-7,5). Delež gela obeh vzorcev je znašal nad 90 % (tabela 4-3), kar nakazuje na dobro premrežena materiala. Nekoliko višjo vrednost za poliHIPE-7,5 gre verjetno pripisati višjemu deležu zamreževalca, ki tvori obstojnejšo mrežo. Gostoto poliHIPE-monolitov v obliki cilindrov smo določili po enačbi 4.2:

$$\rho(\text{poliHIPE}) = \frac{4 \cdot m(\text{monolit})}{\pi \cdot h(\text{monolit}) \cdot d^2(\text{monolit})} \quad (4.2)$$

kjer je:

$\rho(\text{poliHIPE})$ gostota poliHIPE (g cm^{-3}),

$m(\text{monolit})$ masa očiščenega in osušenega monolita v obliki cilindra (mg),

$h(\text{monolit})$ višina monolita v obliki cilindra (mm),

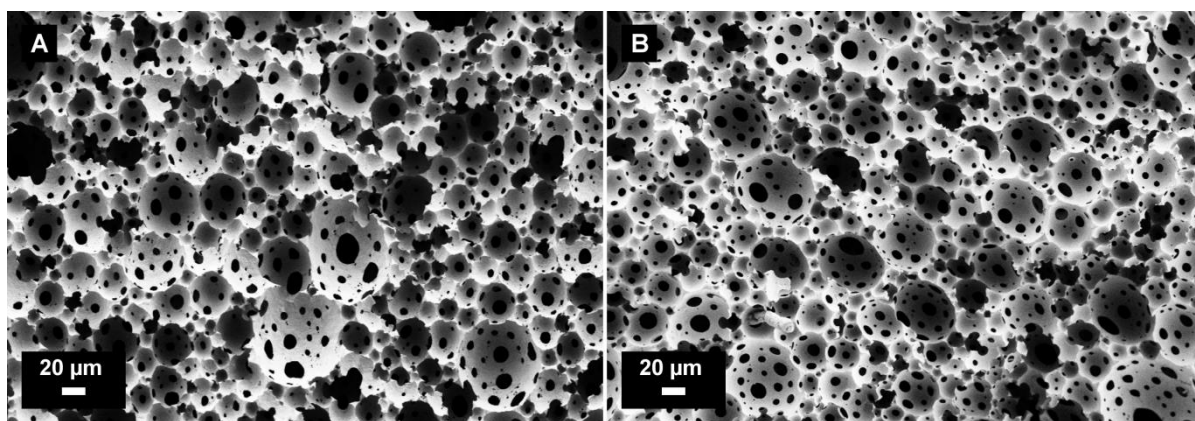
$d(\text{monolit})$ premer monolita v obliki cilindra (mm).

Iz gostote poliHIPE-a smo izračunali poroznost po enačbi 2.3, pri čemer smo upoštevali gostoto neporoznega PCL, ki znaša $1,15 \text{ cm}^{-3}$. Teoretična poroznost bi morala biti enaka deležu interne faze, tj. 90 % v obeh primerih. Določeni vrednosti sta nekoliko nižji (tabela 4-3), kar smo pripisali manjšemu skrčku monolitov med čiščenjem.

Tabela 4-3: Delež gela, gostota (ρ) in izračunana poroznost (Φ) vzorcev PCL poliHIPE.

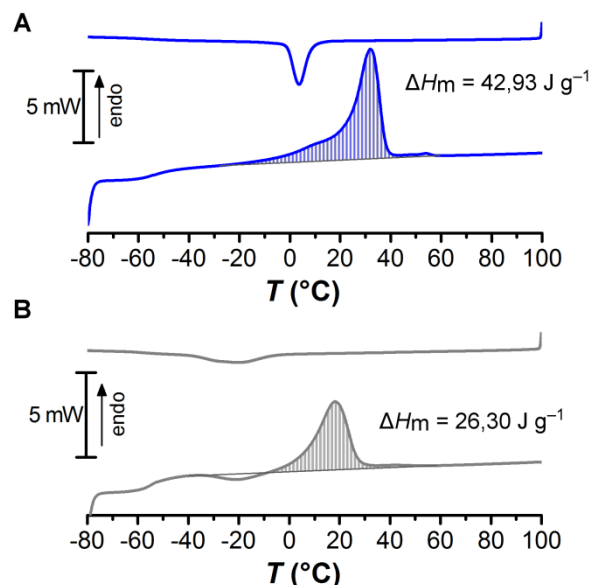
	Delež gela (mas. %)	ρ (g cm ⁻³)	Φ (%)
PCL-5,0	91,1 ± 5,2	0,17 ± 0,01	85,1 ± 0,7
PCL-7,5	97,0 ± 2,8	0,18 ± 0,01	83,9 ± 0,4

Morfologijo poliHIPE-vzorcev smo si ogledali s SEM. Mikrografi kažejo tipično poliHIPE-morfologijo z glavnimi in povezovalnimi porami (slika 4-8). SEM-slike smo analizirali s pomočjo programske opreme Image J, pri čemer smo analizirali 3 vzorce vsakega poliHIPE-a ter pomerili po približno 200 por za vsak vzorec. Pri računanju velikosti por smo upoštevali korekcijski faktor $2/\sqrt{3}$.¹²¹ Povprečna velikost por poliHIPE-a PCL-5,0 znaša $32,6 \mu\text{m} \pm 13,0 \mu\text{m}$, podobno so pore poliHIPE-a PCL-7,5 v povprečju velikosti $28,9 \mu\text{m} \pm 14,0 \mu\text{m}$.



Slika 4-8: SEM-mikrografa vzorcev poliHIPE PCL-5,0 (A) in PCL-7,5 (B).

Znano je, da je PCL delno kristaliničen polimer. Termične lastnosti, kot so stopnja kristaliničnosti (χ_c), temperatura taljenja (T_m) in temperatura kristalizacije (T_c) PCL poliHIPE-ov, smo določili z DSC (slika 4-9).



Slika 4-9: DSC-termograma poliHIPE-ov PCL-5,0 (A) in PCL-7,5 (B). Prikazano je prvo ohlajanje (s hitrostjo -2 °C min^{-1}) in drugo segrevanje (10 °C min^{-1}) ter talilna entalpija (ΔH_m).

Kristaliničnost vzorcev PCL smo izračunali po enačbi 4.3:

$$\chi_c (\%) = 100 \cdot \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \quad (4.3)$$

kjer je:

χ_c kristaliničnost PCL (%),

ΔH_m entalpija, določena iz površine pod vrhom taljenja (J g^{-1}),

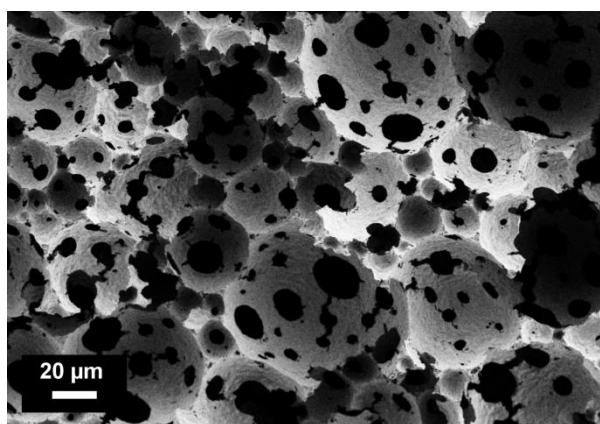
ΔH_m^0 entalpija 100 % kristaliničnega PCL, katere vrednost iz literature znaša $139,5\text{ J g}^{-1}$.¹⁷¹

PCL poliHIPE-e smo segrevali s hitrostjo 10 °C min^{-1} in ohlajali z -10 °C min^{-1} ali -2 °C min^{-1} . Hitrost ohlajanja ni imela bistvenega vpliva na kristalizacijo PCL-5,0, nasprotno pa je PCL-7,5 kristaliziral le med počasnejšim ohlajanjem. Pri pogojih ohlajanja s hitrostjo -2 °C min^{-1} smo določili, da je delež kristaliničnosti PCL-5,0 bistveno višji kot za PCL-7,5 ter da do kristalizacije in taljenja v primeru PCL-5,0 pride pri višjih temperaturah (tabela 4-4). Nižje vrednosti χ_c , T_c in T_m so pri bolj zamreženem PCL-7,5 pričakovane, saj komonomer BOD preprečuje urejanje in kristalizacijo PCL-verig.¹⁷²

Tabela 4-4: Termične lastnosti poliHIPE-ov PCL-5,0 in PCL-7,5: stopnja kristaliničnosti (χ_c), temperatura taljenja (T_m) in temperatura kristalizacije (T_c), določene z DSC.

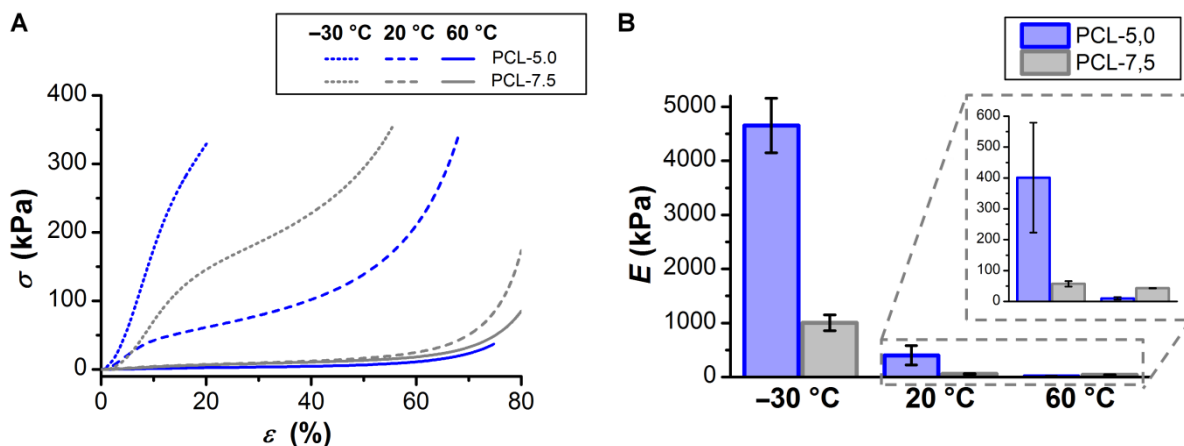
	χ_c (%)	T_m (°C)	T_c (°C)
PCL-5,0	$30,2 \pm 0,6$	$32,4 \pm 0,2$	$3,7 \pm 1,3$
PCL-7,5	$18,9 \pm 0,3$	$18,4 \pm 0,1$	$-19,0 \pm 1,2$

Kristaliničnost poliestra vpliva, med drugim, na hitrost razgradnje materiala. PCL je znan kot razgradljiv polimer in se uporablja npr. za ortopedске naprave,⁹ saj njegova razgradnja pri fizioloških pogojih traja od nekaj mesecev do nekaj let.¹⁰ Razgradnjo lahko spremljamo tudi pod bolj ostrimi pogoji, ki pospešijo hidrolizo. Opazovali smo obnašanje PCL poliHIPE-materiala pri sobni temperaturi v bazičnih pogojih v 0,1 M NaOH. Na sliki 4-10 je SEM-mikrograf sredice poliHIPE-a PCL-5,0 po 8 dneh razgradnje, ko je monolit še v enem kosu, vendar izgubi že 40 % začetne mase, saj porozna struktura omogoča dostop medija po celotni notranjosti poliHIPE-a. Vidimo, da pride do razpok v najtanjših delih sten. Temu sledi razpad materiala na več kosov, razgradnja do oligomerov in nazadnje do 6-hidroksikaprojske kisline.⁹ Monolit PCL-5,0 je popolnoma fragmentiral po 18 dneh, medtem ko PCL-7,5 že po 10 dneh. Vzorca imata zelo podobno poroznost in morfologijo, glavna razlika med njima je v stopnji zamreženosti, ki vpliva na kristaliničnost. Višja stopnja kristaliničnosti zmanjša doveznost PCL za hidrolitsko razgradnjo,⁸⁰ zato je fragmentacija PCL-5,0 potekala počasneje, kljub nižji stopnji zamreženja.



Slika 4-10: SEM-mikrograf poliHIPE-a PCL-5,0 po 8 dneh razgradnje v 0,1 M NaOH.

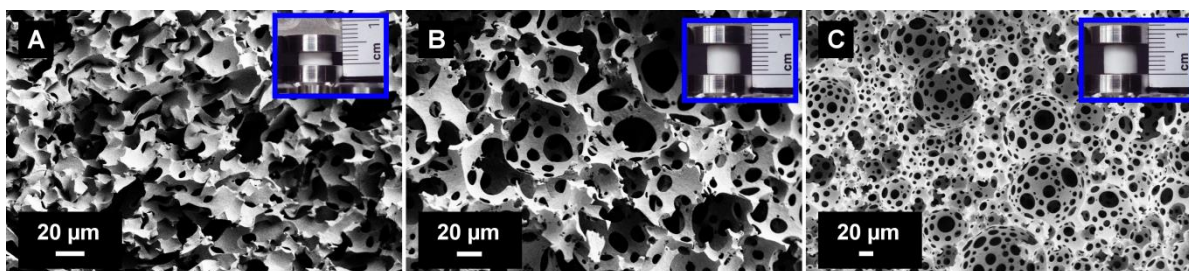
Stopnja zamreženosti in s tem kristaliničnost nadalje vplivata tudi na mehanske lastnosti materiala. Ker so poliHIPE-i penasti, smo opazovali njihove mehanske lastnosti med stiskanjem, in sicer pri treh različnih temperaturah, izbranih glede na termične lastnosti: pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (slika 4-11A). Pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vidimo začetno linearno elastično območje krivulje napetost-deformacija poliHIPE-a PCL-5,0, ki je pri tej temperaturi delno staljen. Ta del krivulje je odvisen od samega materiala in iz njenega naklona določimo Youngov modul, ki znaša $401\text{ kPa} \pm 178\text{ kPa}$ (slika 4-11B). Pri nadaljnjem stiskanju pene pride do upogibanja sten, kar se odraža kot plato krivulje napetost-deformacija. Ko se stene upognejo in pore stisnejo, pride do zgostitve materiala, zato napetost za nadaljnjo deformacijo ostro naraste.¹⁷³ Pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ PCL-5,0 dodatno kristalizira in postane trši. Posledično je potrebna večja napetost za deformacijo materiala, krivulja je bolj strma in Youngov modul ima bistveno višjo vrednost ($4656\text{ kPa} \pm 504\text{ kPa}$). Nasprotno se pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ kristalinične domene PCL-5,0 popolnoma stalijo in material postane mehkejši, Youngov modul pade na $10\text{ kPa} \pm 4\text{ kPa}$. PCL-7,5 tvori manj kristaliničnih domen kot PCL-5,0, zato je v glavnem mehkejši – Youngov modul pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ znaša $1004\text{ kPa} \pm 149\text{ kPa}$. Popolnoma staljen je že pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, zato sta rezultata tako pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kot $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ zelo podobna ($57\text{ kPa} \pm 9\text{ kPa}$ in $43\text{ kPa} \pm 1\text{ kPa}$). PCL-7,5 ima višji modul kot PCL-5,0 le pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, ko sta oba vzorca staljena. Višji modul v tem primeru je na račun višje stopnje zamreženja PCL-7,5.



Slika 4-11: Krivulje napetost-deformacija (σ vs. ϵ) poliHIPE-ov PCL-5,0 in PCL-7,5 pri različnih temperaturah (A). Youngovi moduli (E), določeni iz naklona začetnega linearnega dela krivulj napetost-deformacija (B).

4.1.4.1 Oblikovni spomin PCL poliHIPE-ov

Za razliko od linearnih polimerov poliHIPE-a PCL-5,0 in PCL-7,5 tudi v staljenem stanju ohranita mehansko obstojnost, saj sta kovalentno zamrežena. Staljena poliHIPE-a se zmečkata, kar omogoča, da ju lahko nad temperaturo tališča oblikujemo v začasno obliko. Staljena poliHIPE-a smo stisnili na polovico začetne višine in ju ohladili pod temperaturo kristalizacije. PCL pri tem tvori kristalinične domene, ki delujejo kot nekovalentna mreža in fiksirajo novo obliko poliHIPE-a. Po odstranitvi sile se poliHIPE ne povrne v originalno obliko, temveč ohrani začasno obliko s stisnjenimi porami. Slika 4-12A prikazuje morfologijo PCL-5,0, ki ohrani začasno obliko pri sobni temperaturi; začasne oblike PCL-7,5 pri sobni temperaturi ne moremo opazovati, ker je kristaliničen šele pri nižjih temperaturah. Vidimo, da so pore poliHIPE-a v začasni obliki stisnjene. Ko poliHIPE spet segrejemo nad temperaturo tališča, se kristalinične domene stalijo, kovalentna mreža pa se povrne v prvotno stanje. PoliHIPE-morfologija se pri tem ohrani tako v primeru PCL-5,0 (slika 4-12B) kot tudi PCL-7,5 (slika 4-12C). Pojav, kjer material fiksiramo v začasno obliko ter z dražljajem povrnemo prvotno obliko, imenujemo oblikovni spomin.

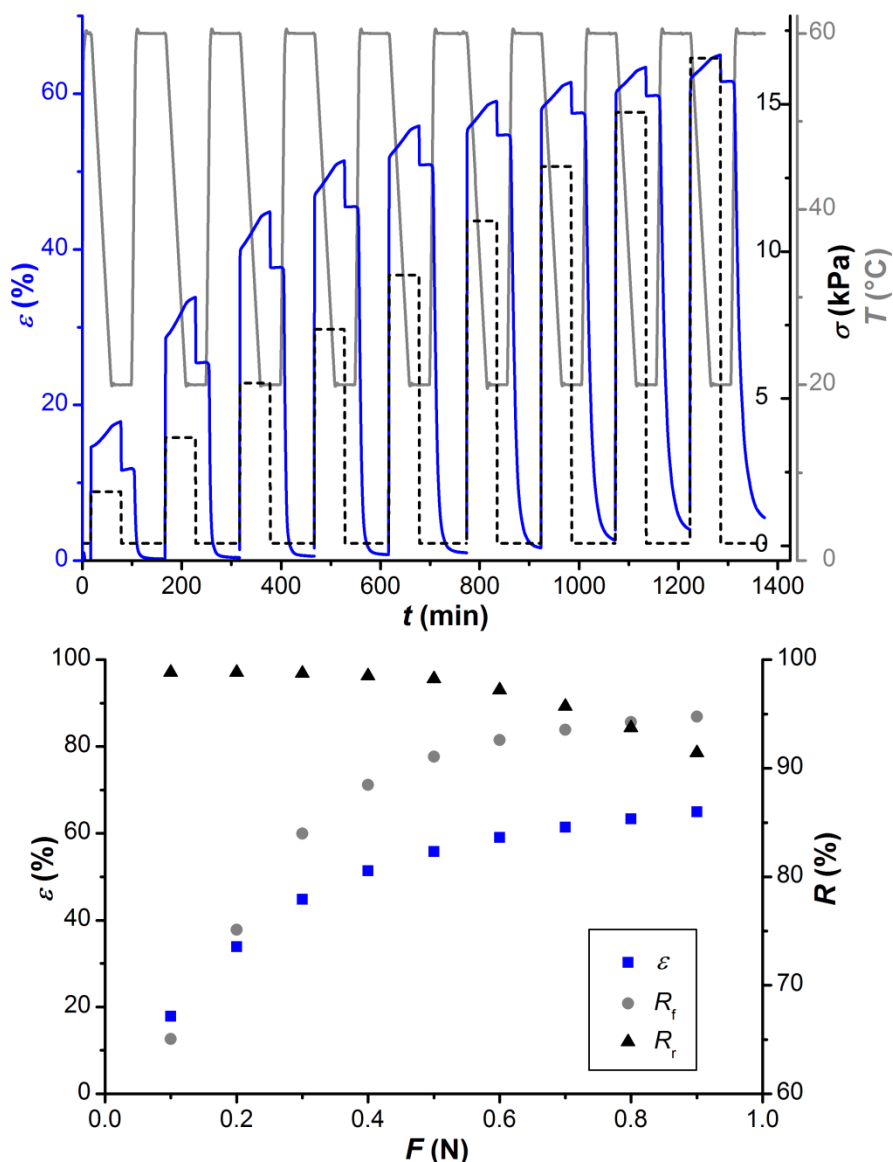


Slika 4-12: SEM-mikrografi poliHIPE-a PCL-5,0 v začasni obliki, pri čemer je vzorec stisnjen na 50 % začetne višine in fiksiran pri 20 °C (A), povrnjena oblika PCL-5,0 po segrevanju na 60 °C (B), ter povrnjena oblika PCL-7,5, ki je bil pred tem stisnjen na 50 % začetne višine in nato segret na 40 °C (C).

Oblikovni spomin PCL poliHIPE-ov smo kvantitativno študirali s termomehanskimi cikličnimi testi. S faktorjem fiksacije (R_f) smo ovrednotili uspešnost fiksiranja začasne oblike po

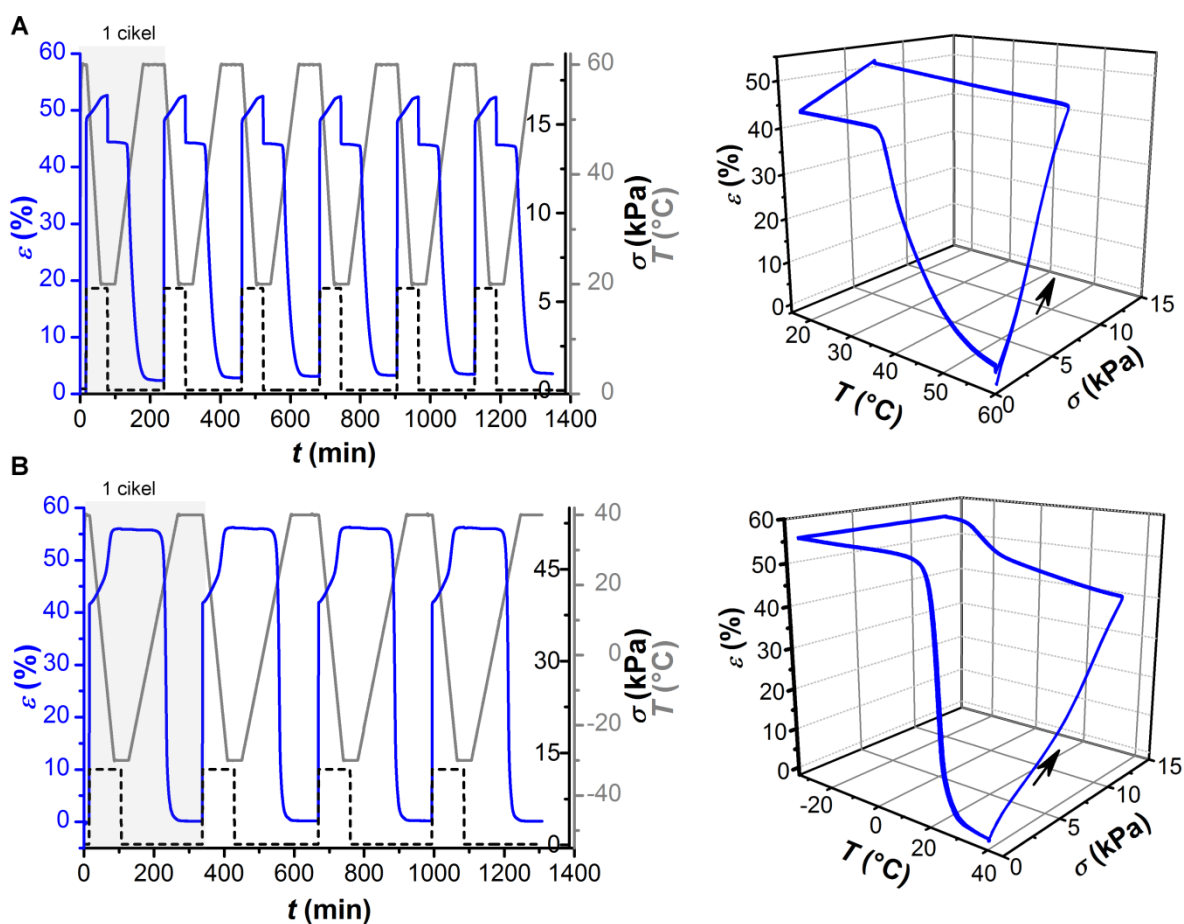
ohlajanju in odstranitvi sile, s faktorjem povrnitve (R_r) pa uspešnost povrnitve materiala v prvotno obliko po segrevanju. Določili smo ju po enačbah 2.1 in 2.2.

Obnašanje materiala je odvisno od napetosti, ki smo jo pri tem uporabili. PoliHIPE PCL-5,0 smo v zaporednih ciklih segrevali na 60 °C, ga stisnili s konstantno silo med 0,1 N (kar ustreza napetosti 1,8 kPa) in 0,9 N (kar ustreza napetosti 16,6 kPa) ter pri tem ohladili na 20 °C. Silo smo odstranili in vzorec segrevali, pri tem pa beležili njegovo višino (slika 4-13). Višja napetost povzroči večjo deformacijo materiala, v skladu s kompresijskim testom. S tem se začasna oblika bolje fiksira in R_f povečuje, a obenem opazimo nekoliko slabšo povrnitev v prvotno obliko oz. nižji R_r . Sila, ki omogoča visoki vrednosti R_f in R_r , ustreza ~50 % deformaciji, kar smo uporabili kot vodilo v nadaljnjih testih.



Slika 4-13: Napetost (σ), deformacija (ϵ), temperatura (T), faktor fiksacije (R_f) in celokupni faktor povrnitve (R_r) pri ciklih oblikovnega spomina poliHIPE-a PCL-5,0, kjer smo silo (F) v vsakem ciklu povečali od 0,1 N (kar ustreza napetosti 1,8 kPa) do 0,9 N (kar ustreza napetosti 16,6 kPa).

Prvi korak cikličnih testov oblikovnega spomina je segrevanje poliHIPE-a nad temperaturo tališča, tj. 60 °C za PCL-5,0 in 40 °C za PCL-7,5, kjer se material zmehta in ga je možno preoblikovati (slika 4-14). Staljen poliHIPE smo stisnili do 50 % začetne višine in ga pričeli počasi ohlajati, da je kristaliziral. Na nizki temperaturi smo ga pustili izotermno kristalizirati 20 min. Med tem časom je prišlo do dodatne deformacije, kar je lahko posledica lezenja, termičnega skrčka in/ali usmerjene kristalizacije PCL-verig.^{97,105} V naslednjem koraku smo silo odstavili in iz višine vzorca po 20 min določili R_f . Uspešnost fiksiranja začasne oblike je odvisna od kristalizacije PCL, ki jo narekuje temperatura in hitrost ohlajanja. Kot je razvidno iz tabele 4-4, pri počasnem ohlajanju PCL-5,0 kristalizira okoli 4 °C, medtem ko PCL-7,5 pri -19 °C. Začasni obliki smo zelo dobro fiksirali pri temperaturah 0 °C oz. -30 °C, kjer smo dosegli vrednosti R_f nad 99 % (tabela 4-5). PCL-5,0 začne kristalizirati tudi pri višji temperaturi, zato smo začasno obliko poskusili fiksirati tudi pri 20 °C. Po 20 min kristalizacije je vrednost R_f dosegla 84 %, kar kaže, da je začasna oblika PCL-5,0 stabilna tudi pri sobni temperaturi.



Slika 4-14: Napetost (σ), deformacija (ϵ) in temperatura (T) med zaporednimi cikli oblikovnega spomina poliHIPE PCL-5,0 (A) in PCL-7,5 (B). Puščica predstavlja začetek in smer procesa.

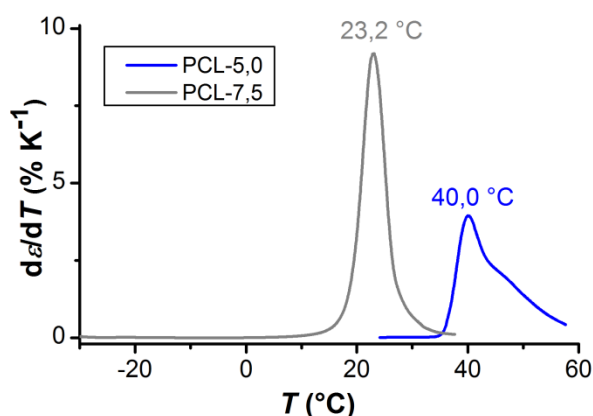
Povrnitev materiala iz začasne oblike v prvotno dosežemo tako, da stalimo kristalinične domene, ki tvorijo začasno mrežo. Vzorec PCL-5,0 smo s hitrostjo 0,5 °C min⁻¹ segreti do 60 °C, PCL-7,5 pa do 40 °C. Izbrali smo počasno hitrost segrevanja, da se je toplota enakomerno porazdelila po vzorcu in smo lahko bolj točno določili, pri kateri temperaturi pride do prehoda v prvotno obliko. Uspešnost povrnitve oblike smo opredelili z R_r .

Vrednosti R_r prvega cikla so nekoliko nižje, kar je znano kot pojav urjenja.¹⁰² Kljub temu so bile vrednosti faktorja povrnitve sledečih ciklov nad 99 %, tudi po štirih (PCL-7,5) oz. šestih ciklih (PCL-5,0).

Tabela 4-5: Faktor fiksiranja (R_f) in faktor povrnitve (R_r) zaporednih ciklov poliHIPE-ov pri različnih temperaturah fiksiranja (T_f) in povrnitve (T_r).

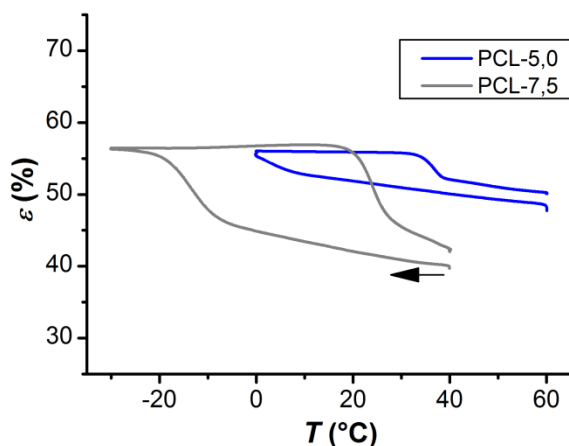
	T_f (°C)	T_r (°C)	Cikel	R_f (%)	R_r (%)
PCL-5,0	0	60	1	100,0	85,3
			2	100,0	99,2
PCL-5,0	20	60	1	84,8 ± 6,2	90,5 ± 10,5
			2	84,6 ± 6,3	99,5 ± 0,5
			3	84,5 ± 6,3	99,7 ± 0,3
			4	84,3 ± 6,5	99,9 ± 0,4
			5	84,3 ± 6,3	100,2 ± 0,8
			6	84,4 ± 6,4	99,8 ± 0,1
PCL-7,5	-30	40	1	99,8 ± 0,1	99,4 ± 0,4
			2	99,7 ± 0,1	99,9 ± 0,1
			3	99,8 ± 0,1	99,9 ± 0,1
			4	99,7 ± 0,1	100,1 ± 0,1

Temperaturo prehoda (T_{trans}) smo določili iz grafa deformacije v odvisnosti od temperature prvega cikla oblikovnega spomina. Funkcijo smo odvajali in iz maksimuma odvoda določili, pri kateri temperaturi je prišlo do najbolj izrazite spremembe deformacije (slika 4-15). PCL-5,0 se v prvotno obliko vrača pri 40,0 °C, medtem ko ima PCL-7,5 izrazit T_{trans} pri 23,2 °C. Hitrejši odziv PCL-7,5 gre verjetno pripisati višji stopnji zamreženosti, saj močnejša mreža bolj sili k povrnitvi v originalno obliko. T_{trans} sta v obeh primerih primerljivi s T_m , določenimi z DSC, pri čemer je potrebno upoštevati široke vrhove taljenja.



Slika 4-15: Odvod deformacije po temperaturi ($d\epsilon/dT$) za prvi cikel oblikovnega spomina. Maksimuma krivulj predstavlja temperaturi prehoda iz začasne v prvotno obliko.

Nadalje smo raziskali izvor dodatne deformacije, ki smo jo opazili med kristalizacijo. Če poliHIPE ohlajamo, ne da bi pri tem nanj delovali s silo, opazimo približno 3 % deformacijo, ki jo lahko pripišemo termičnemu skrčku zaradi kristalizacije materiala. Po drugi strani pa je deformacija poliHIPE-a, ki ga med ohlajanjem stiskamo s konstantno silo, bistveno večja (slika 4-16). PoliHIPE smo pod konstanto obremenitvijo po kristalizaciji še segreti. Dodatna deformacija, do katere je prišlo med kristalizacijo, se je med segrevanjem povrnila. To nakazuje na to, da je poleg temperature tudi obremenitev prispevala h kristalizaciji verig PCL v bolj urejeno strukturo. Sposobnost spreminjanja oblike zgolj zaradi temperaturne razlike (v tem primeru gre za dodatno deformacijo) je znana kot dvosmerni oblikovni spomin (angl. *two-way shape memory*). Pojav je bolj izrazit za PCL-7,5 z višjo stopnjo zamreženja, verjetno zaradi počasnejše kristalizacije in posledično daljšega časa, ki ga imajo verige PCL na voljo za tvorbo urejenih kristalnih domen.⁹⁷



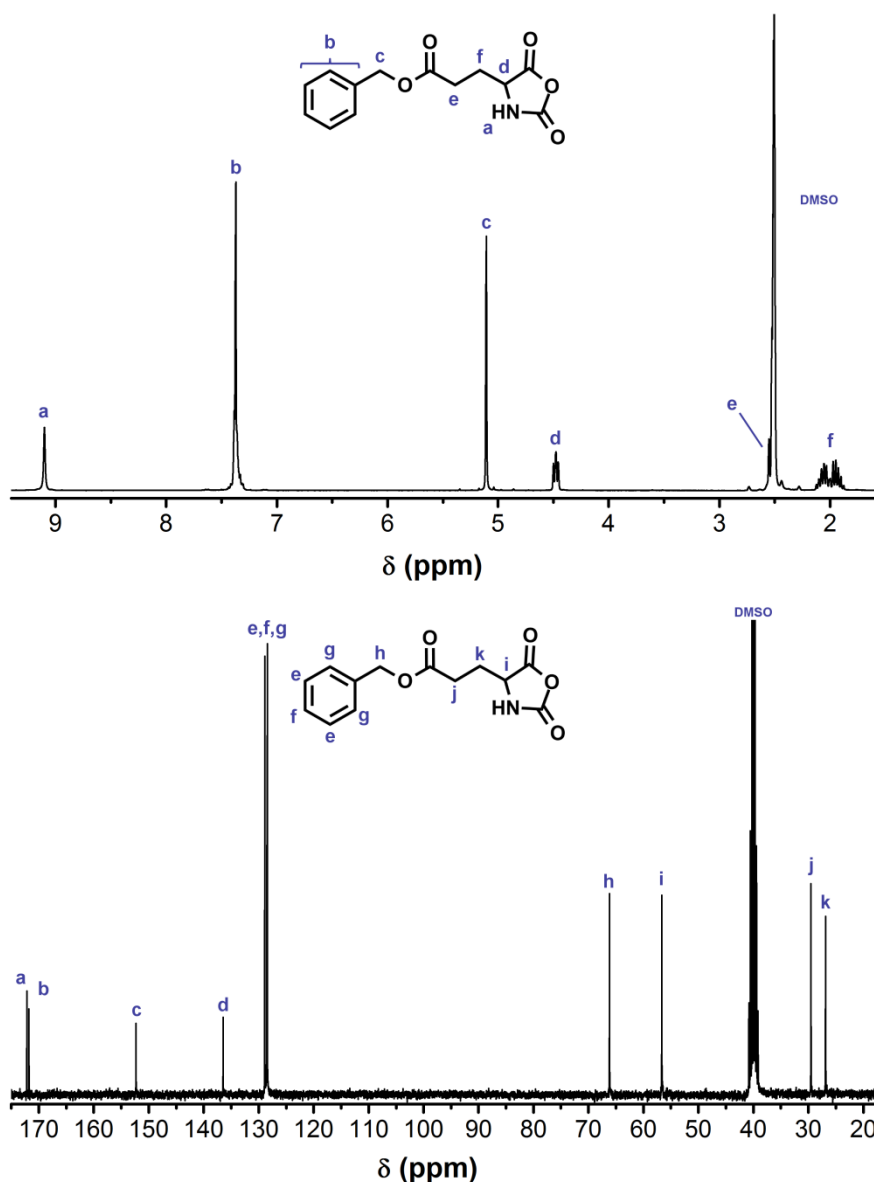
Slika 4-16: Deformacija (ϵ) PCL poliHIPE-ov med ohlajanjem in segrevanjem pod konstantno obremenitvijo. Puščica označuje začetek in smer procesa.

4.2 Polipeptidni poliHIPE-i na osnovi PBLG

ROP v HIPE-u smo uspešno izvedli za pripravo poliHIPE-materialov na osnovi PCL. Pokazali smo, da je PCL razgradljiv, s stopnjo zamreženja lahko vplivamo na njegove termomehanske lastnosti, poleg tega pa izkazuje oblikovni spomin.¹⁶⁶ Kljub temu imajo ogrodja na osnovi PCL-a, kot tudi ostalih poliestrov, pomanjkljivost pri uporabi za celične kulture in tkivno inženirstvo – ta je hidrofobnost materiala in odsotnost funkcionalnih skupin na površini, zaradi česar se celice težje pritrjujejo na površino. Boljšo pritrnitev celic, biološko združljivost in tudi encimsko razgradljivost omogočajo sintetični polipeptidi, ki v strukturi vsebujejo funkcionalne skupine. Najbolj praktičen in enostaven pristop za sintezo visokomolekularnih polipeptidov na večji skali je ROP NCA-monomerov. Za razliko od CL so NCA-monomeri v trdnem stanju in polimerizirajo po drugačnem mehanizmu, zato smo za ROP NCA-monomerov v HIPE-u raziskali nov sistem. Za pripravo polipeptidnih poliHIPE-materialov smo najprej preučili PBLG. PBLG je dobro raziskan polipeptid, ki so ga že uspešno uporabili v različne biomedicinske namene.¹⁷⁴ Poleg tega ima PBLG po odščiti proste karboksilne skupine, ki material naredijo bolj hidrofilen in pH-odziven ter omogočajo nadaljnje reakcije funkcionalizacije materiala.

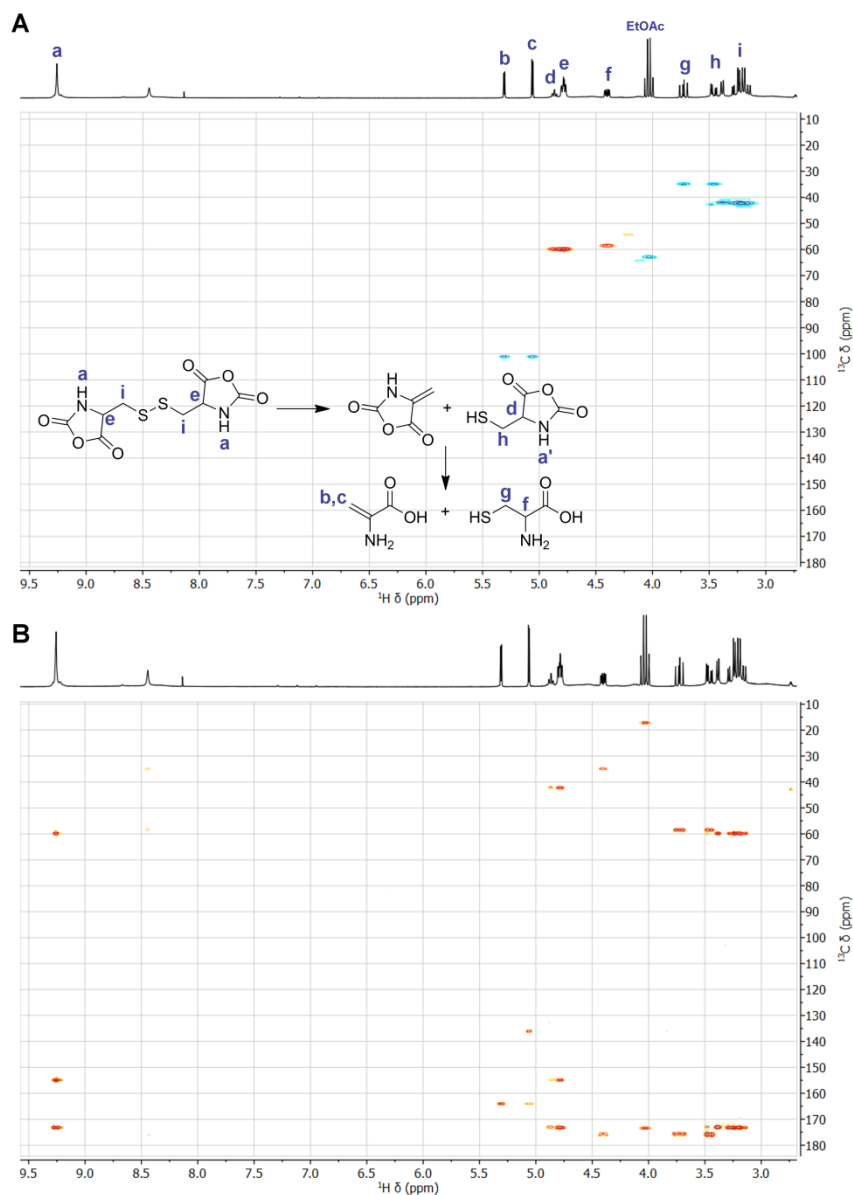
4.2.1 Sinteza NCA-monomerov

NCA-monomeri so zelo reaktivni in nimajo dolgega roka uporabe, zato jih sproti sintetiziramo sami iz ustrezno zaščiteneh α -aminokislin. BLG NCA smo sintetizirali s ciklizacijo BLG s trifosgenom. Čistost NCA-monomerov je izjemno pomembna, sicer lahko pride do stranskih reakcij med samo polimerizacijo, zato smo NCA-monomere trikrat prekristalizirali do ustrezne čistosti, ki jo potrjujeta ^1H in ^{13}C NMR-spektra (slika 4-17).


 Slika 4-17: ^1H in ^{13}C NMR-spektra BLG NCA.

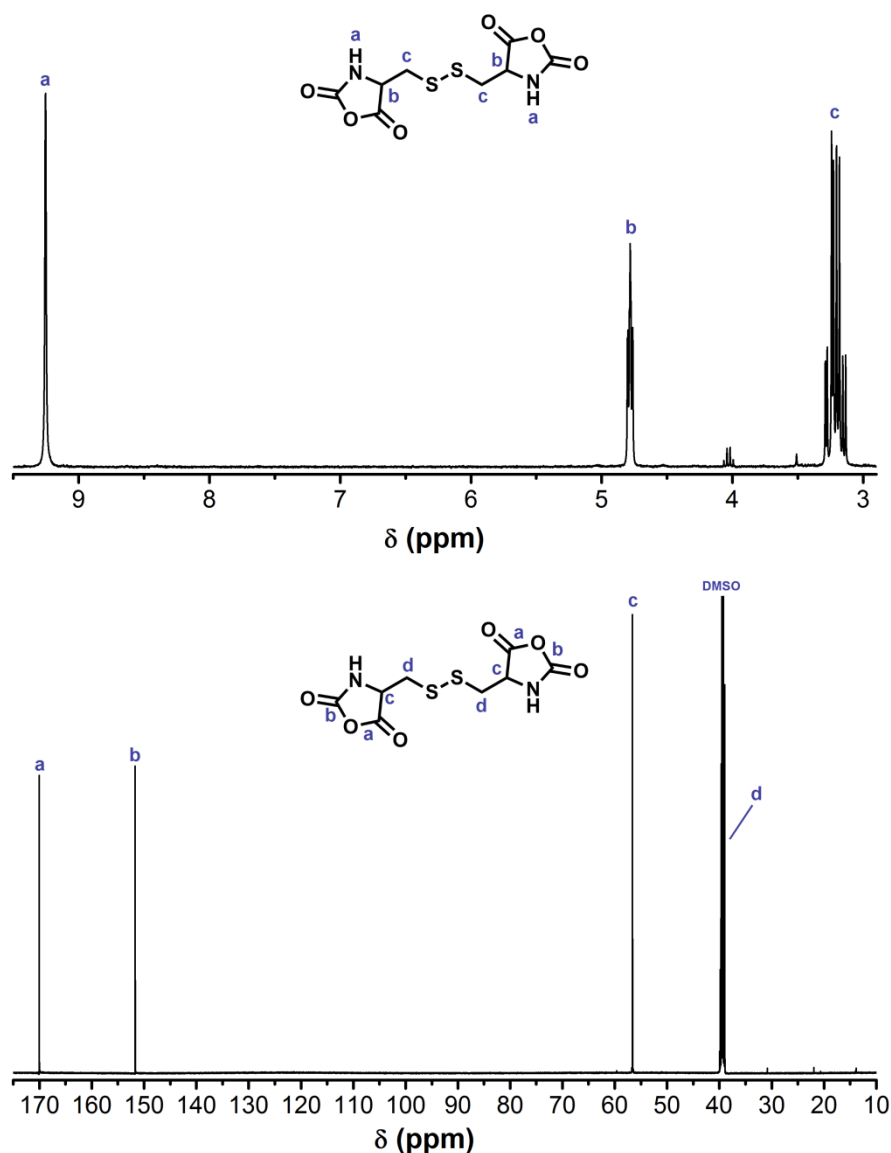
Za kovalentno zamreževanje polipeptidov med ROP smo izbrali naravno α -diaminokislino cistin (Cys). Nezaščitena α -aminokislina je slabo topna in reakcija ciklizacije s trifosgenom ne poteče kvantitativno, zaradi česar nam ni uspelo izolirati čistega NCA-monomera z zadovoljivim izkoristkom. O višjih izkoristkih Cys NCA-monomera so poročali v primeru sinteze po Leuchsovi metodi, kjer so $(\text{Z-Cys-OH})_2$ reagirali s tionil kloridom,⁸⁵ fosforjevim tribromidom¹⁷⁵ ali fosforjevim pentakloridom,¹⁷⁶ vendar avtorji ne omenjajo prekrizacije in čistosti produkta. Kot izhodno α -aminokislino smo nato uporabili $(\text{Boc-Cys-OH})_2$, ki je v etil acetatu bolje topen. Reakcija s trifosgenom poteče kvantitativno, vendar smo v manjši meri opazili tudi delno polimerizacijo monomera, zaradi česar smo morali optimizirati temperaturo in čas reakcije. Najboljši rezultat smo dobili, kadar je reakcija potekala 12 h na 60 °C. V koraku čiščenja smo opazili, da med počasno prekrizacijo v etil acetatu/*n*-heksanu prihaja do stranske reakcije, kar je razvidno iz dodatnih signalov v ^1H NMR-spektrih Cys NCA-zamreževalca po prekrizaciji. S pomočjo

heteronuklearne enojno-kvantne korelacijske NMR-spektroskopije (angl. *heteronuclear single-quantum correlation*, HSQC) in heteronuklearne multiple-kvantne korelacijske NMR-spektroskopije (angl. *heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy*, HMBC) smo nastale stranske produkte identificirali kot dehidroalanin in cistein, ki sta posledica β -eliminacije ob disulfidni vezi (slika 4-18).¹⁷⁷



Slika 4-18: ^1H - ^{13}C HSQC (A) in HMBC (B) NMR-spektra produktov stranske reakcije razpada Cys NCA.

Da bi se β -eliminaciji izognili, smo Cys NCA iz raztopine v etil acetatu obarjali v ledeni heksan, ga v najmanjši možni meri izpostavljali zraku in visokim temperaturam ter ga sintetizirali za sprotno uporabo. ^1H in ^{13}C NMR-spektra po dveh obarjanjih kažeta, da smo dobili Cys NCA ustrezne čistosti (slika 4-19).



Slika 4-19: ^1H in ^{13}C NMR-spektra Cys NCA-zamreževalca.

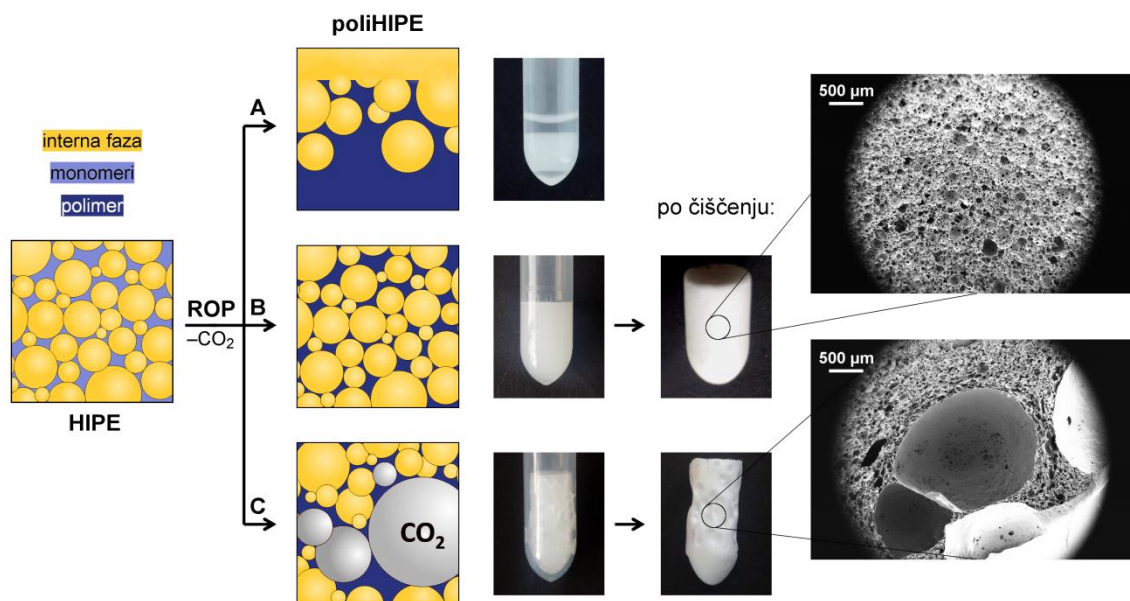
4.2.2 Priprava PBLG poliHIPE-a

Glede na topnost NCA-monomerov in nastalih polipeptidov se ROP običajno izvaja v topilih, kot so DMF, DMSO, diklorometan in kloroform. Klorirana topila se mešajo z večino organskih topil, zato je z njimi možno pripraviti zgolj vodne emulzije, le-te pa za ROP niso primerne. Polarna organska topila, kot sta DMF in DMSO, se ne mešata z ogljikovodiki, kot je PB, in sta primerna za pripravo o/o HIPE-a. Poleg tega so NCA-monomeri v DMF in DMSO bolje topni (do 2,5 M raztopine) kot v kloriranih topilih (<1,0 M). Visoka koncentracija monomerov oz. polimera je pomembna za nastanek obstojnega poliHIPE-materiala. V DMSO lahko pride do spontane polimerizacije NCA-monomerov,¹⁷⁸ zato smo se najprej osredotočili na topilo DMF.

Pripravili smo brezvodne HIPE-e z raztopino NCA-monomerov v DMF kot kontinuirno fazo in PB kot interno fazo. Hidroksilne skupine lahko pod določenimi pogoji iniciirajo ROP NCA,^{49,61} zato smo za stabilizacijo HIPE-ov uporabili metilirani surfaktant (Me-F127). ROP v DMF je priporočljivo izvajati pri 0 °C, da preprečimo stranske reakcije s toplom, kot je npr. nastanek mrtvih formamidnih koncev verig.¹⁷⁹ Opazili smo, da je pri visokokonzentrirani raztopini NCA v DMF ($\geq 2,0$ M) omejena topnost polimernega surfaktanta, ki se pri 0 °C še dodatno zniža, zato smo HIPE pripravljali in polimerizirali na sobni temperaturi.

Za ROP NCA se v večini primerov uporabljajo primarni amski iniciatorji, ki delujejo po mehanizmu NAM in omogočajo dobro kontrolo nad ROP, vendar polimerizacija do zadovoljive konverzije monomerov lahko traja tudi več dni.¹⁸⁰ Kot smo ugotovili že v primeru PCL poliHIPE-ov, mora hitrost polimerizacije biti dovolj hitra, da prepreči razpad emulzije. Hitro propagacijo ROP lahko dosežemo z uporabo terciarnih aminov, ki delujejo po mehanizmu AMM. Značilnost AMM je počasna iniciacija in hitra propagacija, kar vodi do visokih molekulskih mas, a široke porazdelitve le-teh,⁴⁹ vendar slednja lastnost pri kovalentno zamreženem polimeru ne predstavlja težave. Kot katalizator smo zato uporabili *N,N*-diizopropiletil amin (DIPEA).

Med ROP se za vsako molekulo zreagiranega NCA-monomera sprosti ena molekula CO₂, ki povzroči penjenje raztopine. S težavo penjenja so se spopadali že David in sodelavci²⁷ med pripravo HIPE-ov na osnovi poliuretanov, kjer je izocianat reagiral z vodo (interno fazo) ter tvoril ureo in CO₂, zaradi česar so v materialu nastale večje praznine. Tvorba CO₂ je med ROP NCA neizogibna, zato smo raziskali, kako kljub izhajanju plina ohraniti kontrolo nad porozno strukturo polipeptidnih poliHIPE-ov. CO₂ je v raztopini delno topen in ko se raztopina nasiči, presežek plina difundira iz sistema. Če je sproščanje CO₂ hitrejše od njegove difuzije iz nasičene raztopine, pride do prenasičenja, ki vodi do heterogene nukleacije mehurčkov in posledično do penjenja emulzije.^{181,182} Hitrost sproščanja CO₂ je odvisna od hitrosti polimerizacije, ki jo lahko kontroliramo s koncentracijo monomerov in s količino katalizatorja. Če je katalizatorja premalo, da bi polimer zažrel v času stabilnosti emulzije, se fazi ločita (slika 4-20A). Če polimerizacija poteče prehitro, se HIPE speni in zažrela, mehurčki pa ostanejo ujeti v materialu. Taki poliHIPE-i vsebujejo po čiščenju praznine velikostnega reda 1 mm (slika 4-20C). PoliHIPE-morfologijo izkazujejo polipeptidi, sintetizirani s primerno količino katalizatorja (slika 4-20B), ki pa je do določene mere odvisna tudi od vrste NCA-monomera. Do penjenja lahko pride tudi, če emulzijo po dodatku katalizatorja predolgo mešamo, čeprav je bila dodana ustrezna količina katalizatorja. V emulziji, katere viskoznost zaradi polimerizacije narašča, se med mešanjem ujamejo zračni mehurčki, ki delujejo kot heterogena nukleacijska mesta, kamor CO₂ lahko difundira.^{181,183} HIPE-e smo zato po dodatku raztopine katalizatorja mešali le 30 s, saj so se HIPE-i pri daljših časih mešanja (>2 min) spenili. Da bi se izognili vnosu zraka in nastanku vrzeli, je pomembno tudi, da HIPE previdno in v enem neprekinjenem delu prenesemo v kalup za polimerizacijo. Nastajajoči plin mora iz kalupa kontrolirano izhajati, ne da bi pri tem ROP izpostavili vlagi iz ozračja. Če je kalup (v našem primeru centrifugirka) zaprt, bo zaradi izhajanja plina pritisk v notranjosti narastel. Po odprtju kalupa pritisk naglo pade in mehurčki zrastejo, kar povzroči nastanek večjih vrzeli v že nastalem poliHIPE-u. Centrifugirke smo zato zaprli s septo z vstavljenim iglo, ki omogoča, da nastali CO₂ počasi izhaja, pritisk izhajajočega plina pa preprečuje vhod vlage iz zraka.



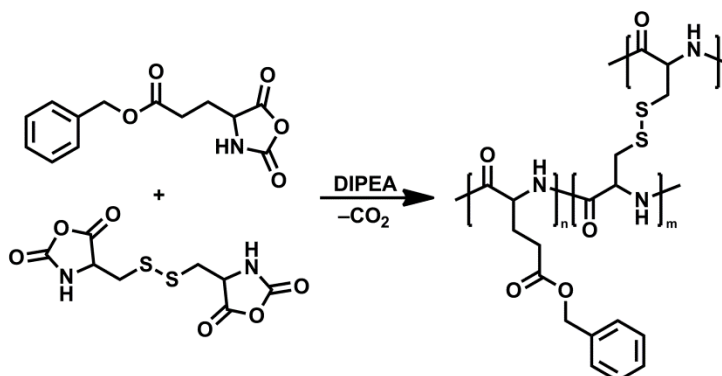
Slika 4-20: Grafični prikaz in fotografije vzorcev: fazno separiran poliHIPE kot posledica prenizke koncentracije katalizatorja (A), poliHIPE z optimalno morfologijo (B), spenjen poliHIPE zaradi previsoke koncentracije katalizatorja ali predolgega mešanja po dodatku katalizatorja (C). Razlika med spenjenim in nespnenim vzorcem po čiščenju je vidna v obliki vzorca in na SEM-posnetku.

Pripravili smo HIPE na osnovi BLG NCA. Znano je, da linearni PBLG v različnih topilih,^{184,185} med katerimi je tudi DMF,¹⁸⁶ tvori fizikalni gel na osnovi agregacije α -vijačnic.^{92,187} Želiranje PBLG v poliHIPE-u smo opazili tudi v primeru linearnega polipeptida brez dodanega zamreževalca (slika 4-21).



Slika 4-21: Zaželiran poliHIPE na osnovi linearnega PBLG.

Nekovalentno zamrežen poliHIPE kljub nastanku gela ni bil dovolj obstojen, da bi lahko monolit očistili in posušili v enem kosu. PBLG smo zato v HIPE kovalentno zamrežili z uporabo Cys NCA v molskem razmerju BLG : Cys 95 : 5 (slika 4-22).



Slika 4-22: ROP BLG NCA in Cys NCA v kontinuirni fazi HIPE.

PoliHIPE iz BLG NCA, Cys NCA, Me-F127 in katalizatorja DIPEA v topilu DMF ter PB kot interno fazo smo pripravili pri različnih eksperimentalnih pogojih (tabela 4-6). Vzorci so označeni »PBLG_c x-w«, pri čemer smo spreminjali volumski delež interne faze (x), koncentracijo NCA (c) in masni delež surfaktanta v kontinuirni fazi (w). Največji vpliv na poroznost poliHIPE-materialov ima delež interne faze, ki predstavlja volumen praznin po čiščenju, medtem ko sta velikost por in odprtost strukture odvisna predvsem od deleža surfaktanta.^{4,8} Količino katalizatorja smo prilagodili glede na hitrost polimerizacije oz. obseg fazne separacije emulzije. Teoretično poroznost smo izračunali po enačbi 4.4:

$$\Phi(\text{teor.})(\%) = \left(1 - \frac{\frac{m(\text{polimer})}{\rho(\text{polimer})}}{\frac{m(\text{polimer})}{\rho(\text{polimer})} + V(\text{topila})}\right) \times 100 \quad (4.4)$$

kjer je:

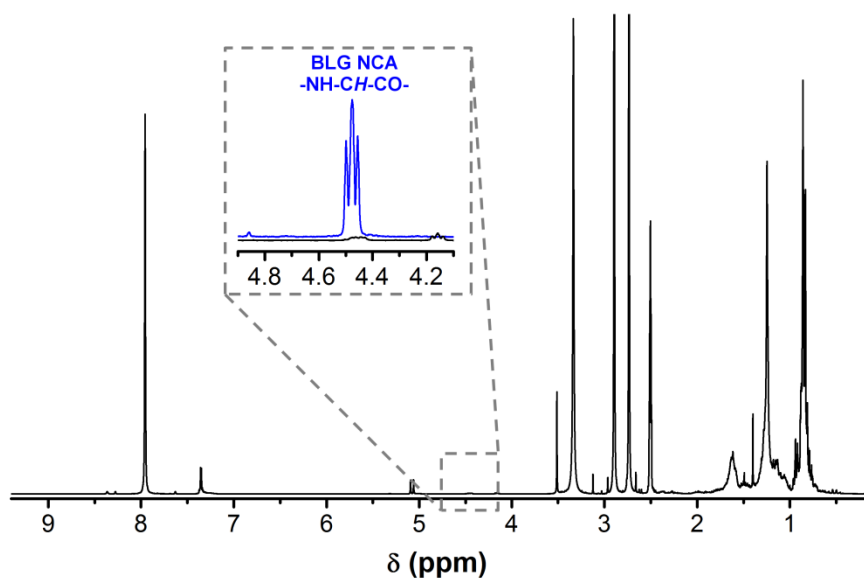
- $\Phi(\text{teor.})$ teoretična poroznost (%),
- $m(\text{polimer})$ masa polimera, izračunana kot razlika mase NCA in sproščenega CO₂, pri čemer predpostavljamo 100 % konverzijo monomerov (g),
- $\rho(\text{polimer})$ gostota neporoznega polimera, ki za PBLG znaša 1,28 g cm⁻³,¹⁸⁸
- $V(\text{topila})$ skupen volumen uporabljenih topil, tj. DMF in PB (mL).

Tabela 4-6: Eksperimentalni parametri poliHIPE na osnovi PBLG, zamreženega s 5 mol % cistina, pri čemer smo spreminjali volumski delež interne faze ($x(\text{PB})$), koncentracijo NCA ($c(\text{NCA})$), masni delež surfaktanta ($w(\text{surf.})$) in molski delež katalizatorja ($x(\text{kat.})$), ter pripadajoče teoretične poroznosti ($\Phi(\text{teor.})$).

	$x(\text{PB})$ (vol. %)	$c(\text{NCA})$ (M)	$w(\text{surf.})$ (mas. %)	$x(\text{kat.})$ (mol %)	$\Phi(\text{teor.})$ (%)
PBLG _{2,0} 75-5	75	2,0	5	0,5	92,1
PBLG _{2,0} 75-2	75	2,0	2	0,5	92,1
PBLG _{2,5} 75-2	75	2,5	2	0,3	90,3
PBLG _{2,0} 80-10	80	2,0	10	0,5	93,5
PBLG _{2,0} 80-3	80	2,0	3	0,5	93,5
PBLG _{2,5} 80-3	80	2,5	3	0,3	92,1
PBLG _{2,0} 85-5	85	2,0	5	0,5	95,1
PBLG _{2,0} 85-3	85	2,0	3	0,5	95,1
PBLG _{2,5} 85-3	85	2,5	3	0,2	93,9

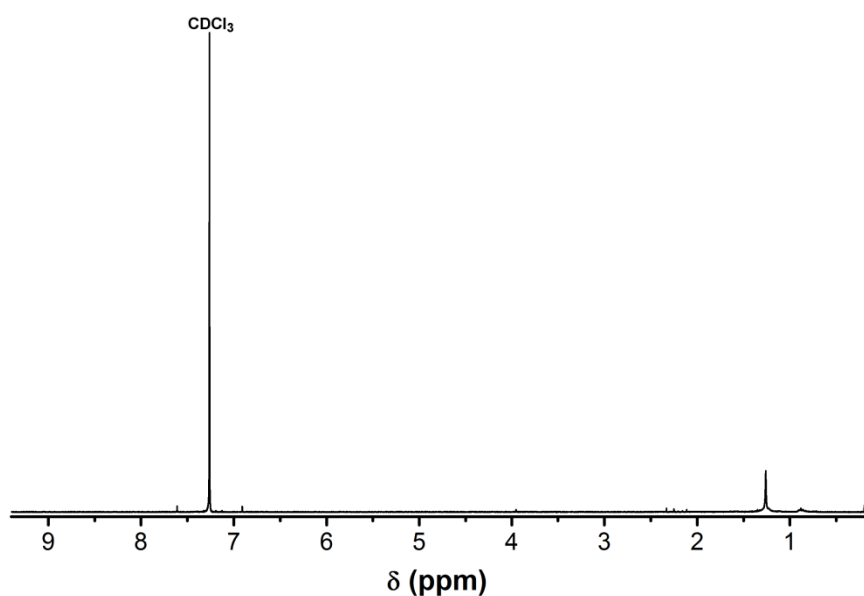
HIPE s 75 vol. % PB je bil stabilen že z 2 mas. % Me-F127, kar pa za pripravo emulzije z višjim deležem interne faze ni zadostovalo. S 3 mas. % surfaktanta je bil PBLG_{2,0} 80-3 HIPE stabilen med mešanjem, ko smo mešanje ustavili, ne da bi pred tem dodali katalizator, pa je prišlo do vidnega ločevanja faz po ~15 min. Kljub kinetični nestabilnosti smo razpad HIPE-a lahko preprečili z dodatkom 0,5 mol % katalizatorja, ki sproži pravočasno želiranje poliHIPE-a. Stabilnejše emulzije smo dobili ob uporabi večje količine surfaktanta, vendar se je pri tem zvišala viskoznost emulzije, kar je vplivalo na intenzivnejše penjenje. Bolj viskozne emulzije so nastale tudi s 85 vol. % PB in pri višji koncentraciji monomerov (2,5 M). Emulzije z višjo koncentracijo NCA-monomerov so hitreje polimerizirale, zato smo v teh primerih uporabili manj katalizatorja. Manj koncentrirane emulzije (1,5 M glede na NCA-monomere) so bile bistveno manj stabilne. Emulzije z višjim deležem interne faze (90 vol. %) pa so razpadle že med samim mešanjem.

HIPE smo polimerizirali pri sobni temperaturi in polimerizacijo spremljali z ¹H NMR-spektroskopijo alikvotov v DMSO-*d*₆. ¹H NMR-spekter alikvota poliHIPE-a po 24 h polimerizacije kaže prisotnost topila, surfaktant, katalizator, in nepremrežene verige PBLG (slika 4-23). Odsotnost signala za proton v obroču NCA pri δ 4,44 ppm dokazuje, da je polimerizacija po tem času dosegla popolno konverzijo.



Slika 4-23: ^1H NMR-spekter PBLG poliHIPE-a po 24 h polimerizacije ter povečava s primerjavo spektra BLG NCA-monomera.

Polimerizirane poliHIPE-e smo čistili z 1,4-dioksanom, pri čemer nismo opazili bistvenih dimenzijskih sprememb monolita. Večino PB smo najprej odstranili z difuzijskim čiščenjem v 1,4-dioksanu, ker imata topili podobni temperaturi vrelišča (101 °C za 1,4-dioksan in od 100 do 140 °C za PB). Sledilo je temeljitejše čiščenje na Soxhletovem aparatu z 1,4-dioksanom, da smo odstranili ves surfaktant in morebitne nepremrežene verige, nakar smo vzorce osušili z zamrzovanjem, da smo preprečili krčenje monolita med samim sušenjem. Zaradi potencialne uporabe polipeptidnega poliHIPE-a v bioloških sistemih je čistost materiala ključnega pomena, zato smo morebitne topne spojine očiščenega poliHIPE-a analizirali z ^1H NMR-spektroskopijo (slika 4-24). Odsotnost signalov potrjuje uspešnost čiščenja sintetiziranih monolitov.



Slika 4-24: ^1H NMR-spekter ekstrakta očiščenega PBLG poliHIPE-a.

Učinkovito premreženje nakazuje visok delež gela, ki smo ga izračunali po enačbi 4.5 in je znašal 85 %. Uspešno vključitev cistina v polipeptid smo potrdili z ramansko spektroskopijo (slika 4-25). V diferencialnem ramanskem spektru, ki prikazuje razliko med PBLG poliHIPE-om in linearnim PBLG, vidimo trak pri valovnem številu 503 cm^{-1} , ki je značilen za vibracijo raztezanja disulfidne vezi v strukturi cistina.

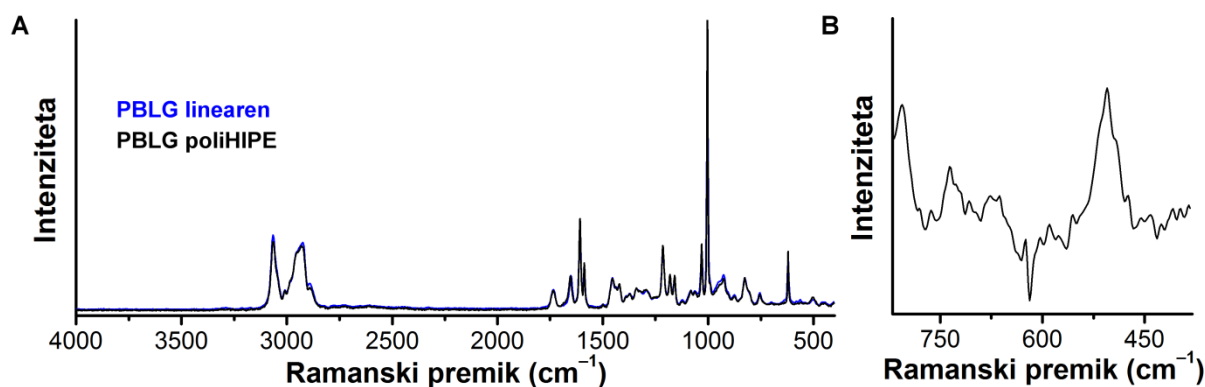
$$\text{delež gela}(\%) = \frac{m(\text{poliHIPE})}{m(\text{NCA}) - m(\text{CO}_2)} \cdot 100 \quad (4.5)$$

Kjer je:

$m(\text{poliHIPE})$ masa vzorca po polimerizaciji in čiščenju (g),

$m(\text{NCA})$ masa NCA-monomerov v HIPE (g),

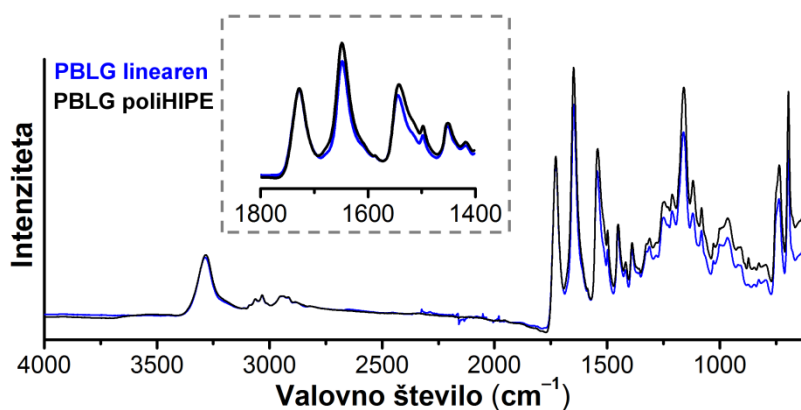
$m(\text{CO}_2)$ izračunana masa CO_2 , ki se sprosti pri ROP NCA, pri čemer predpostavljamo 100 % konverzijo monomerov (g).



Slika 4-25: Ramanska spektra linearnega PBLG in PBLG poliHIPE-a ter povečava diferencialnega ramanskega spektra.

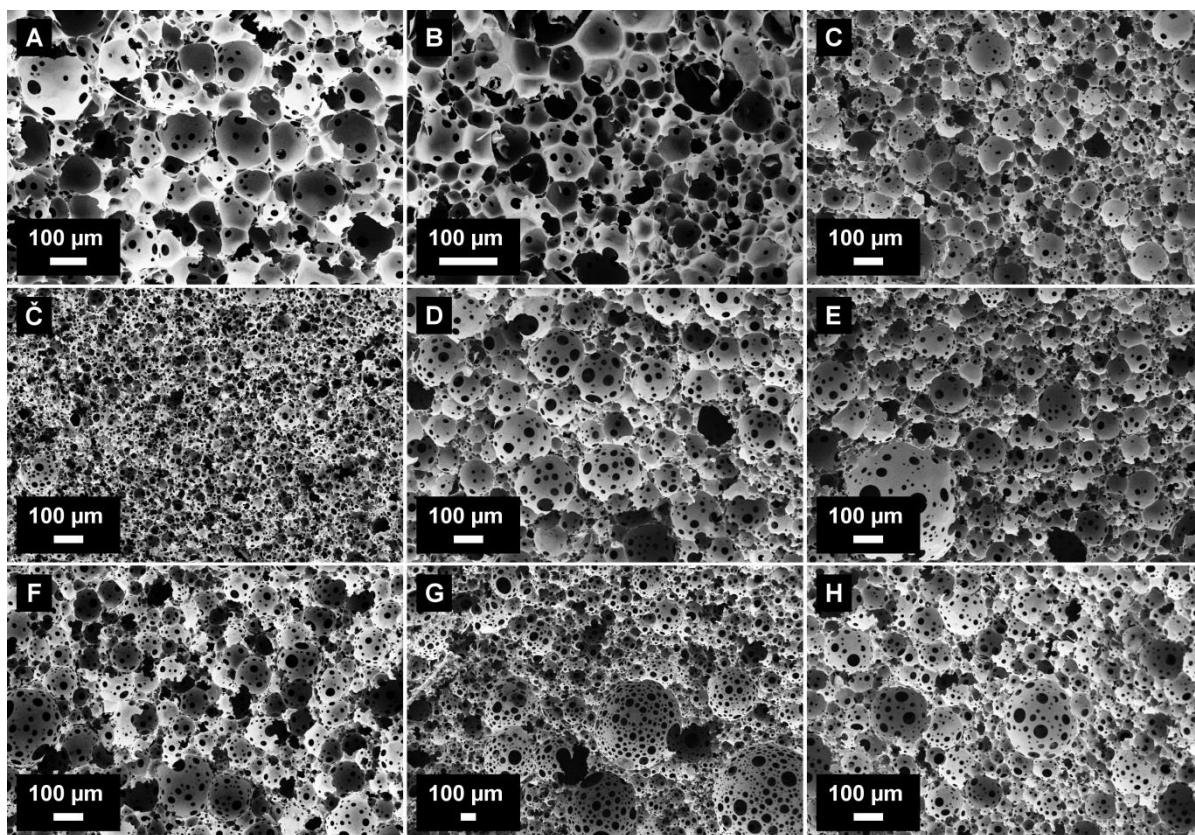
4.2.3 Karakterizacija PBLG poliHIPE-ov

Sekundarno strukturo poliHIPE na osnovi PBLG smo opazovali s FTIR-spektroskopijo, ki zazna spremembe v konformaciji verig.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Opazovali smo amidni I trak med 1620 cm^{-1} in 1690 cm^{-1} , značilen za raztezanje C=O vezi v polipeptidnem ogrodju. Oblika traku je odvisna od konformacije makromolekularnih verig in odraža sekundarno strukturo polipeptida. Od konformacije je odvisna tudi oblika amidnega III traku med 1220 cm^{-1} in 1330 cm^{-1} , ki je značilen za vibracijo raztezanja C-N vezi in upogibanja N-H vezi, a se pogosto prekriva z vibracijami stranskih skupin. FTIR-spekter PBLG poliHIPE-a smo primerjali s FTIR-spektrom linearnega PBLG, za katerega je znano, da tvori α -vijačno strukturo.¹⁸⁴ Slika 4-26 kaže, da se trakova, ki pripadata amid I (1649 cm^{-1}) in amid III (med 1250 cm^{-1} in 1310 cm^{-1}) vibracijama, po valovnem številu in obliki ujemata za PBLG poliHIPE in linearni PBLG. Valovni števili kot tudi simetrični, ozki obliki amidnega I traku sta v obeh primerih značilni za α -vijačno strukturo.¹⁹² To pomeni, da PBLG poliHIPE kljub prisotnosti cistin zamreževalca v strukturi ohrani sekundarno strukturo.



Slika 4-26: Primerjava FTIR-spektrov linearnega PBLG in PBLG poliHIPE-a ter povečava območja, ki prikazuje amidni I trak.

Morfologijo pripravljenih poliHIPE-ov smo opazovali s SEM. Teoretična poroznost vseh vzorcev je nad 90 %, zato je pričakovana tipična poliHIPE-morfologija z glavnimi in povezovalnimi porami, kot vidimo na sliki 4-27. Opazimo, da sta velikost in porazdelitev por odvisni od količine interne faze in surfaktanta, ki vplivata na stabilnost emulzij. Bistvenega vpliva koncentracije NCA-monomerov v zvezni fazi emulzije na morfologijo poliHIPE-ov nismo opazili.



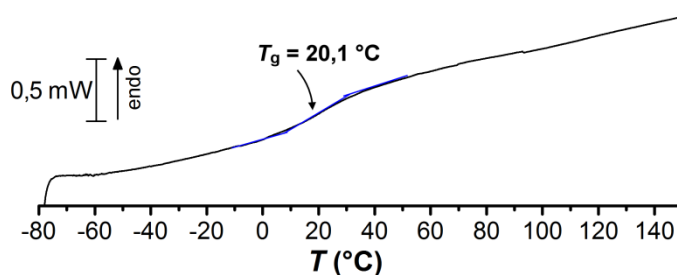
Slika 4-27: SEM-mikrografi PBLG_{2,0} 75-5 (A), PBLG_{2,0} 75-2 (B), PBLG_{2,5} 75-2 (C), PBLG_{2,0} 80-10 (Č), PBLG_{2,0} 80-3 (D), PBLG_{2,5} 80-3 (E), PBLG_{2,0} 85-5 (F), PBLG_{2,0} 85-3 (G) in PBLG_{2,5} 85-3 (H).

Podrobneje smo okarakterizirali vzorce PBLG_{2,0} 80-10, 80-3 in 85-3. Porozno strukturo poliHIPE-monolitov smo ovrednotili na podlagi gostote, odstotka poroznosti in povprečne velikosti por (tabela 4-7). Poroznost monolitov smo izračunali iz njihovih izmerjenih gostot po enačbi 2.3, pri čemer smo upoštevali gostoto neporoznega PBLG 1,28 g cm⁻³.¹⁸⁸ Dejanske poroznosti so nekoliko nižje od teoretičnih, kar je lahko posledica manjšega skrčka monolita po čiščenju in sušenju. Skrček je bolj izrazit za poliHIPE-monolit z višjim deležem interne faze (85 vol. %), ki ima tanjše stene. Povprečno velikost por smo določili s programsko opremo ImageJ, pri čemer smo zmerili približno 200 por za vsak vzorec ter upoštevali korekcijski faktor $2/\sqrt{3}$. Vidimo, da ima PBLG_{2,0} 80-3 večje pore in širšo porazdelitev por kot PBLG_{2,0} 80-10, ki je pripravljen iz stabilnejše emulzije. Velikost por in širina porazdelitve por se še povečata v primeru PBLG_{2,0} 85-3 z višjo vsebnostjo interne faze. Velikost por in porazdelitev velikosti por igrata pomembno vlogo pri uporabi materiala za tkivno inženirstvo. Procesi, kot so celična adhezija, proliferacija in diferenciacija, zahtevajo različne velikosti por.¹²² Za širjenje in rast celic v notranjosti materiala so primerne pore velikostnega reda 100 μm,¹⁹³ zato smo za modelni poliHIPE za celične teste izbrali PBLG_{2,0} 80-3.

Tabela 4-7: Gostota (ρ), poroznost (Φ) in povprečna velikost por ($d(\text{povp.})$) poliHIPE-ov na osnovi PBLG, zamreženega s 5 mol % cistina.

	ρ (g cm ⁻³)	Φ (%)	$d(\text{povp.})$ (μm)
PBLG _{2,0} 80-10	0,11 ± 0,01	91,3 ± 0,9	34,8 ± 13,9
PBLG _{2,0} 80-3	0,10 ± 0,01	92,0 ± 0,5	74,4 ± 52,0
PBLG _{2,0} 85-3	0,11 ± 0,01	91,3 ± 0,9	123,4 ± 99,0

Najprej smo z DSC okarakterizirali termične lastnosti PBLG_{2,0} 80-3. V temperaturnem območju od -80 °C do 150 °C ima material steklasti prehod, katerega temperaturo (T_g) smo odčitali iz drugega segrevanja in znaša 20,1 °C (slika 4-28).



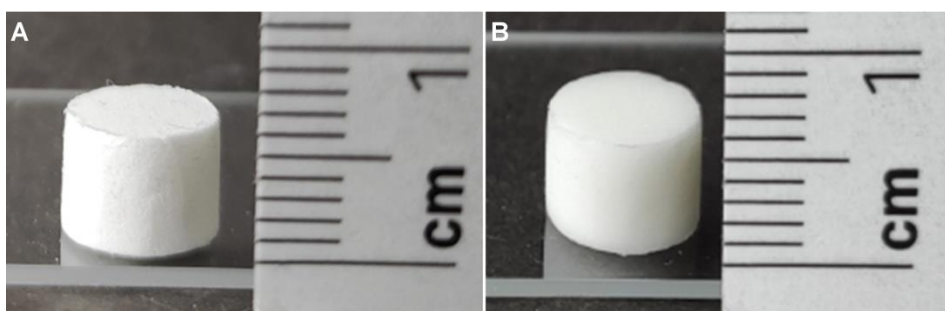
Slika 4-28: DSC-termogram vzorca poliHIPE PBLG_{2,0} 80-3. Krivulja prikazuje drugo segrevanje (20 °C min⁻¹), iz katere smo odčitali temperaturo steklastega prehoda (T_g).

Če nas zanima uporaba materiala v biomedicinske namene, ga moramo okarakterizirati pri primernih pogojih, tj. v vodnem mediju in pri 37 °C. PoliHIPE na osnovi PBLG je hidrofoben material, ker so njegove karboksilne stranske skupine zaščitene z benzilno zaščitno skupino. Zato smo ga najprej namočili v etanol, ki bolje omoči stene por, in topilo postopoma izmenjali s fosfatnim pufrom z NaCl (PBS). Masa namočenega vzorca se je povečala za več kot sedemkrat (tabela 4-8), kar nakazuje, da je PBS prodril v pore. Zaradi hidrofobnosti

vzorec v PBS ne spremeni bistveno oblike in velikosti (slika 4-29). Opazili smo manjši skrček (~10 %) materiala, ki je verjetno posledica dejstva, da je bil poliHIPE liofiliziran iz dioksana.

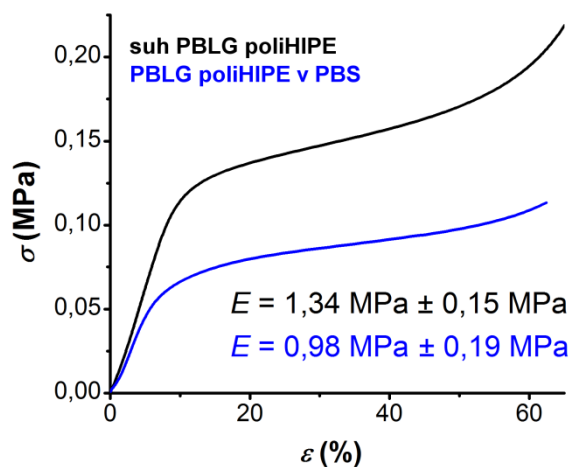
Tabela 4-8: Volumen (V), masa (m) in Youngov modul (E) suhega in v PBS namočenega poliHIPE-a PBLG_{2,0} 80-3.

PBLG _{2,0} 80-3	V (cm ³)	m (g)	E (MPa)
suh	394,1 ± 26,4	38,0 ± 1,5	1,34 ± 0,15
v PBS	344,1 ± 20,8	274,0 ± 19,0	0,98 ± 0,19



Slika 4-29: Fotografiji vzorca poliHIPE-a PBLG_{2,0} 80-3 v suhem stanju (A) in namočenega v PBS (B).

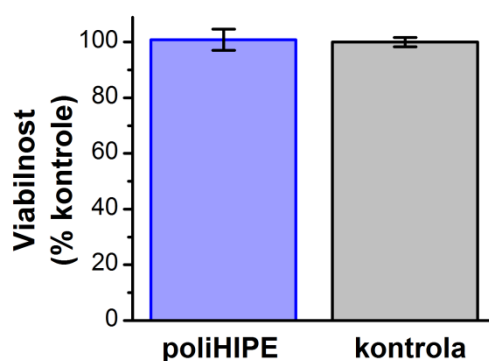
S kompresijskim testom smo določili mehanske lastnosti poliHIPE-a PBLG_{2,0} 80-3 pri 37 °C, kar je tik nad T_g PBLG. Primerjali smo suh in v PBS namočen poliHIPE (slika 4-30). V obeh primerih krivulji napetosti kot funkcija deformacije kažeta tipično obliko za penast material, tj. linearni začetni del, iz katerega določimo Youngov modul poliHIPE-monolita, temu sledi plato zaradi upogibanja sten, pri večjih deformacijah pa opazimo porast napetosti zaradi zgostitve materiala. Youngov modul v PBS namočenega vzorca je nižji in za enako deformacijo zadostuje nižja napetost, kar nakazuje, da se material v PBS nekoliko zmehča.



Slika 4-30: Krivulja napetost-deformacija (σ vs. ϵ) za poliHIPE PBLG_{2,0} 80-3, merjen pri 37 °C. Podana sta Youngova modula, določena iz naklona začetnega linearnega dela krivulje.

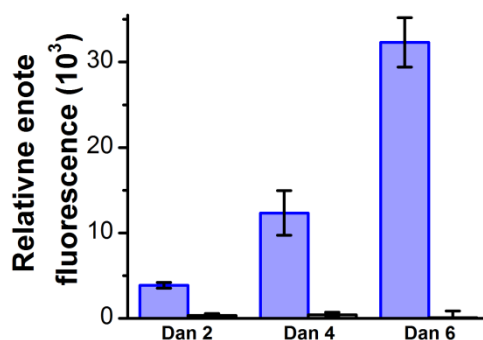
4.2.4 Celični testi na PBLG poliHIPE-u

PoliHIPE na osnovi sintetičnih polipeptidov predstavljajo potencialne materiale za tkivno inženirstvo. V ta namen smo preverili citotoksičnost poliHIPE-a PBLG_{2,0} 80-3. Steriliziran poliHIPE smo inkubirali v mediju, medij pa nato prenesli na celično linijo mišjih fibrosarkom L929. Dodali smo viabilnostni reagent PrestoBlue, ki vsebuje redoks-odzivno spojino resaruzin. Žive celice resaruzin presnovijo (reducirajo), pri čemer nastane rdeč fluorescenčni produkt. Za kontrolo smo na enak način pripravili medij, ki smo ga inkubirali v odsotnosti poliHIPE-monolita. Signal fluorescenčnega produkta se v primerjavi s kontrolnim vzorcem ni zmanjšal (slika 4-31), kar pomeni, da iz PBLG poliHIPE-a ne izhajajo snovi, ki bi celicam škodile. To nakazuje na uspešno čiščenje poliHIPE-a, kar je v skladu z rezultatom ¹H NMR-spektroskopije, kjer smo preverjali ekstrakt iz očiščenega materiala (slika 4-24).



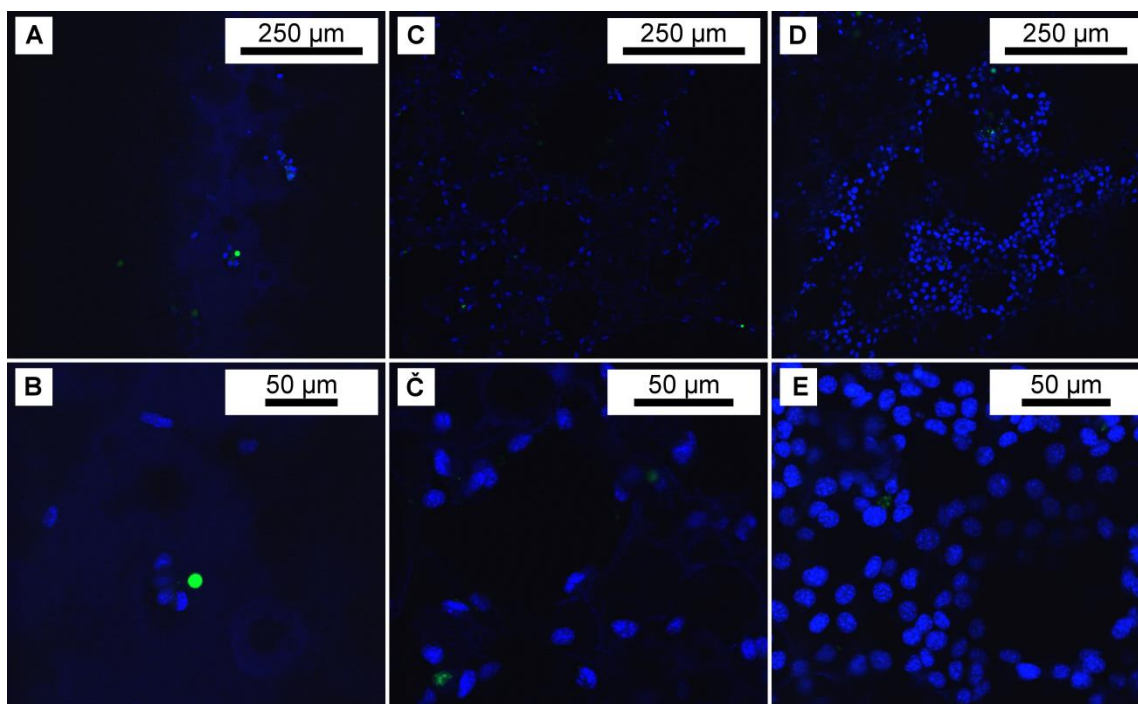
Slika 4-31: Viabilnost celic L929, izpostavljenih mediju, v katerem je bil 24 h inkubiran PBLG poliHIPE, in primerjava s kontrolo (medij, inkubiran v odsotnosti poliHIPE-monolita).

Ker poliHIPE PBLG_{2,0} 80-3 ni citotoksičen, smo v nadaljevanju študirali njegovo uporabnost kot material za sidranje in rast celic. Celično linijo mišjih fibrosarkom L929 smo sadili neposredno na steriliziran vzorec v obliki diska. Celice smo na poliHIPE-materialu gojili do 8 dni. Po dveh, štirih in šestih dneh smo relativno spremembo v številu živih celic na vzorcu ovrednotili s pomočjo PrestoBlue testa. Disk s celicami smo prenesli v svež medij z viabilnostnim reagentom PrestoBlue in zmerili intenziteto fluorescenčnega signala, ki je sorazmerna številu živih celic.¹⁹⁴ Po štirih dneh se je število celic na poliHIPE-u povišalo za skoraj trikrat, po šestih dneh pa je število celic naraslo za osemkrat več kot drugi dan, medtem ko pri kontrolnih vzorcih ni prišlo do spremembe (slika 4-32).



Slika 4-32: Relativni fluorescenčni signal poliHIPE-diska PBLG_{2,0} 80-3 po dveh, štirih in šestih dneh po inkubaciji s celično linijo mišjih fibrosarkom L929 oz. brez nje (kontrola).

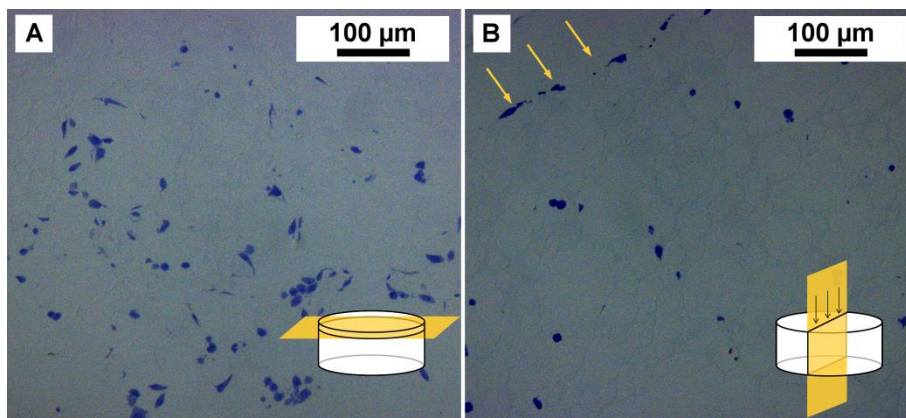
Za kvalitativno oceno smo vzorce z gojenimi celicami preiskali s konfokalno mikroskopijo. Celična jedra smo označili z barvilom Hoechst 33342, ki reagira z nukleinskimi kislinami in tvori moder fluorescenčni produkt. Jedra mrtvih celic smo ločili s pomočjo SYTOX® Green barvila, saj ta prodre zgolj skozi poškodovano membrano mrtvih celic in jih označi z zelenim fluorescentnim produktom. Na sliki 4-33 vidimo, da se število živih celic po dveh, štirih in sedmih dneh povečuje, medtem ko smo opazili le manjše število mrtvih celic. Po sedmih dneh celice niso rasle zgolj na površini poliHIPE-a, temveč jih skozi povezovalne pore vidimo tudi v globljih porah materiala.



Slika 4-33: Posnetki konfokalne mikroskopije poliHIPE-a PBLG_{2,0} 80-3 s posejanimi L929 celicami po 2 dneh (A, B), 4 dneh (C, D) in 7 dneh (E, F) po inkubaciji.

S konfokalno mikroskopijo ne moremo opazovati globine, do katere celice prodrejo skozi pore, ker nas omejuje neprosojnost materiala. Zato smo z optično mikroskopijo opazovali tanki rezini (0,6 μm) diska s celicami, ki smo jih predhodno fiksirali v smolo z glutaraldehidom in osmijevim tetraoksidom ter obarvali z Azure II in metilenmodrim

barvilom. Na rezini, odrezani vzporedno s površino diska na globini $\sim 5 \mu\text{m}$, vidimo enakomerno rast celic po površini (slika 4-34A). V primerjavi s posnetki konfokalne mikroskopije je navidez manj celic, a je potrebno upoštevati, da gre pri optični mikroskopiji za rezino, ki je bistveno tanjša od celice. Ta v primeru poroznega materiala predstavlja večinoma praznine, medtem ko s konfokalno mikroskopijo, ki ima globljo goriščno točko, lahko vidimo tudi celice na stenah teh praznin. Posnetek optične mikroskopije rezine, ki je odrezana pravokotno na površino, dokazuje, da so celice prodrle tudi v globino materiala (slika 4-34B). S celičnimi testi smo pokazali, da ima PBLG poliHIPE potencial za uporabo v biomedicinski namene.



Slika 4-34: Posnetka optične mikroskopije poliHIPE-a PBLG_{2,0} 80-3 s posejanimi celicami L929, prerezanega vzporedno ($\sim 5 \mu\text{m}$ pod površino) (A) in prečno glede na površino (puščice kažejo zgornjo plast) (B).

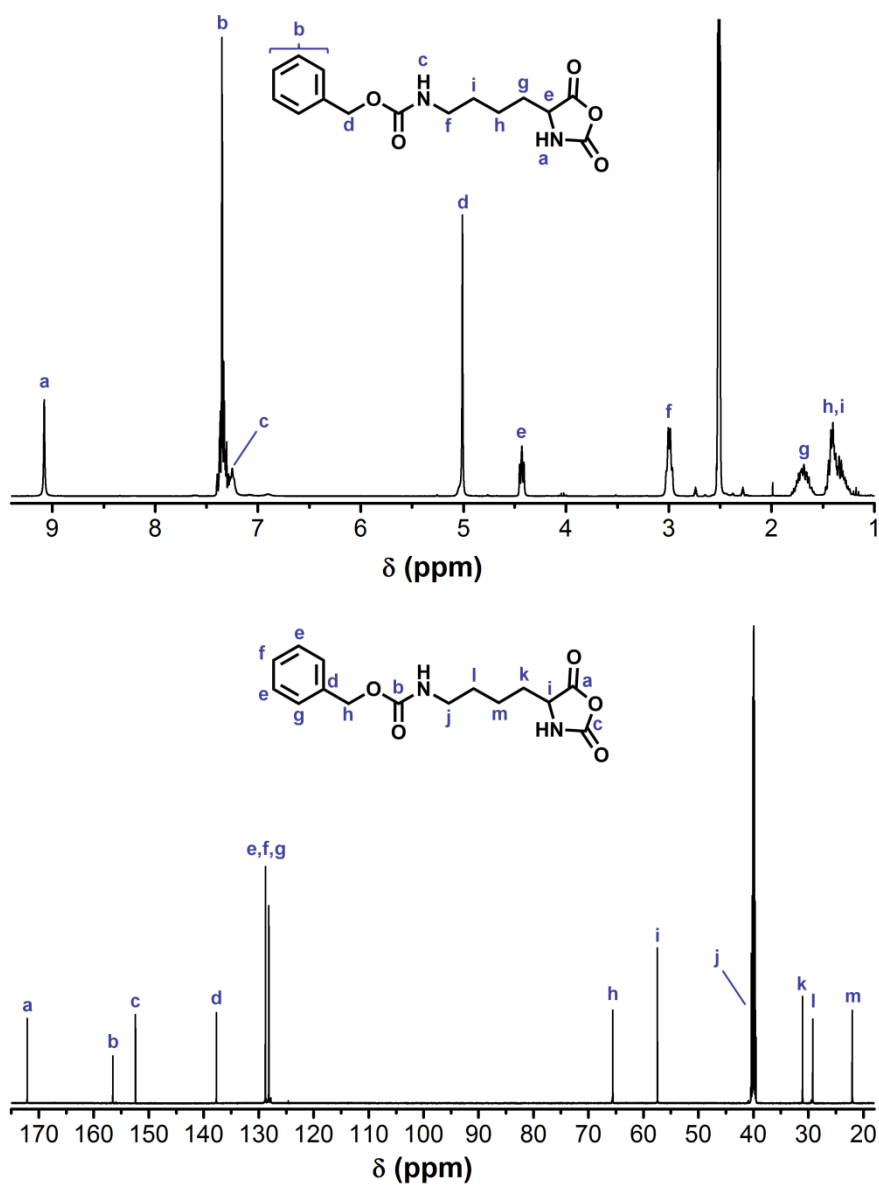
4.3 Polipeptidni poliHIPE-i na osnovi drugih NCA

Po optimizaciji postopka priprave poliHIPE-ov na osnovi PBLG smo kot dokaz splošne uporabnosti razvite metode želeli razširiti nabor NCA-monomerov in NCA-zamreževalcev za pripravo polipeptidnih poliHIPE-ov različne kemijske sestave. Prednost uporabe različnih vrst NCA-monomerov je namreč v tem, da lahko v poliHIPE-strukturo uvedemo funkcionalne skupine za razliko od npr. poliestrov. Zanimala nas je tudi možnost kopolimerizacije različnih vrst NCA-monomerov z namenom priprave večfunkcionalnih polipeptidnih poliHIPE, s tem pa tudi možnost uvedbe določenih prepoznavnih sekvenc v poliHIPE-strukturo. Ker je reaktivnost NCA-monomerov odvisna od njihove kemijske sestave, hkrati pa je hitrost ROP izredno pomembna pri pripravi stabilnih poliHIPE-ov, smo za vsak sistem uporabljenih NCA-monomerov morali prilagoditi eksperimentalne pogoje priprave poliHIPE-monolitov.

4.3.1 PoliHIPE na osnovi PZLL

Kot alternativo BLG NCA, ki ima zaščiteno karboksilno kislino, smo izbrali ZLL NCA z zaščiteno amsko skupino. PZLL po odščiti tvori polikationski material z drugačno pH-odzivnostjo in omogoča dodatno funkcionalizacijo.

ZLL NCA smo sintetizirali na podoben način kot BLG NCA. Zaščitna karbamatna skupina ZLL NCA je občutljiva na HCl, ki se sprošča med sintezo NCA, zato smo pri pripravi tega monomera v reakcijsko zmes dodali α -pinen kot lovilec HCl. Reakcijo smo izvedli v etil acetatu, zato smo za prvo prekristalizacijo uporabili etil acetat/*n*-heksan, sledila pa je dvakratna prekristalizacija iz THF/*n*-heksana. Visoko čistost ZLL NCA potrjujeta ^1H in ^{13}C NMR-spektra, ki kažeta le ustrezne signale ZLL NCA (slika 4-35).



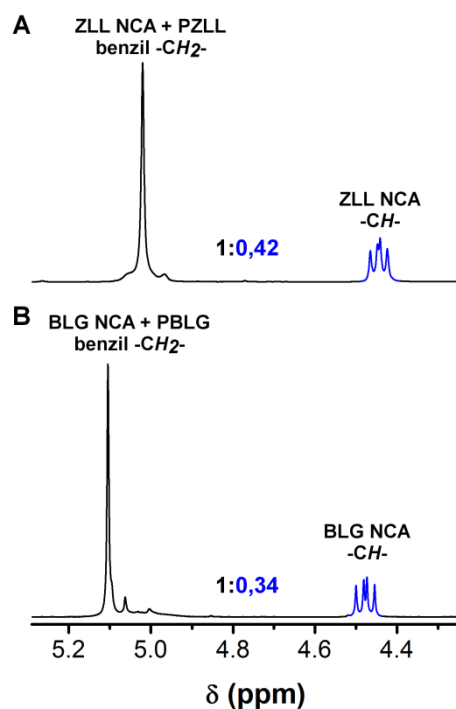
Slika 4-35: ^1H in ^{13}C NMR-spektra ZLL NCA.

Linearni PZLL za razliko od PBLG ni tvoril fizikalnega gela, domnevno zaradi bolj gibljivih α -vijačnic,^{195,196} zato PZLL poliHIPE brez zamreževalca ni zaželiral in sta se fazi ločili (slika 4-36).



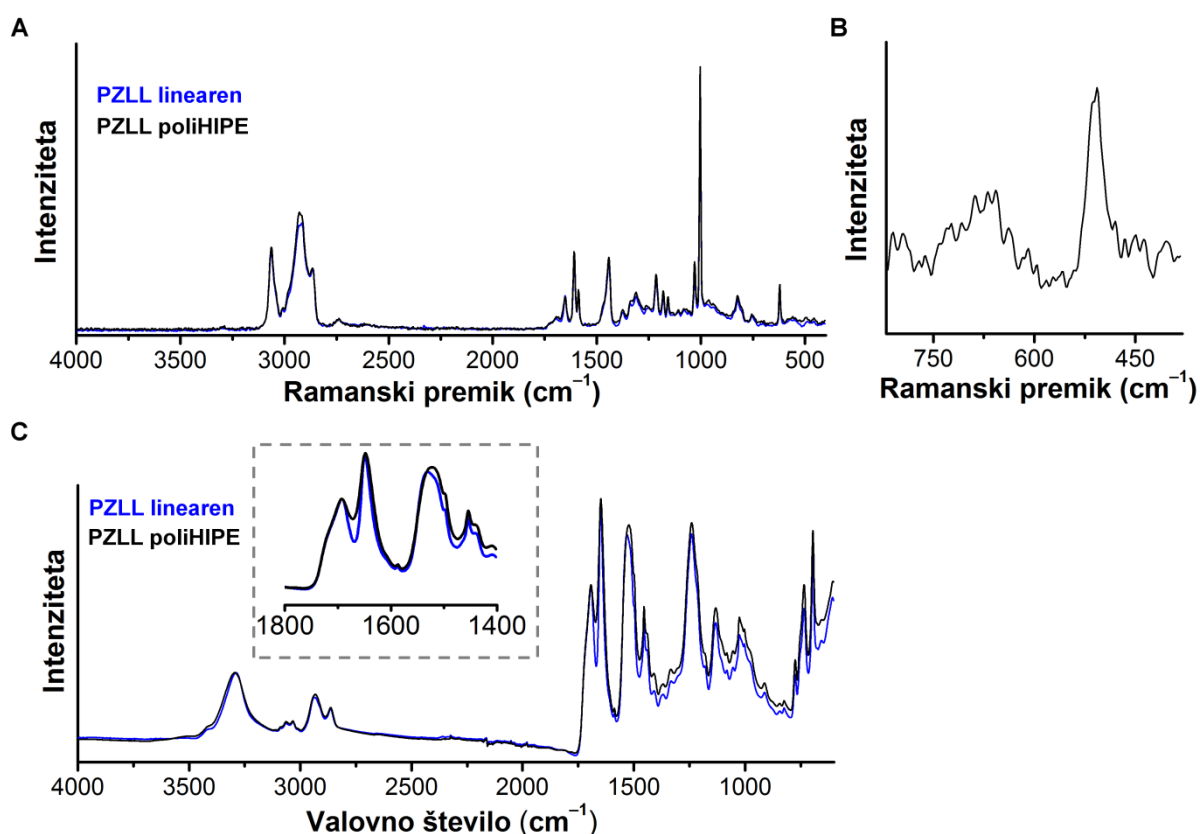
Slika 4-36: PoliHIPE na osnovi linearnega PZLL, ki ne zaželira in se fazno loči.

Pri uporabi eksperimentalnih pogojev, ki so primerni za sintezo PBLG poliHIPE-a (2,0 M raztopina NCA, 5,0 mol % Cys NCA, 3,0 mas. % Me-F127 in 0,5 mol % DIPEA), HIPE na osnovi PZLL ni zaželiral v času njegove stabilnosti. Kinetiko ROP obeh posameznih monomerov po mehanizmu AMM smo spremljali z ^1H NMR in ugotovili, da je ZLL NCA manj reaktiven kot BLG NCA. ^1H NMR spektra reakcijskih zmesi, izmerjenih po 5 min polimerizacije, namreč kažeta, da je razmerje površin metinskega signala ZLL NCA pri 4,44 ppm in metinskega signala benzilne skupine NCA-monomera in polipeptida na 5,02 ppm večja kot v primeru pripadajočih signalov reakcijske zmesi BLG NCA (signala na 4,48 ppm in 5,10 ppm) (slika 4-37). Podobno razliko v reaktivnosti teh NCA-monomerov so opazili tudi v primeru ROP po mehanizmu NAM, kjer so uporabili primarni amin kot iniciator.¹⁹⁷



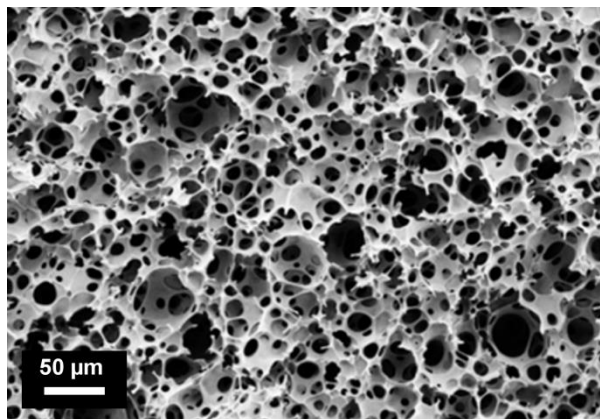
Slika 4-37: ^1H NMR-spektra reakcijskih zmesi ZLL NCA (A) in BLG NCA (B), polimeriziranih z 0,5 mol % DIPEA po reakcijskem času 5 min.

Da bi HIPE na osnovi PZLL pravočasno zažleiral, smo morali prilagoditi reakcijske pogoje. Hitrost polimerizacije ZLL NCA smo v ta namen pospešili z uporabo višje koncentracije NCA-monomera (2,4 M) in višje koncentracije katalizatorja (1,5 mol %), hkrati pa uporabili tudi večjo količino surfaktanta (5,5 mas. %), da smo povečali stabilnost emulzije. Uspešno vključitev cistinsega zamreževalca v strukturo poliHIPE na osnovi PZLL smo potrdili z diferencialno ramansko spektroskopijo (slika 4-38B). Podobno kot v primeru PBLG se sekundarna struktura poliHIPE-a PZLL v primerjavi z linearnim PZLL ni bistveno spremenila, kar kažejo njuni FTIR in ramanski spektri na slikah 4-38A in C, skupaj s povečanim FTIR-območjem, ki prikazuje vibracijo amidnega I traku (slika 4-38C).



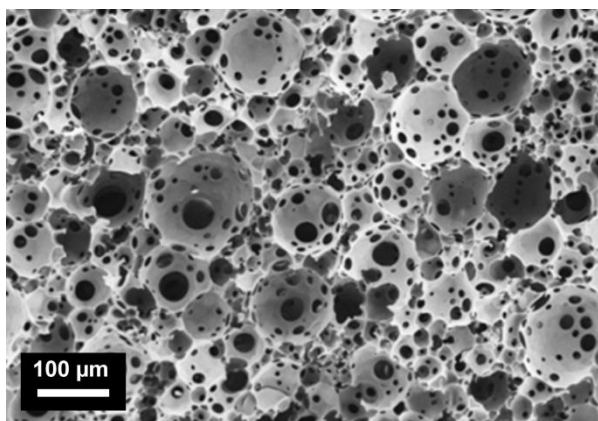
Slika 4-38: Ramanska spektra PZLL poliHIPE-a in linearnega PZLL (A) s povečavo diferencialnega ramanskega spektra (B) ter FTIR-spekter PZLL poliHIPE-a in linearnega PZLL s povečavo območja amidnega I traku (C).

Tako smo dobili poliHIPE na osnovi PZLL z dobro definirano morfologijo, ki jo vidimo na SEM-posnetku (slika 4-39). Gostota monolita je znašala $0,10 \text{ g cm}^{-3} \pm 0,01 \text{ g cm}^{-3}$, kar ustreza poroznosti $91,4 \% \pm 0,01 \%$ (privzeta gostota neporoznega PZLL $1,21 \text{ cm}^{-3}$),¹⁸⁸ pore pa so v povprečju velikosti $25,6 \mu\text{m} \pm 10,1 \mu\text{m}$.



Slika 4-39: SEM-mikrograf poliHIPE-a PZLL.

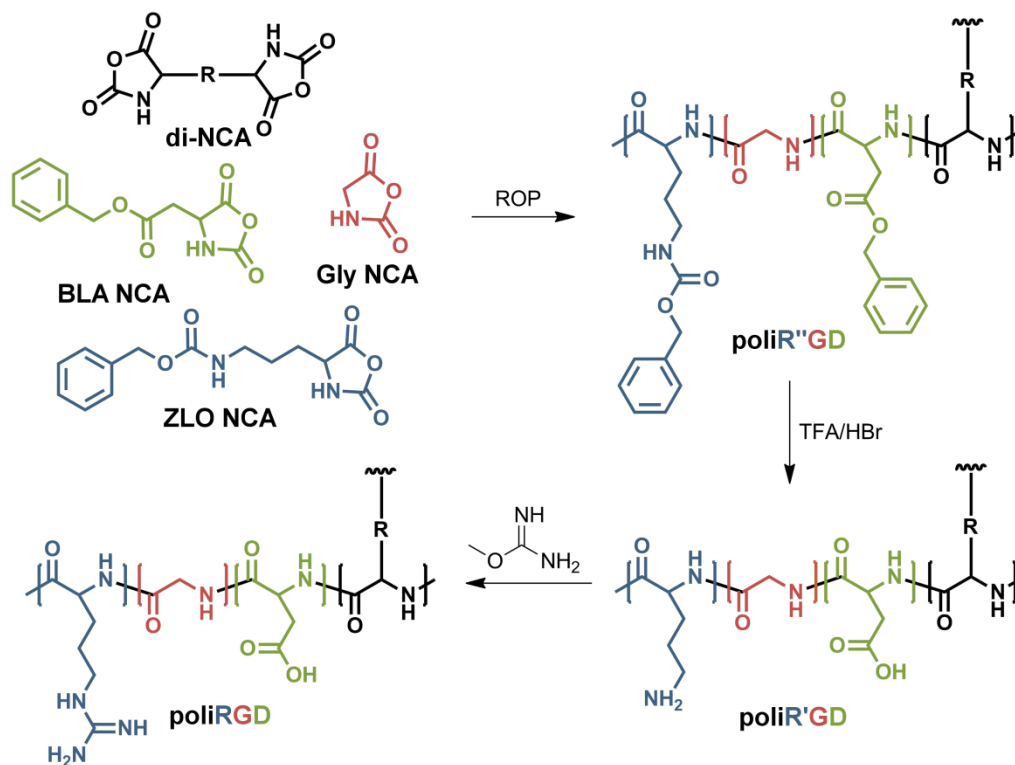
Pristop priprave polipeptidnih poliHIPE-ov smo v nadaljevanju razširili na kopolimere. Pripravili smo poliHIPE na osnovi PBLG-ko-PZLL s kemijsko sestavo BLG : ZLL : Cys 47,5 : 47,5 : 5,0 (mol %), ki po odščiti kaže značilne lastnosti amfoternega polielektrolita. Pri uporabi optimalnih pogojev za pripravo poliHIPE-a na osnovi PBLG (2,0 M raztopina NCA, 3,0 mas. % Me-F127 in 0,5 mol % DIPEA) je polimerizacija reakcijske zmesi BLG NCA in ZLL NCA v HIPE-u potekala prepočasi, zaradi česar se je emulzija predčasno ločila. Pri uporabi optimalnih pogojev za pripravo poliHIPE-a na osnovi PZLL (2,4 M raztopina NCA, 5,5 % mas. % Me-F127 in 1,5 % DIPEA) pa se je zaradi prehitre polimerizacije emulzija spenila. Optimalni eksperimentalni pogoji za kopolimerizacijo reakcijske zmesi BLG NCA in ZLL NCA v HIPE so vmesne vrednosti, in sicer 2,0 M raztopina NCA, 5,0 mas. % Me-F127 in 1,0 mol % DIPEA. Uspešno kopolimerizacijo obeh NCA-monomerov v HIPE-u potrjuje nastanek obstojnega PBLG-ko-PZLL, ki izkazuje tipično poliHIPE-morfologijo s povprečno velikostjo por $46,3 \mu\text{m} \pm 33,7 \mu\text{m}$ (slika 4-40).



Slika 4-40: SEM-mikrograf poliHIPE-a na osnovi PBLG-ko-PZLL.

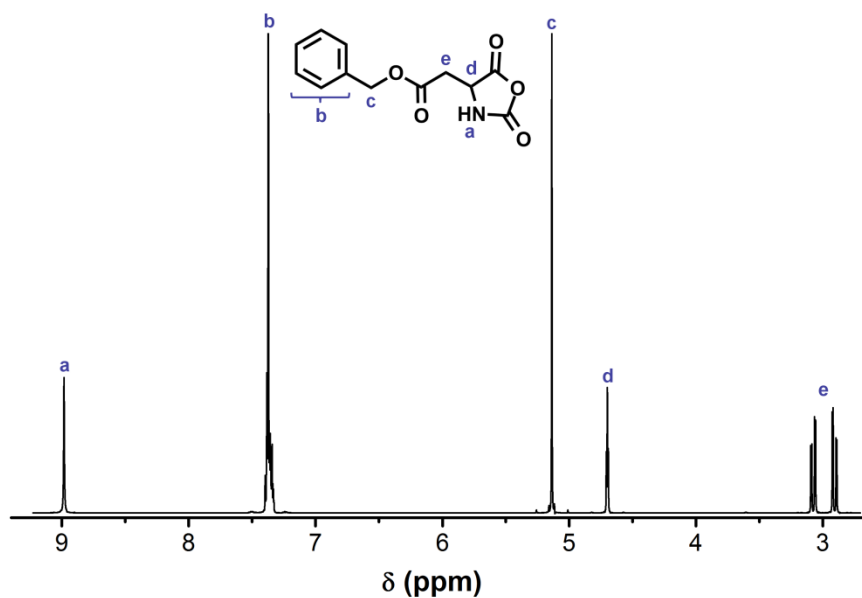
4.3.2 PoliHIPE na osnovi motiva RGD

Možnost kopolimerizacije različnih vrst NCA-monomerov odpira možnost priprave poliHIPE-ov na osnovi polipeptidov z določenimi prepoznavnimi sekvencami v glavni verigi. Najbolj raziskan vezavni motiv je Arg-Gly-Asp (RGD), ki se pojavlja v mnogih proteinih izvenceličnega matriksa. Sekvenco prepoznajo različni celični integrini (receptorji) in se nanj vežejo. Če material ogrodja modificiramo z RGD, lahko izboljšamo pričvrstitev celic na njegovo površino.¹⁹⁸ PArg-*ko*-PGly-*ko*-PAsp (poliRGD) ima reaktivne karboksilne (Asp) in gvanidinske (Arg) stranske skupine. Polipeptid iz zaščitene asparaginske kisline enostavno pripravimo iz β -benzil-L-aspartat (BLA) NCA, ki je soroden BLG NCA. Pri gvanidinski skupini arginina sta potrebni dve zaščitni skupini za pripravo in ROP di-*N*-Cbz-L-arginin NCA,¹⁹⁹ kar bi zaradi sterične oviranosti lahko zmanjšalo reaktivnost NCA. Alternativno lahko gvanidinsko skupino uvedemo s popolimerizacijsko modifikacijo aminske skupine, ki jo dobimo po odščiti polipeptida, pripravljene z ROP *N*₆-karbobenziloksi-L-ornitin (ZLO) NCA.^{165,200} Tako lahko s kopolimerizacijo NCA-monomerov na osnovi ZLO, BLA in Gly pripravimo polipeptidni prekursor, PZLO-*ko*-PGly-*ko*-PBLA (poliR''GD'). Zaščitni benzil karbamat odstranimo sočasno z zaščitnim benzilnim estrom s kislinsko hidrolizo v TFA/HBr, da dobimo POrn-*ko*-PGly-*ko*-PAsp (poliR'GD) motiv. Stranske aminske skupine ornitina nato pretvorimo v gvanidinske z uporabo gvanidizacijskega reagenta, kot je npr. *O*-metilizeosečnina (MIU) (slika 4-41). Pri kopolimerizaciji ZLO NCA, BLA NCA in Gly NCA je statistična verjetnost R''GD'-zaporedja odvisna od reaktivnosti posameznih monomerov in začetnega razmerja med njimi.¹⁶⁵ Pri tem je potrebno upoštevati tudi, da moramo za pripravo obstojnega poliHIPE-materiala kopolimerizirati še NCA-zamreževalec.



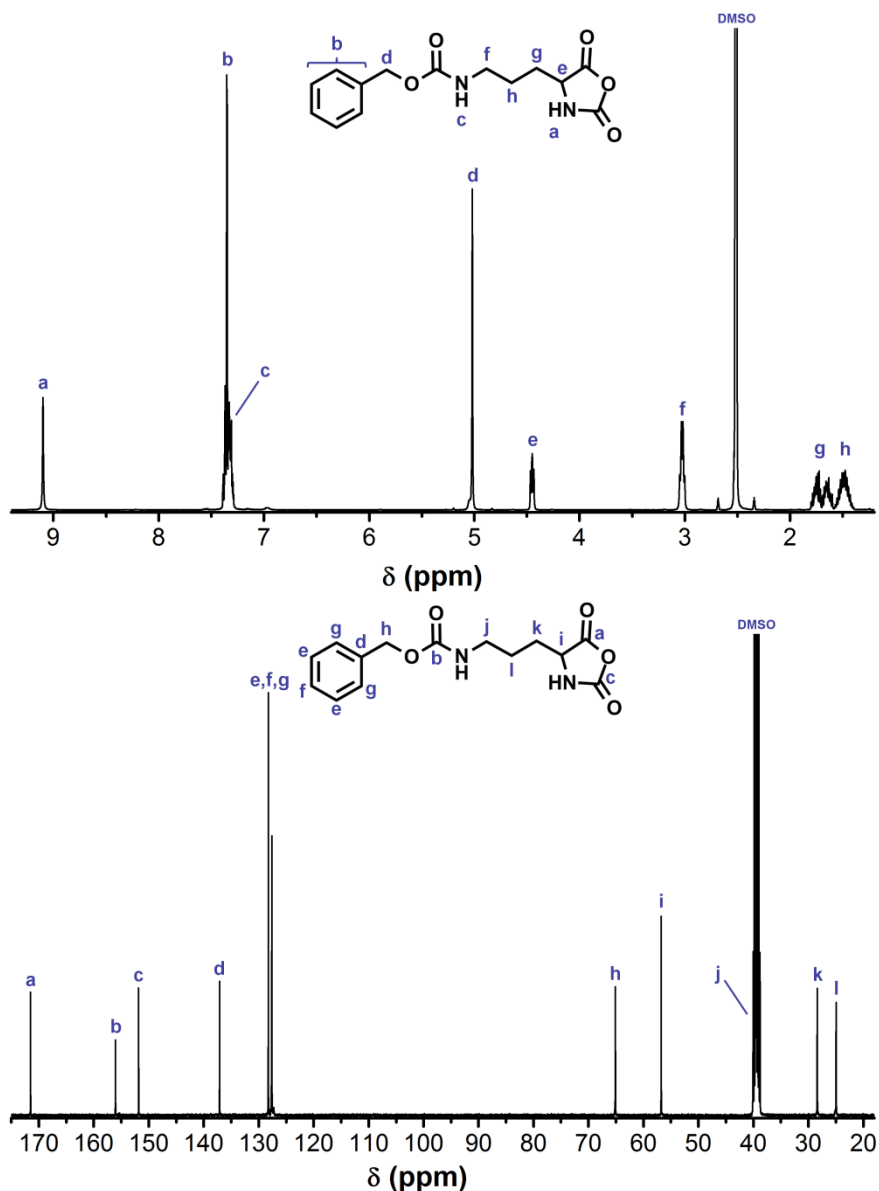
Slika 4-41: Sinteza poliRGD z ROP ustreznih NCA-monomerov, odščito zaščitnih funkcionalnih skupin in popolimerizacijsko modifikacijo.

BLA NCA, ki ima zaščiteno stransko karboksilno skupino, smo sintetizirali na podoben način kot **BLG NCA**. Ustrezno sestavo produkta smo potrdili z ^1H NMR-spektroskopijo (slika 4-42).



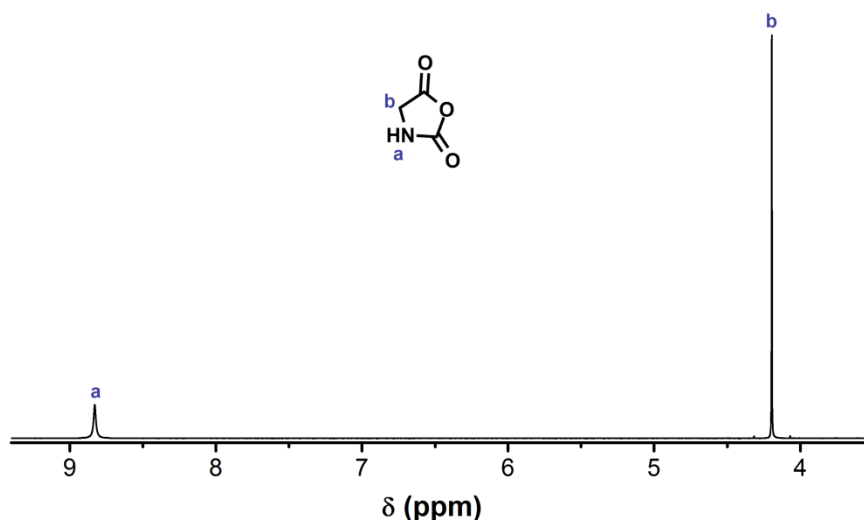
Slika 4-42: ^1H NMR-spekter BLA NCA.

Sinteza ZLO NCA je potekala na podoben način kot sinteza ZLL NCA, vendar smo morali uporabiti večjo količino trifosgena. Ustrezno strukturo in čistost produkta smo potrdili z ^1H in ^{13}C NMR-spektroskopijo (slika 4-43).



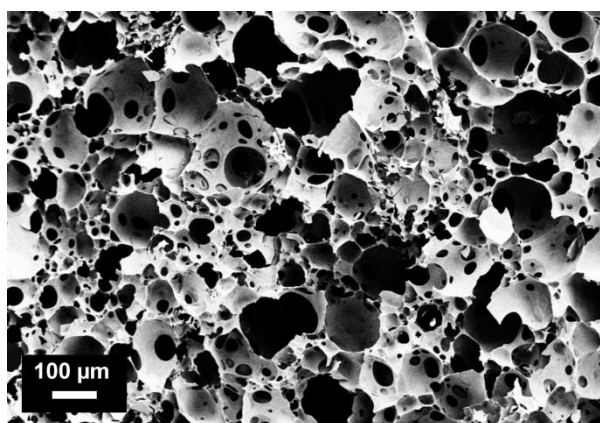
Slika 4-43: ^1H in ^{13}C NMR-spektra ZLO NCA.

Pri sintezi Gly NCA smo se spopadli s podobno težavo kot v primeru cistina, kjer je nezaščiten α -aminokislina slabo topna, med sintezo NCA iz Boc-zaščitenega α -aminokislina pa prihaja do delne polimerizacije. Gly NCA z izboljšano čistostjo smo sintetizirali iz nezaščitenega glicina, kljub nižjemu izkoristku reakcije. Ustrezno sestavo produkta smo potrdili z ^1H NMR-spektroskopijo (slika 4-44).

Slika 4-44: ^1H NMR-spekter Gly NCA.

4.3.2.1 PoliHIPE na osnovi PBLA

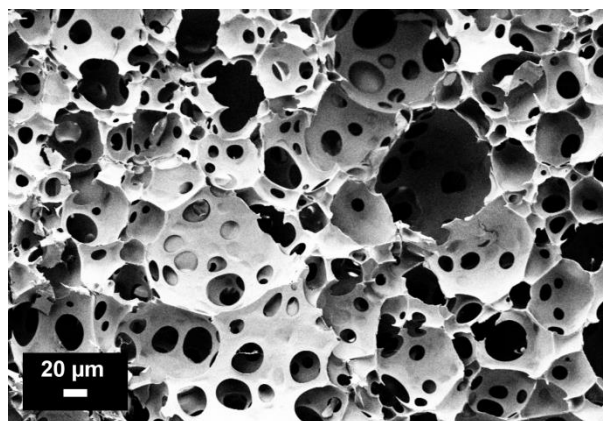
Najprej smo se osredotočili na pripravo poliHIPE-a na osnovi BLA NCA. BLA NCA je manj reaktiven od BLG NCA kot tudi od ZLL NCA, kar se je kazalo na predčasni ločitvi faz HIPE-a, pripravljenega pod enakimi pogoji kot v primeru ZLL NCA. Da bi dodatno pospešili čas želiranja PBLA, smo povišali delež Cys NCA na 10 mol %. Obstojeen poliHIPE smo dobili, ko smo polimerizirali HIPE z 80 vol. % PB, koncentracijo NCA 2,0 M, 5,0 mas. % Me-F127 in 2,5 mol % DIPEA. Za čiščenje poliHIPE-a PBLA se je kot ustreznejše topilo izkazal THF, saj se dimenzije monolita v njem niso spremenile tako kot v primeru uporabe 1,4-dioksana, medtem ko je čistost materiala bila primerljiva, kar smo preverili z ^1H NMR-spektroskopijo ekstrakta poliHIPE-a. Morfologijo poliHIPE-a PBLA prikazuje slika 4-45. Opazimo, da so pore neenakomernih velikosti in oblik, kar nakazuje na manj stabilno emulzijo.



Slika 4-45: SEM-mikrograf poliHIPE-a PBLA.

BLA NCA smo nato kopolimerizirali z Gly NCA v molskem razmerju BLA : Gly : Cys 70 : 20 : 10 (2,0 M raztopina NCA, 75 vol. % PB, 5 mas. % Me-F127, 2,0 mol % DIPEA). HIPE se je fazno ločil, zvezna faza emulzije pa je ostala tekoča tudi po enem dnevu. Zvezno fazo emulzije smo odločili in centrifugirali, pri čemer smo opazili netopen ostanek. Gly NCA je reaktivnejši

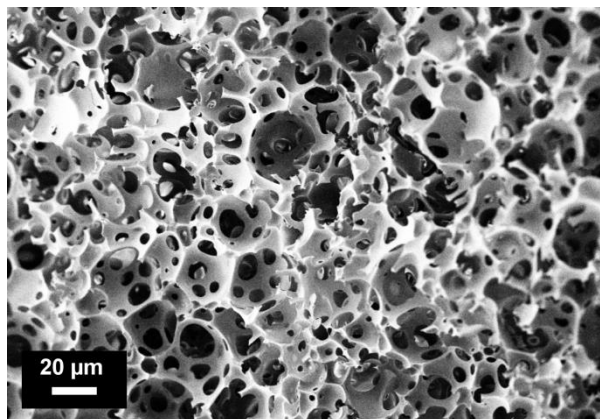
od BLA NCA¹⁶⁵ in bi lahko preferenčno polimeriziral s Cys NCA. Da bi to preverili, smo Gly NCA kopolimerizirali z reaktivnejšim BLG NCA v molskem razmerju BLG : Gly : Cys 75 : 20 : 5 (2,4 M raztopina NCA, 5 mol % Cys NCA, 80 vol. % PB, 5 mas. % Me-F127, 1,5 mol % DIPEA). HIPE je v tem primeru uspešno zaželiral, tako da PBLG-*ko*-PGly izkazuje tipično poliHIPE-morfologijo (slika 4-46). Ti rezultati kažejo, da je reaktivnost Gly NCA-monomera primerna za kopolimerizacijo z BLG NCA in Cys NCA-monomeroma, pri čemer je poraba monomerov enakomerna, kar vodi do nastanka obstojne mreže. Za razliko od BLG NCA se BLA NCA zaradi slabše reaktivnosti ne vključuje dovolj hitro v mrežo. Cys NCA preferenčno kopolimerizira z reaktivnejšim Gly NCA, zato se izloči netopen PGly-*ko*-PCys. Ker se Cys NCA prehitro porabi, BLA NCA tvori homopolimerne domene, kar nakazuje na pomembnost podobne reaktivnosti uporabljenih NCA-monomerov za kopolimerizacijo v HIPE-u.



Slika 4-46: SEM-mikrograf poliHIPE-a PBLG-*ko*-PGly.

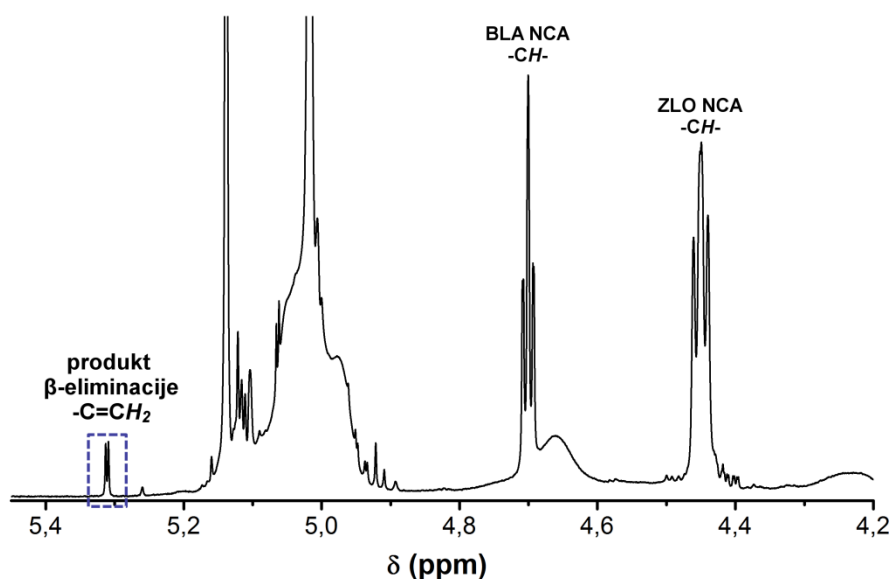
Kot alternativo HIPE-u na osnovi DMF in PB smo raziskali HIPE z DMSO kot zvezno fazo, ki s PB tvori dlje časa stabilno emulzijo.¹³⁷ Pri pripravi 2,0 M raztopine BLA NCA v DMSO smo opazili, da prihaja do polimerizacije že pred dodatkom katalizatorja. Predpostavljamo, da gre za zwitterionsko polimerizacijo, ki jo lahko sproži nukleofilno topilo, saj je znano, da je ta pojav bolj izrazit v DMSO kot v DMF.¹⁷⁸ Da bi preprečili prezgodnjo polimerizacijo NCA, smo negativno nabite zvrsti protonirali z uporabo kisline.^{61,65} V ta namen smo v raztopino BLA NCA v DMSO dodali očetno kislino koncentracije do 1,0 mol % glede na NCA, vendar na ta način nismo mogli preprečiti prezgodnje polimerizacije. V ta namen je bila učinkovitejša TFA, saj je 0,5 mol % TFA zadoščalo, da NCA-monomer ni spontano polimeriziral, dokler nismo dodali v reakcijsko zmes 0,5 mol % katalizatorja. Kot katalizator smo uporabili terciarni amin, da je ROP potekal po mehanizmu AMM, ki zagotavlja hitro polimerizacijo, vendar smo namesto DIPEA uporabili trietilamin (Et₃N), ki je v DMSO bolje topen.

Pripravili smo HIPE na osnovi BLA NCA in Cys NCA v DMSO (molsko razmerje 90 : 10, 2,0 M), z dodatkom 0,5 mol % TFA, 2 mas. % Me-F127, 80 vol. % PB in 0,5 mol % Et₃N. PoliHIPE PBLA_{DMSO} izkazuje tipično templatirano morfologijo, manjša velikost por pa nakazuje na stabilnejšo emulzijo kot v primeru uporabe DMF kot zvezne faze (slika 4-47).

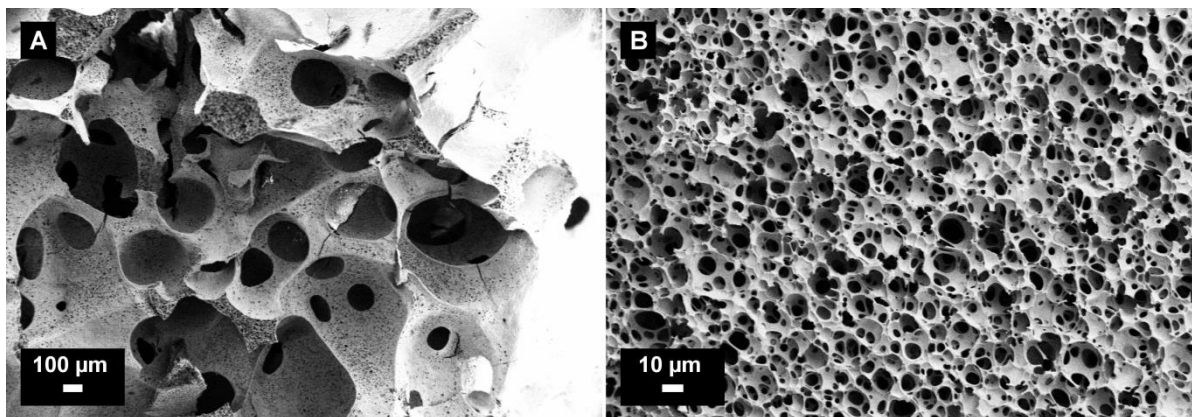
Slika 4-47: SEM-mikrograf polihIPE-a PBLA_{DMSO}.

4.3.2.2 PolihIPE na osnovi PBLA-ko-PZLO

BLA NCA smo nato kopolimerizirali z ZLO NCA, ki je, za razliko od Gly NCA, manj reaktiven od BLA NCA.¹⁶⁵ Kopolimerizacijo BLA NCA, ZLO NCA in Cys NCA (molsko razmerje 45 : 45 : 10, 2,0 M raztopina v DMSO, 1,5 mol % Et₃N) smo spremljali z ¹H NMR-spektroskopijo (slika 4-48). Po 30 min se intenziteta signala na 4,70 ppm, ki pripada metinski skupini BLA NCA, v primerjavi z intenziteto metinskega signala ZLO NCA (4,45 ppm) bistveno zmanjša, tako da razmerje med monomeroma zraste z 1 : 1 na 0,65 : 1 v prid ZLO NCA. V tem času se Cys NCA, katerega značilna signala smo opazovali na 4,79 ppm in 9,26 ppm, v celoti porabi. V ¹H NMR spektru smo opazili tudi dodatne signale na 5,3 ppm, 3,7 ppm in 3,45 ppm, ki so značilni za stranski produkt β-eliminacije cistina, ki nastane v bazičnih pogojih.²⁰¹ Predpostavljamo, da smo z dodatkom previsokega deleža Et₃N vzpostavili preveč bazične pogoje, saj je v takšnih primerih hitrost stranske reakcije prevladala nad hitrostjo ROP. Ker gre pri β-eliminaciji za razpad zamreževalca, želiranje PBLA-ko-PZLO v preveč bazičnih pogojih ni bilo vedno zagotovljeno.

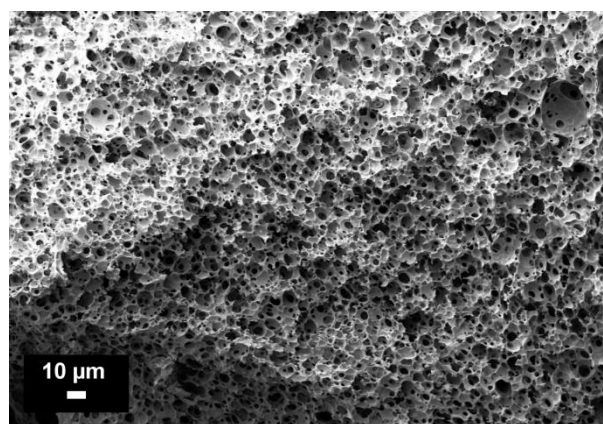
Slika 4-48: ¹H NMR-spekter reakcijske zmesi BLA NCA, ZLO NCA in Cys NCA (molsko razmerje 45 : 45 : 10), izmerjen po 30 min po dodatku 1,5 mol % Et₃N.

Kljub problemu delnega razpadanju Cys NCA smo uspeli pripraviti poliHIPE PBLA-*ko*-PZLO (molsko razmerje BLA : ZLO : Cys 45 : 45 : 10, 2,0 M raztopina v DMSO, dodatek 0,5 mol % TFA, 2 mas. % Me-F127, 80 vol. % PB). Takoj po dodatku 2,0 mol % Et₃N se je HIPE spenil in hitro zaželiral. V poliHIPE ujete mehurčke vidimo na sliki 4-49A, medtem ko stene izkazujejo tipično poliHIPE-morfologijo (slika 4-49B).



Slika 4-49: SEM-mikrografa poliHIPE-a PBLA-*ko*-PZLO: spenjen del (A) in povečava sten (B).

PoliHIPE PBLA-*ko*-PZLO smo v naslednji stopnji odščitili s kislinsko hidrolizo s TFA/HBr, ki hkrati odstrani benzilni ester in benzilni karbamat zaščitni skupini. Pri koraku odstranjevanja zaščitnih skupin je bil pomemben ustrezno kratek čas hidrolize in nadaljnje odstranjevanje HBr s THF, da smo preprečili razpad polipeptidnega ogrodja.²⁰² Po odščiti smo dobili hidrofilni poliHIPE hidrogel PAsp-*ko*-POrn, ki je v vodnem mediju bistveno mehkejši od izhodnega hidrofobnega PBLA-*ko*-PZLO, vendar pa monolit ostane mehansko obstojen. PoliHIPE PAsp-*ko*-POrn je pH-odziven, saj so stranske karboksilne in aminske skupine ionizirane v odvisnosti od pH medija. V nevtralnem mediju se monolit nekoliko skrči zaradi privlačnih elektrostatskih sil med prostimi COO^- in NH_3^+ , vendar ohrani tipično poliHIPE-morfologijo, kot jo vidimo na SEM-sliki (slika 4-50). PoliHIPE PAsp-*ko*-POrn združuje lastnosti polipeptidnih hidrogelov, ki nudijo celicam prijazno okolje,²⁰³ z mehansko obstojnostjo hidrogelnih poliHIPE-materialov.²⁰⁴



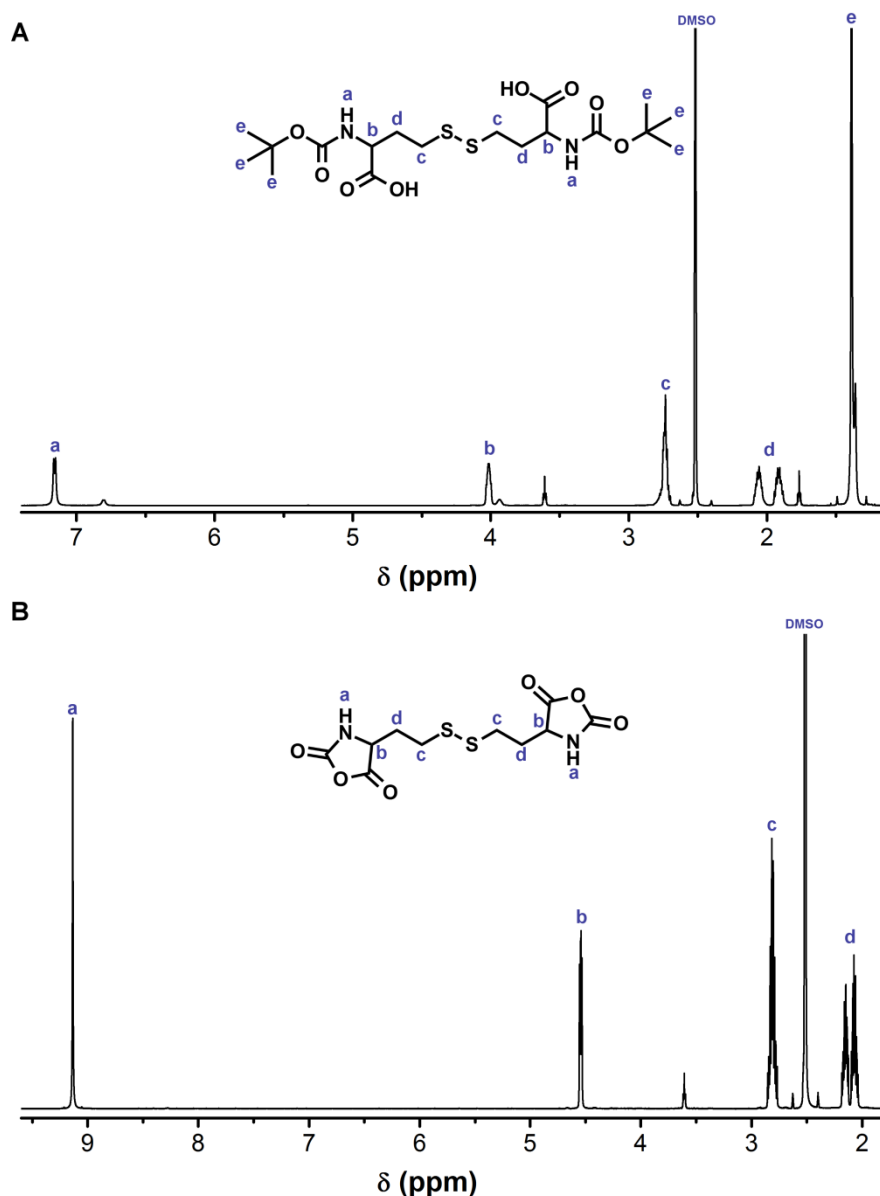
Slika 4-50: SEM-mikrograf odščitenega poliHIPE-a PBLA-*ko*-PZLO (poliHIPE PAsp-*ko*-POrn).

PoliHIPE PAsp-*ko*-POrn smo v nadaljevanju skušali modificirati z uvedbo gvanidinskih skupin v strukturo, da bi dobili segmente PArg, ki nastopajo v RGD-sekvenci. Za gvanidizacijo z

reagentom MIU mora biti aminska skupina v deprotonirani obliki, zato smo modifikacije izvajali v bazičnem mediju.^{165,205} Pri pH 9,5 se je poliHIPE PAsp-ko-POrn raztopil, kar nakazuje na razpad disulfidnih vezi cistinskega zamreževalca, k razpadu monolita pa lahko pripomore tudi neenakomerna kemijska sestava monolita kot posledica različne reaktivnosti in tako neenakomernega vgrajevanja NCA-monomerov v strukturo. Polipeptidni poliHIPE-materiali, zamreženi s cistinom, so občutljivi na razgradnjo v bazičnem mediju. Nasprotno pa so se izkazali kot primerni za uporabo v nevtralnem mediju, npr. za rast celic. Stabilni so tudi v kislem mediju, saj smo reakcijo odščite zaščitene funkcionalnih skupin izvajali v močni kislini. Poleg tega so po odstranitvi zaščitnih skupin monoliti ohranili poliHIPE-morfologijo in ostali mehansko obstojni, kar je velikokrat težko zagotoviti pri popolimerizacijskih modifikacijah poliHIPE-monolitov.⁶

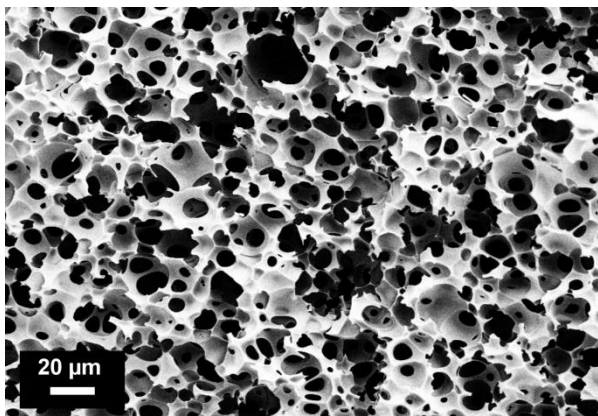
4.3.2.3 Razširitev nabora zamreževalcev

Kot obstojnejšo alternativo Cys NCA-zamreževalcu smo pripravili L-homocistin (Hcys) NCA, pri katerem v bazičnih pogojih ne prihaja do β -eliminacije. Najprej smo na α -aminsko skupino Hcys uvedli Boc-zaščito, ki izboljša topnost α -aminokislina, nato pa smo (Boc-Hcys-OH)₂ ciklizirali s trifosgenom v Hcys NCA. Strukturo obeh produktov smo preverili z ¹H NMR-spektroskopijo, ki potrjuje učinkovitost obeh korakov sinteze (slika 4-51).

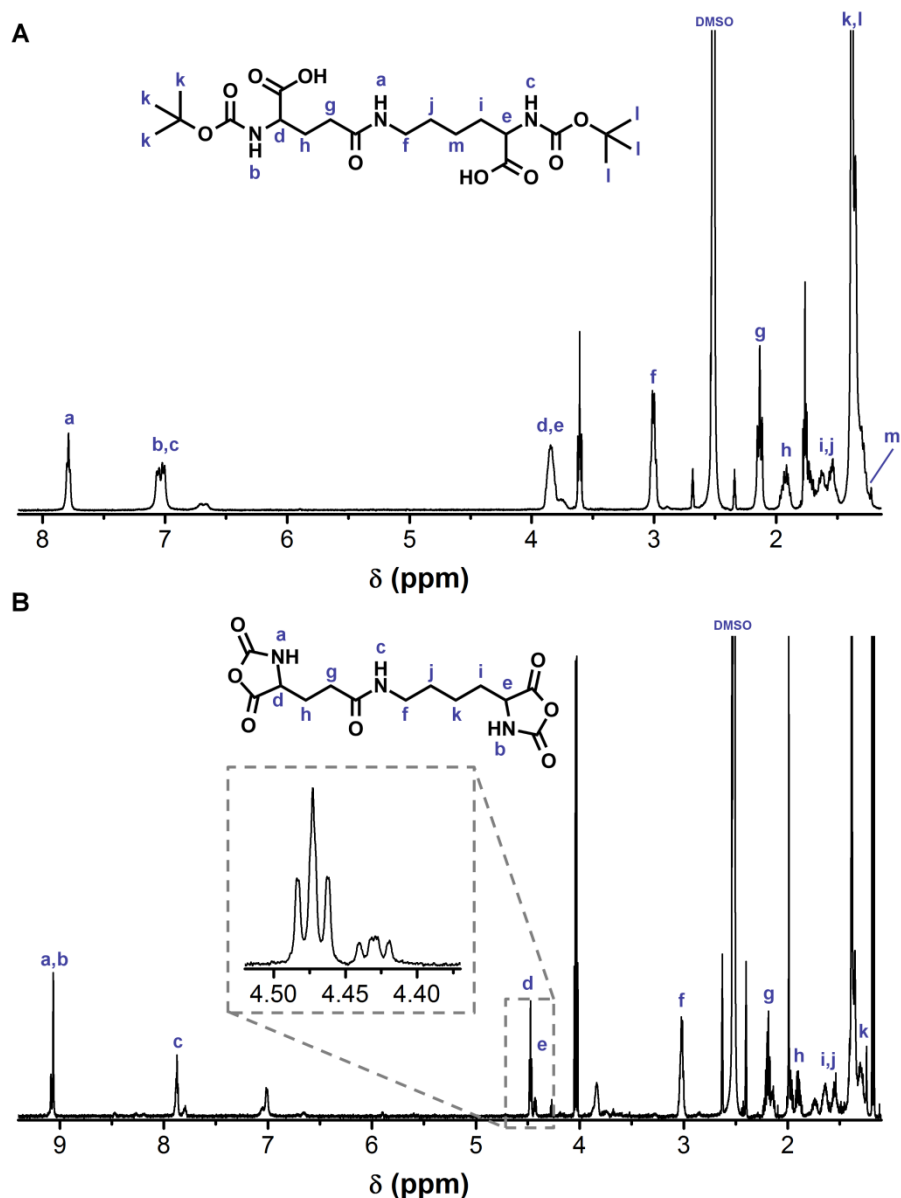


Slika 4-51: ^1H NMR-spektra $(\text{Boc-Hcys-OH})_2$ (A) in Hcys NCA (B).

Pripravili smo poliHIPE PBLA-*ko*-PZLO_{Hcys} (BLA : ZLO : Hcys v molskem razmerju 47,5 : 47,5 : 5,0, 2,4 M raztopina v DMSO, 0,3 mol % TFA, 5 mas. % Me-F127, 80 vol. % PB, 1,5 mol % Et₃N), ki izkazuje tipično poliHIPE-morfologijo (slika 4-52). PoliHIPE smo nato odščitili s kislinsko hidrolizo s TFA/HBr, ki hkrati odstrani estrsko in karbamatno skupino. Za razliko od PBLA-*ko*-PZLO, zamreženega s cistinom, je PBLA-*ko*-PZLO_{Hcys} med odščito razpadel na majhne koščke. Razpad monolita pripisujemo neenakomerni premreženosti polipeptida, ki je posledica večje reaktivnosti Hcys NCA, kar smo jo potrdili z ^1H NMR-spektroskopijo reakcijske zmesi, saj se je Hcys NCA porabil že po 30 min, medtem ko sta v reakcijski zmesi ostala nezreagirana BLA NCA in ZLO NCA.

Slika 4-52: SEM-mikrograf polihIPE-a PBLA-ko-PZLO_{Hcys}.

Podobna reaktivnost vseh uporabljenih NCA-monomerov je bistvenega pomena za pripravo obstojnega polipeptidnega polihIPE-materiala. Kot zamreževalec, ki bi po reaktivnosti bil bolj podoben ZLL/ZLO NCA in BLG/BLA NCA, smo v nadaljevanju sintetizirali NCA na osnovi izodipeptida med glutaminsko kislino in lizinom (Glu-Lys NCA). Zaradi slabe topnosti izhodnega H-Glu(H-Lys-OH)-OH smo najprej z Boc zaščitili α -aminski skupini, Boc-Glu(Boc-Lys-OH)-OH pa nato ciklizirali s trifosgenom v Glu-Lys NCA. Med reakcijo je prihajalo do delne odščite Boc-skupine kljub dodatku α -pinena, zaradi česar se je odščiten izodipeptid izoboril iz raztopine. Posledično ni prišlo do ciklizacije v NCA-obroč na vseh aminokislinskih mestih. ^1H NMR-spekter topnega produkta kaže prisotnost dveh vrst NCA (glutaminskega konca na 4,47 ppm in lizinskega konca na 4,43 ppm), ki sta v razmerju 7 : 2 namesto 1 : 1 (slika 4-53).



Slika 4-53: ^1H NMR-spektra Boc-Glu(Boc-Lys-OH)-OH (A) in Glu-Lys NCA (B).

Možnost priprave NCA na osnovi Glu-Lys izodipeptida nakazuje na potencial za razširitev nabora NCA-zamreževalcev iz raznolikih di-aminokislin. Pokazali smo, da je pri kopolimerizaciji NCA v HIPE-u bistvenega pomena podobna reaktivnost uporabljenih monomerov in zamreževalca. S sintezo novih NCA-zamreževalcev bi lahko pripravili knjižnico različno reaktivnih NCA-monomerov, tako da bi za poljuben monomer lahko izbrali zamreževalec ustrezne reaktivnosti. Pri tem nismo omejeni na naravne di-aminokislino, kot je cistin, temveč lahko preko reaktivnih stranskih skupin združimo različne α -aminokislino in nato iz njih tvorimo di-NCA-zamreževalce. Naš pristop priprave poliHIPE-ov z ROP NCA obeta sintezo različnih polipeptidnih makroporoznih materialov, katerih funkcionalnost lahko enostavno prilagajamo z izborom NCA-monomerov.

5 Zaključek

V raziskovalnem delu smo potrdili hipotezo, da lahko kljub občutljivosti ROP heterociklične monomere polimeriziramo v zvezni fazi HIPE-a in pripravimo obstojne poliHIPE-materiale. ROP je občutljiva na prisotnost vode, saj le-ta lahko deluje kot iniciator polimerizacije, zato smo polimerizacije izvedli v brezvodnih emulzijah, vrste o/o. Emulzije smo stabilizirali s polimernim PEG-*b*-PPG-*b*-PEG surfaktantom, katerega končne hidroksilne skupine smo predhodno metilirali in se tako izognili možnosti, da bi delovale kot iniciatorji ROP. Zaradi termodinamske nestabilnosti HIPE-ov smo za ROP uporabili organske katalizatorje, ki omogočajo izvedbo ROP pri relativno nizkih temperaturah in primerni hitrosti polimerizacije. Hitrost ROP se je izkazala kot izredno pomemben parameter, saj mora zvezna faza emulzije želirati v času stabilnosti emulzije, obenem pa mora biti viskoznost emulzije primerna za zadovoljivo mešanje in prenos HIPE-a v primerne modele. ROP v HIPE-u smo izvedli na primeru dveh vrst monomerov; z laktonom, ki po polimerizaciji tvori poliester, in z različnimi NCA-monomeri, iz katerih pripravimo sintetične polipeptide različne funkcionalnosti.

V prvem delu smo v HIPE-u polimerizirali CL in bis-laktonski zamreževalec BOD. CL je tekoč monomer, zato smo ga neposredno uporabili kot zvezno fazo HIPE-a, brez dodanega topila. HIPE smo polimerizirali z uporabo organokatalizatorja DPP pri temperaturi 50 °C, ki je nad temperaturo tališča nastalega PCL. Pripravili smo poliHIPE na osnovi PCL, zamreženega s 5,0 mol % in 7,5 mol % zamreževalca BOD. S stopnjo zamreženosti smo vplivali na termomehanske lastnosti poliHIPE-materiala, ki smo jih okarakterizirali z DSC in DMA. Tako PCL-5,0 kot PCL-7,5 sta semikristalinična polimera. Temperaturi taljenja in kristalizacije ter delež kristaliničnosti so v primeru PCL-5,0 višji, zaradi česar je njegova hidrolitska razgradnja počasnejša. Oba poliHIPE-a izkazujeta oblikovni spomin z odlično fiksacijo začasne oblike in odlično povrnitvijo v prvotno obliko. Stisnjen poliHIPE PCL-5,0 lahko fiksiramo že pri sobni temperaturi, v prvotno obliko pa se povrne pri segrevanju na temperaturo 40 °C. To odpira možnosti uporabe biološko združljivega in razgradljivega PCL poliHIPE-materiala v biomedicinske namene, saj stisnjen poliHIPE lahko z manj invazivnim posegom vstavimo na mesto poškodbe, tam pa bi se med segrevanjem tik nad telesno temperaturo razširil in zavzel obliko deformacije.

V drugem sklopu doktorskega dela na tematiki ROP v HIPE-u smo metodo razširili na različne vrste NCA-monomerov ter kot prvi pripravili poliHIPE-materiale iz sintetičnih polipeptidov. NCA so trdni monomeri, zato smo za zvezno fazo HIPE-a uporabili raztopino NCA-monomerov v DMF ali DMSO. DMSO tvori s PB sicer stabilnejše emulzije, vendar sproži nastanek zwitterionskih zvrsti, ki vodijo v predčasno polimerizacijo. Ugotovili smo, da lahko neželjeno predčasno polimerizacijo zatremo z dodatkom TFA, nato pa nadzorovano polimerizacijo NCA-monomerov sprožimo z dodatkom terciarnega amina. Hitrost polimerizacije se je, kot v primeru poliestrov, izkazala kot izredno pomemben parameter za uspešno pripravo poliHIPE sintetičnih polipeptidov. Hitrost ROP NCA-monomerov mora biti primerna, da emulzija želira pred pojavom fazne separacije, hkrati pa omogoči nadzorovano izhajanje plinastega CO₂, ki se sprošča med ROP NCA. V nasprotnem primeru se mehurčki ujamejo v strukturo materiala, kar vodi do neželenih večjih praznin v monolitu. Metoda, ki smo jo razvili, omogoča sintezo poliHIPE-ov na osnovi polipeptidov različne kemijske sestave, pri čemer je zaradi razlik v reaktivnosti NCA-monomerov za vsak sistem reaktantov potrebno prilagoditi eksperimentalne pogoje sinteze, kot so koncentracija monomerov,

količina katalizatorja, količina surfaktanta in vrsta topila. Vzpostavili smo relacije med sintezo, strukturo in lastnostmi sintetiziranih poliHIPE-ov ter postavili temelje za načrtovanje in pripravo različno funkcionaliziranih polipeptidnih poliHIPE-materialov. Pripravili in okarakterizirali smo polipeptidne poliHIPE-e na osnovi PBLG, zamreženega s cistinom. Pokazali smo, da lahko z deležem interne faze in količino surfaktanta prilagajamo morfologijo poliHIPE-a, ki igra pomembno vlogo pri uporabi materiala v namen gojenja celic. Na izbranem PBLG poliHIPE-u smo potrdili, da material ni toksičen za mišje fibrosarkoma celice L929 ter da omogoča njihovo rast in proliferacijo. PBLG poliHIPE tako predstavlja potencialen material za gojenje celic in tkivno inženirstvo. V nadaljevanju smo pokazali, da je razvita metoda primerna tudi za pripravo poliHIPE-polimerov na osnovi drugih polipeptidov, kot sta PZLL in PBLA, kot tudi kopolipeptidov. Možnost kopolimerizacije različnih NCA-monomerov odpira možnost priprave polipeptidnih poliHIPE-ov, ki v strukturi vsebujejo specifične prepoznavne sekvence, kot je npr. RGD-motiv, vendar je za uspešno pripravo obstojnega materiala potrebno upoštevati reaktivnost monomerov in zamreževalca. Iz tega razloga smo nabor zamreževalcev razširili, da bi omogočili pripravo kopolipeptidnih poliHIPE-ov iz različnih NCA-monomerov. Na primeru PBLA-ko-PZLO smo pokazali tudi, da lahko z odščito zaščiteneh stranskih skupin polipeptida pripravimo poliHIPE hidrogel PAsp-ko-PORn, ki omogoča nadaljnje popolimerizacijske modifikacije. Nenazadnje smo v tem delu pokazali, da opisan pristop k pripravi polipeptidnih poliHIPE-ov obeta načrtovanje in pripravo polipeptidnih makroporoznih materialov različne kemijske sestave, katerih funkcionalnost lahko enostavno prilagajamo z izborom NCA-monomerov.

6 Literatura

- (1) Silverstein, M. S. PolyHIPEs: Recent Advances in Emulsion-Templated Porous Polymers. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 199–234.
- (2) Wu, D.; Xu, F.; Sun, B.; Fu, R.; He, H.; Matyjaszewski, K. Design and Preparation of Porous Polymers. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3959–4015.
- (3) Silverstein, M. S.; Cameron, N. R.; Hillmyer, M. A. *Porous Polymers.*; Wiley: Hoboken, N.J., 2011.
- (4) Pulko, I.; Krajnc, P. High Internal Phase Emulsion Templating - A Path To Hierarchically Porous Functional Polymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1731–1746.
- (5) Cameron, N. R. High Internal Phase Emulsion Templating as a Route to Well-Defined Porous Polymers. *Polymer* **2005**, *46*, 1439–1449.
- (6) Zhang, T.; Sanguramath, R. A.; Israel, S.; Silverstein, M. S. Emulsion Templating: Porous Polymers and Beyond. *Macromolecules* **2019**, *52*, 5445–5479.
- (7) Silverstein, M. S. Emulsion-Templated Polymers: Contemporary Contemplations. *Polymer* **2017**, *126*, 261–282.
- (8) Aldemir Dikici, B.; Claeysens, F. Basic Principles of Emulsion Templating and Its Use as an Emerging Manufacturing Method of Tissue Engineering Scaffolds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 875.
- (9) Albertsson, A.-C.; Varma, I. K. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1466–1486.
- (10) Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The Return of a Forgotten Polymer—Polycaprolactone in the 21st Century. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1217–1256.
- (11) Hager, M. D.; Bode, S.; Weber, C.; Schubert, U. S. Shape Memory Polymers: Past, Present and Future Developments. *Prog. Polym. Sci.* **2015**, *49–50*, 3–33.
- (12) Deng, C.; Wu, J.; Cheng, R.; Meng, F.; Klok, H.-A.; Zhong, Z. Functional Polypeptide and Hybrid Materials: Precision Synthesis via α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydride Polymerization and Emerging Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 330–364.
- (13) Lin, C.-Y.; Luo, S.-C.; Yu, J.-S.; Chen, T.-C.; Su, W.-F. Peptide-Based Polyelectrolyte Promotes Directional and Long Neurite Outgrowth. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 518–526.
- (14) Svobodová, J.; Proks, V.; Karabiyik, Ö.; Çalikoğlu Koyuncu, A. C.; Torun Köse, G.; Rypáček, F.; Studenovská, H. Poly(Amino Acid)-Based Fibrous Scaffolds Modified with Surface-Pendant Peptides for Cartilage Tissue Engineering: PBLG Scaffolds Modified for Cartilage Tissue Engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, *11*, 831–842.
- (15) Deming, T. J. Synthetic Polypeptides for Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 858–875.
- (16) Zhang, S.; Anderson, M. A.; Ao, Y.; Khakh, B. S.; Fan, J.; Deming, T. J.; Sofroniew, M. V. Tunable Diblock Copolypeptide Hydrogel Depots for Local Delivery of Hydrophobic Molecules in Healthy and Injured Central Nervous System. *Biomaterials* **2014**, *35*, 1989–2000.

- (17) Pakstis, L. M.; Ozbas, B.; Hales, K. D.; Nowak, A. P.; Deming, T. J.; Pochan, D. Effect of Chemistry and Morphology on the Biofunctionality of Self-Assembling Diblock Copolypeptide Hydrogels. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 312–318.
- (18) Zhang, S.; Alvarez, D. J.; Sofroniew, M. V.; Deming, T. J. Design and Synthesis of Nonionic Copolypeptide Hydrogels with Reversible Thermoresponsive and Tunable Physical Properties. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1331–1340.
- (19) Sedlačik, T.; Proks, V.; Šlouf, M.; Dušková-Smrčková, M.; Studenovská, H.; Rypáček, F. Macroporous Biodegradable Cryogels of Synthetic Poly(α -Amino Acids). *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3455–3465.
- (20) Shirbin, S. J.; Lam, S. J.; Chan, N. J.-A.; Ozmen, M. M.; Fu, Q.; O'Brien-Simpson, N.; Reynolds, E. C.; Qiao, G. G. Polypeptide-Based Macroporous Cryogels with Inherent Antimicrobial Properties: The Importance of a Macroporous Structure. *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 552–557.
- (21) Shirbin, S. J.; Karimi, F.; Chan, N. J.-A.; Heath, D. E.; Qiao, G. G. Macroporous Hydrogels Composed Entirely of Synthetic Polypeptides: Biocompatible and Enzyme Biodegradable 3D Cellular Scaffolds. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2981–2991.
- (22) Venkatraman, S.; Boey, F.; Lao, L. L. Implanted Cardiovascular Polymers: Natural, Synthetic and Bio-Inspired. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 853–874.
- (23) Busby, W.; Cameron, N. R.; Jahoda, C. A. B. Emulsion-Derived Foams (PolyHIPes) Containing Poly(ϵ -Caprolactone) as Matrixes for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 154–164.
- (24) Lumelsky, Y.; Silverstein, M. S. Biodegradable Porous Polymers through Emulsion Templating. *Macromolecules* **2009**, *42*, 1627–1633.
- (25) Lumelsky, Y.; Zoldan, J.; Levenberg, S.; Silverstein, M. S. Porous Polycaprolactone–Polystyrene Semi-Interpenetrating Polymer Networks Synthesized within High Internal Phase Emulsions. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1469–1474.
- (26) Changotade, S.; Radu Bostan, G.; Consalus, A.; Poirier, F.; Peltzer, J.; Lataillade, J.-J.; Lutomski, D.; Rohman, G. Preliminary *In Vitro* Assessment of Stem Cell Compatibility with Cross-Linked Poly(ϵ -Caprolactone Urethane) Scaffolds Designed through High Internal Phase Emulsions. *Stem Cells Int.* **2015**, *2015*, 1–8.
- (27) David, D.; Silverstein, M. S. Porous Polyurethanes Synthesized within High Internal Phase Emulsions. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *47*, 5806–5814.
- (28) Johnson, D. W.; Langford, C. R.; Didsbury, M. P.; Lipp, B.; Przyborski, S. A.; Cameron, N. R. Fully Biodegradable and Biocompatible Emulsion Templated Polymer Scaffolds by Thiol-Acrylate Polymerization of Polycaprolactone Macromonomers. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 7256–7263.
- (29) Duda, A.; Kowalski, A. Thermodynamics and Kinetics of Ring-Opening Polymerization. *Handb. Ring-Open. Polym.* **2009**, 1–51.
- (30) Endo, T. General Mechanisms in Ring-Opening Polymerization. *Handb. Ring-Open. Polym.* **2009**, 53–63.
- (31) Cowie, J. M. G.; Arrighi, V. *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*; 2008.
- (32) Kiesewetter, M. K.; Shin, E. J.; Hedrick, J. L.; Waymouth, R. M. Organocatalysis: Opportunities and Challenges for Polymer Synthesis. *Macromolecules* **2010**, *43*, 2093–2107.
- (33) Kamber, N. E.; Jeong, W.; Waymouth, R. M.; Pratt, R. C.; Lohmeijer, B. G. G.; Hedrick, J. L. Organocatalytic Ring-Opening Polymerization. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5813–5840.

- (34) *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters*; Scheirs, J., Long, T. E., Eds.; Wiley series in polymer science; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2003.
- (35) Lecomte, P.; Jérôme, C. Recent Developments in Ring-Opening Polymerization of Lactones. In *Synthetic Biodegradable Polymers*; Rieger, B., Künkel, A., Coates, G. W., Reichardt, R., Dinjus, E., Zevaco, T. A., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; Vol. 245, pp 173–217.
- (36) Larrañaga, A.; Lizundia, E. A Review on the Thermomechanical Properties and Biodegradation Behaviour of Polyesters. *Eur. Polym. J.* **2019**, *121*, 109296.
- (37) Makiguchi, K.; Satoh, T.; Kakuchi, T. Diphenyl Phosphate as an Efficient Cationic Organocatalyst for Controlled/Living Ring-Opening Polymerization of δ -Valerolactone and ϵ -Caprolactone. *Macromolecules* **2011**, *44*, 1999–2005.
- (38) Saito, T.; Aizawa, Y.; Tajima, K.; Isono, T.; Satoh, T. Organophosphate-Catalyzed Bulk Ring-Opening Polymerization as an Environmentally Benign Route Leading to Block Copolyesters, End-Functionalized Polyesters, and Polyester-Based Polyurethane. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 4374–4384.
- (39) Heise, A.; Duxbury, C. J.; Palmans, A. R. Enzyme-Mediated Ring-Opening Polymerization. *Handb. Ring-Open. Polym.* **2009**, 59.
- (40) Huesmann, D.; Klinker, K.; Barz, M. Orthogonally Reactive Amino Acids and End Groups in NCA Polymerization. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 957–971.
- (41) Deming, T. J. Ring-Opening Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; Elsevier, 2012; pp 427–449.
- (42) Leuchs, H.; Geiger, W. Über die Anhydride von α -Amino-N-carbonsäuren und die von α -Aminosäuren. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 1721–1726.
- (43) González-Henríquez, C. M.; Sarabia-Vallejos, M. A.; Rodríguez-Hernández, J. Strategies to Fabricate Polypeptide-Based Structures via Ring-Opening Polymerization of N-Carboxyanhydrides. *Polymers* **2017**, *9*, 551.
- (44) Brown, C. J.; Coleman, D.; Farthing, A. C. Further Studies in Synthetic Polypeptides. *Nature* **1949**, *163*, 834–835.
- (45) Otake, Y.; Nakamura, H.; Fuse, S. Rapid and Mild Synthesis of Amino Acid N-Carboxy Anhydrides: Basic-to-Acidic Flash Switching in a Microflow Reactor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11389–11393.
- (46) Koga, K.; Sudo, A.; Endo, T. Revolutionary Phosgene-Free Synthesis of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides Using Diphenyl Carbonate Based on Activation of α -Amino Acids by Converting into Imidazolium Salts. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48*, 4351–4355.
- (47) Yamada, S.; Sudo, A.; Goto, M.; Endo, T. Phosgene-Free Synthesis of Polypeptides Using Activated Urethane Derivatives of α -Amino Acids: An Efficient Synthetic Approach to Hydrophilic Polypeptides. *RSC Adv* **2014**, *4*, 29890–29896.
- (48) Pahovnik, D.; Hadjichristidis, N. Ring-Opening Polymerization of N-Carboxyanhydrides for Preparation of Polypeptides and Polypeptide-Based Hybrid Materials with Various Molecular Architectures. In *Anionic Polymerization*; Hadjichristidis, N., Hirao, A., Eds.; Springer Japan: Tokyo, 2015; pp 307–337.
- (49) Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pitsikalis, M.; Sakellariou, G. Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5528–5578.

- (50) Kramer, J. R.; Deming, T. J. General Method for Purification of α -Amino Acid- *N*-Carboxyanhydrides Using Flash Chromatography. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3668–3672.
- (51) Vayaboury, W.; Giani, O.; Cottet, H.; Deratani, A.; Schué, F. Living Polymerization of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides (NCA) upon Decreasing the Reaction Temperature. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1221–1224.
- (52) Semple, J. E.; Sullivan, B.; Sill, K. N. Large-Scale Synthesis of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *Synth. Commun.* **2017**, *47*, 53–61.
- (53) Jacobs, J.; Pavlović, D.; Prydderch, H.; Moradi, M.-A.; Ibarboure, E.; Heuts, J. P. A.; Lecommandoux, S.; Heise, A. Polypeptide Nanoparticles Obtained from Emulsion Polymerization of Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 12522–12526.
- (54) Song, Z.; Fu, H.; Wang, J.; Hui, J.; Xue, T.; Pacheco, L. A.; Yan, H.; Baumgartner, R.; Wang, Z.; Xia, Y.; et al. Synthesis of Polypeptides via Bioinspired Polymerization of in Situ Purified *N*-Carboxyanhydrides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 10658–10663.
- (55) Wang, X.; Song, Z.; Tan, Z.; Zhu, L.; Xue, T.; Lv, S.; Fu, Z.; Zheng, X.; Ren, J.; Cheng, J. Facile Synthesis of Helical Multiblock Copolypeptides: Minimal Side Reactions with Accelerated Polymerization of *N*-Carboxyanhydrides. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 1517–1521.
- (56) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- (57) Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. Living Polypeptides. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1653–1656.
- (58) Chan, B. A.; Xuan, S.; Horton, M.; Zhang, D. 1,1,3,3-Tetramethylguanidine-Promoted Ring-Opening Polymerization of *N*-Butyl *N*-Carboxyanhydride Using Alcohol Initiators. *Macromolecules* **2016**, *49*, 2002–2012.
- (59) Zhao, W.; Gnanou, Y.; Hadjichristidis, N. Organocatalysis by Hydrogen-Bonding: A New Approach to Controlled/Living Polymerization of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 6193–6201.
- (60) Zhao, W.; Lv, Y.; Li, J.; Feng, Z.; Ni, Y.; Hadjichristidis, N. Fast and Selective Organocatalytic Ring-Opening Polymerization by Fluorinated Alcohol without a Cocatalyst. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3590.
- (61) Gradišar, Š.; Žagar, E.; Pahovnik, D. Ring-Opening Polymerization of *N*-Carboxyanhydrides Initiated by a Hydroxyl Group. *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 637–640.
- (62) Raftery, E. D.; Gharkhanian, E. G.; Ricapito, N. G.; McNamara, J.; Deming, T. J. Influence of Sulfur-Containing Diamino Acid Structure on Covalently Crosslinked Copolypeptide Hydrogels. *Chem. - Asian J.* **2018**, *13*, 3547–3553.
- (63) Dimitrov, I.; Schlaad, H. Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene–Polypeptide Block Copolymers via Polymerisation of *N*-Carboxyanhydrides. *Chem Commun* **2003**, No. 23, 2944–2945.
- (64) Conejos-Sánchez, I.; Duro-Castano, A.; Birke, A.; Barz, M.; Vicent, M. J. A Controlled and Versatile NCA Polymerization Method for the Synthesis of Polypeptides. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 3182.
- (65) Vacogne, C. D.; Schlaad, H. Primary Ammonium/Tertiary Amine-Mediated Controlled Ring Opening Polymerisation of Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15645–15648.

- (66) Zhao, W.; Gnanou, Y.; Hadjichristidis, N. Fast and Living Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides Triggered by an "Alliance" of Primary and Secondary Amines at Room Temperature. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1352–1357.
- (67) Zhao, W.; Gnanou, Y.; Hadjichristidis, N. From Competition to Cooperation: A Highly Efficient Strategy towards Well-Defined (Co)Polypeptides. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3663–3666.
- (68) Lu, H.; Cheng, J. Hexamethyldisilazane-Mediated Controlled Polymerization of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14114–14115.
- (69) Lu, H.; Cheng, J. *N*-Trimethylsilyl Amines for Controlled Ring-Opening Polymerization of Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides and Facile End Group Functionalization of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12562–12563.
- (70) Yuan, J.; Sun, Y.; Wang, J.; Lu, H. Phenyl Trimethylsilyl Sulfide-Mediated Controlled Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 891–896.
- (71) Yuan, J.; Zhang, Y.; Li, Z.; Wang, Y.; Lu, H. A S-Sn Lewis Pair-Mediated Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides: Fast Kinetics, High Molecular Weight, and Facile Bioconjugation. *ACS Macro Lett.* **2018**, *7*, 892–897.
- (72) Guo, L.; Zhang, D. Cyclic Poly(α -Peptoid)s and Their Block Copolymers from *N*-Heterocyclic Carbene-Mediated Ring-Opening Polymerizations of *N*-Substituted *N*-Carboxyanhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18072–18074.
- (73) Guo, L.; Lahasky, S. H.; Ghale, K.; Zhang, D. *N*-Heterocyclic Carbene-Mediated Zwitterionic Polymerization of *N*-Substituted *N*-Carboxyanhydrides toward Poly(α -Peptoid)s: Kinetic, Mechanism, and Architectural Control. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9163–9171.
- (74) Zhang, Y.; Liu, R.; Jin, H.; Song, W.; Augustine, R.; Kim, I. Straightforward Access to Linear and Cyclic Polypeptides. *Commun. Chem.* **2018**, *1*, 1–7.
- (75) Deming, T. J. Amino Acid Derived Nickelacycles: Intermediates in Nickel-Mediated Polypeptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4240–4241.
- (76) Deming, T. J. Cobalt and Iron Initiators for the Controlled Polymerization of α -Amino Acid-*N*-Carboxyanhydrides. *Macromolecules* **1999**, *32*, 4500–4502.
- (77) Peng, Y.-L.; Lai, S.-L.; Lin, C.-C. Preparation of Polypeptide via Living Polymerization of Z-Lys-NCA Initiated by Platinum Complexes. *Macromolecules* **2008**, *41*, 3455–3459.
- (78) Andronova, N.; Srivastava, R. K.; Albertsson, A.-C. Potential Tissue Implants from the Networks Based on 1,5-Dioxepan-2-One and ϵ -Caprolactone. *Polymer* **2005**, *46*, 6746–6755.
- (79) Hakkarainen, M.; Höglund, A.; Odelius, K.; Albertsson, A.-C. Tuning the Release Rate of Acidic Degradation Products through Macromolecular Design of Caprolactone-Based Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6308–6312.
- (80) Höglund, A.; Hakkarainen, M.; Albertsson, A. Degradation Profile of Poly(ϵ -caprolactone)–the Influence of Macroscopic and Macromolecular Biomaterial Design. *J. Macromol. Sci. Part A* **2007**, *44*, 1041–1046.
- (81) Höglund, A.; Odelius, K.; Hakkarainen, M.; Albertsson, A.-C. Controllable Degradation Product Migration from Cross-Linked Biomedical Polyester-Ethers through Predetermined Alterations in Copolymer Composition. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2025–2032.
- (82) Nijenhuis, A. J.; Grijpma, D. W.; Pennings, A. J. Crosslinked Poly(L-Lactide) and Poly(ϵ -Caprolactone). *Polymer* **1996**, *37*, 2783–2791.

- (83) Ryner, M.; Albertsson, A.-C. Tailored Mechanical Properties and Degradability of Polyesters by Controlled Molecular Architecture. *Macromol. Symp.* **2001**, *175*, 11–18.
- (84) De Hoe, G. X.; Zumstein, M. T.; Tiegs, B. J.; Brutman, J. P.; McNeill, K.; Sander, M.; Coates, G. W.; Hillmyer, M. A. Sustainable Polyester Elastomers from Lactones: Synthesis, Properties, and Enzymatic Hydrolyzability. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 963–973.
- (85) Bilalis, P.; Varlas, S.; Kiafa, A.; Velentzas, A.; Stravopodis, D.; Iatrou, H. Preparation of Hybrid Triple-Stimuli Responsive Nanogels Based on Poly(L-Histidine). *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2016**, *54*, 1278–1288.
- (86) Murphy, R. D.; Bobbi, E.; Oliveira, F. C. S.; Cryan, S.; Heise, A. Gelating Polypeptide Matrices Based on the Difunctional *N*-carboxyanhydride Diaminopimelic Acid Cross-linker. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2019**, *57*, 1209–1215.
- (87) Studenovská, H.; Vodička, P.; Proks, V.; Hlučilová, J.; Motlík, J.; Rypáček, F. Synthetic Poly(Amino Acid) Hydrogels with Incorporated Cell-Adhesion Peptides for Tissue Engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2010**, 454–463.
- (88) Sedlačík, T.; Studenovská, H.; Rypáček, F. Enzymatic Degradation of the Hydrogels Based on Synthetic Poly(α -Amino Acid)s. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 781–788.
- (89) Ahrens, C. C.; Welch, M. E.; Griffith, L. G.; Hammond, P. T. Uncharged Helical Modular Polypeptide Hydrogels for Cellular Scaffolds. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3774–3783.
- (90) He, H.; Sofman, M.; Wang, A. J.-S.; Ahrens, C. C.; Wang, W.; Griffith, L. G.; Hammond, P. T. Engineering Helical Modular Polypeptide-Based Hydrogels as Synthetic Extracellular Matrices for Cell Culture. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 566–580.
- (91) Yan, S.; Wang, T.; Feng, L.; Zhu, J.; Zhang, K.; Chen, X.; Cui, L.; Yin, J. Injectable In Situ Self-Cross-Linking Hydrogels Based on Poly(L-Glutamic Acid) and Alginate for Cartilage Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4495–4508.
- (92) Vacogne, C. D.; Brosnan, S. M.; Masic, A.; Schlaad, H. Fibrillar Gels via the Self-Assembly of Poly(L-Glutamate)-Based Statistical Copolymers. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5040–5052.
- (93) Ren, K.; He, C.; Cheng, Y.; Li, G.; Chen, X. Injectable Enzymatically Crosslinked Hydrogels Based on a Poly(L-Glutamic Acid) Graft Copolymer. *Polym Chem* **2014**, *5*, 5069–5076.
- (94) Ren, K.; Cui, H.; Xu, Q.; He, C.; Li, G.; Chen, X. Injectable Polypeptide Hydrogels with Tunable Microenvironment for 3D Spreading and Chondrogenic Differentiation of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3862–3871.
- (95) Xu, Q.; Zhang, Z.; Xiao, C.; He, C.; Chen, X. Injectable Polypeptide Hydrogel as Biomimetic Scaffolds with Tunable Bioactivity and Controllable Cell Adhesion. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1411–1418.
- (96) Ren, K.; He, C.; Xiao, C.; Li, G.; Chen, X. Injectable Glycopolypeptide Hydrogels as Biomimetic Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials* **2015**, *51*, 238–249.
- (97) Dolynchuk, O.; Kolesov, I.; Jehnichen, D.; Reuter, U.; Radusch, H.-J.; Sommer, J.-U. Reversible Shape-Memory Effect in Cross-Linked Linear Poly(ϵ -Caprolactone) under Stress and Stress-Free Conditions. *Macromolecules* **2017**, *50*, 3841–3854.
- (98) Lumelsky, Y.; Lalush-Michael, I.; Levenberg, S.; Silverstein, M. S. A Degradable, Porous, Emulsion-Templated Polyacrylate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *47*, 7043–7053.

- (99) Aldemir Dikici, B.; Sherborne, C.; Reilly, G. C.; Claeysens, F. Emulsion Templated Scaffolds Manufactured from Photocurable Polycaprolactone. *Polymer* **2019**, *175*, 243–254.
- (100) Lendlein, A.; Behl, M.; Hiebl, B.; Wischke, C. Shape-Memory Polymers as a Technology Platform for Biomedical Applications. *Expert Rev. Med. Devices* **2010**, *7*, 357–379.
- (101) Lendlein, A.; Kelch, S. Shape-Memory Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2034.
- (102) Defize, T.; Riva, R.; Raquez, J.-M.; Dubois, P.; Jérôme, C.; Alexandre, M. Thermoreversibly Crosslinked Poly(ϵ -Caprolactone) as Recyclable Shape-Memory Polymer Network. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1264–1269.
- (103) Xu, X.; Davis, K. A.; Yang, P.; Gu, X.; Henderson, J. H.; Mather, P. T. Shape Memory RGD-Containing Networks: Synthesis, Characterization, and Application in Cell Culture. *Macromol. Symp.* **2011**, *309–310*, 162–172.
- (104) Raquez, J.-M.; Vanderstappen, S.; Meyer, F.; Verge, P.; Alexandre, M.; Thomassin, J.-M.; Jérôme, C.; Dubois, P. Design of Cross-Linked Semicrystalline Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Networks with One-Way and Two-Way Shape-Memory Properties through Diels-Alder Reactions. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 10135–10143.
- (105) Baker, R. M.; Henderson, J. H.; Mather, P. T. Shape Memory Poly(ϵ -Caprolactone)-Co-Poly(Ethylene Glycol) Foams with Body Temperature Triggering and Two-Way Actuation. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4916.
- (106) Kai, D.; Prabhakaran, M. P.; Yu Chan, B. Q.; Liow, S. S.; Ramakrishna, S.; Xu, F.; Loh, X. J. Elastic Poly(ϵ -Caprolactone)-Polydimethylsiloxane Copolymer Fibers with Shape Memory Effect for Bone Tissue Engineering. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*, 015007.
- (107) Zhang, D.; Petersen, K. M.; Grunlan, M. A. Inorganic–Organic Shape Memory Polymer (SMP) Foams with Highly Tunable Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 186–191.
- (108) Zhang, D.; George, O. J.; Petersen, K. M.; Jimenez-Vergara, A. C.; Hahn, M. S.; Grunlan, M. A. A Bioactive “Self-Fitting” Shape Memory Polymer Scaffold with Potential to Treat Cranio-Maxillo Facial Bone Defects. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 4597–4605.
- (109) Zhang, D.; Burkes, W. L.; Schoener, C. A.; Grunlan, M. A. Porous Inorganic–Organic Shape Memory Polymers. *Polymer* **2012**, *53*, 2935–2941.
- (110) Madbouly, S. A.; Kratz, K.; Klein, F.; Lützow, K.; Lendlein, A. Thermomechanical Behaviour of Biodegradable Shape-Memory Polymer Foams. *MRS Online Proc. Libr. Arch.* **2009**, *1190*.
- (111) Woodard, L. N.; Kmetz, K. T.; Roth, A. A.; Page, V. M.; Grunlan, M. A. Porous Poly(ϵ -Caprolactone)–Poly(L-Lactic Acid) Semi-Interpenetrating Networks as Superior, Defect-Specific Scaffolds with Potential for Cranial Bone Defect Repair. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 4075–4083.
- (112) Lu, L.; Cao, J.; Li, G. A Polycaprolactone-Based Syntactic Foam with Bidirectional Reversible Actuation. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*, 45225.
- (113) Kai, D.; Tan, M. J.; Prabhakaran, M. P.; Chan, B. Q. Y.; Liow, S. S.; Ramakrishna, S.; Loh, X. J. Biocompatible Electrically Conductive Nanofibers from Inorganic–Organic Shape Memory Polymers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *148*, 557–565.

- (114) Miao, S.; Zhu, W.; Castro, N. J.; Leng, J.; Zhang, L. G. Four-Dimensional Printing Hierarchy Scaffolds with Highly Biocompatible Smart Polymers for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part C Methods* **2016**, *22*, 952–963.
- (115) Zhang, F.; Zhou, T.; Liu, Y.; Leng, J. Microwave Synthesis and Actuation of Shape Memory Polycaprolactone Foams with High Speed. *Sci. Rep.* **2015**, *5*.
- (116) Liu, X.; Zhao, K.; Gong, T.; Song, J.; Bao, C.; Luo, E.; Weng, J.; Zhou, S. Delivery of Growth Factors Using a Smart Porous Nanocomposite Scaffold to Repair a Mandibular Bone Defect. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1019–1030.
- (117) Chung, S. E.; Park, C. H. The Thermo-responsive Shape Memory Characteristics of Polyurethane Foam. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117*, 2265–2271.
- (118) Hasan, S. M.; Nash, L. D.; Maitland, D. J. Porous Shape Memory Polymers: Design and Applications. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2016**, *54*, 1300–1318.
- (119) Loh, Q. L.; Choong, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2013**, *19*, 485–502.
- (120) Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474–5491.
- (121) Barbetta, A.; Cameron, N. R. Morphology and Surface Area of Emulsion-Derived (PolyHIPE) Solid Foams Prepared with Oil-Phase Soluble Porogenic Solvents: Span 80 as Surfactant. *Macromolecules* **2004**, *37*, 3188–3201.
- (122) Bružauskaitė, I.; Bironaitė, D.; Bagdonas, E.; Bernotienė, E. Scaffolds and Cells for Tissue Regeneration: Different Scaffold Pore Sizes—Different Cell Effects. *Cytotechnology* **2016**, *68*, 355–369.
- (123) Hu, Y.; Wang, J.; Li, X.; Hu, X.; Zhou, W.; Dong, X.; Wang, C.; Yang, Z.; Binks, B. P. Facile Preparation of Bioactive Nanoparticle/Poly(ϵ -Caprolactone) Hierarchical Porous Scaffolds via 3D Printing of High Internal Phase Pickering Emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *545*, 104–115.
- (124) Song, H.; Yang, G.; Huang, P.; Kong, D.; Wang, W. Self-Assembled PEG–Poly(L-Valine) Hydrogels as Promising 3D Cell Culture Scaffolds. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 1724–1733.
- (125) Yun, E. J.; Yon, B.; Joo, M. K.; Jeong, B. Cell Therapy for Skin Wound Using Fibroblast Encapsulated Poly(Ethylene Glycol)-Poly(L-Alanine) Thermogel. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1106–1111.
- (126) Kim, S.-J.; Park, M. H.; Moon, H. J.; Park, J. H.; Ko, D. Y.; Jeong, B. Polypeptide Thermogels as a Three Dimensional Culture Scaffold for Hepatogenic Differentiation of Human Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 17034–17043.
- (127) Park, M. H.; Moon, H. J.; Park, J. H.; Shinde, U. P.; Ko, D. Y.; Jeong, B. PEG-Poly(L-Alanine) Thermogel As a 3D Scaffold of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: PEG-Poly(L-Alanine) Thermogel As a 3D Scaffold. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15*, 464–472.
- (128) Choi, B. G.; Park, M. H.; Cho, S.-H.; Joo, M. K.; Oh, H. J.; Kim, E. H.; Park, K.; Han, D. K.; Jeong, B. In Situ Thermal Gelling Polypeptide for Chondrocytes 3D Culture. *Biomaterials* **2010**, *31*, 9266–9272.
- (129) Lin, J.-Y.; Lai, P.-L.; Lin, Y.-K.; Peng, S.; Lee, L.-Y.; Chen, C.-N.; Chu, I.-M. A Poloxamer-Polypeptide Thermosensitive Hydrogel as a Cell Scaffold and Sustained Release Depot. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 2976–2985.

- (130) Cheng, Y.; He, C.; Xiao, C.; Ding, J.; Cui, H.; Zhuang, X.; Chen, X. Versatile Biofunctionalization of Polypeptide-Based Thermosensitive Hydrogels via Click Chemistry. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 468–475.
- (131) Li, G.; Wu, J.; Wang, B.; Yan, S.; Zhang, K.; Ding, J.; Yin, J. Self-Healing Supramolecular Self-Assembled Hydrogels Based on Poly(L-Glutamic Acid). *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3508–3518.
- (132) Yan, S.; Zhang, K.; Liu, Z.; Zhang, X.; Gan, L.; Cao, B.; Chen, X.; Cui, L.; Yin, J. Fabrication of Poly(L-Glutamic Acid)/Chitosan Polyelectrolyte Complex Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1541.
- (133) Zhang, K.; Zhang, Y.; Yan, S.; Gong, L.; Wang, J.; Chen, X.; Cui, L.; Yin, J. Repair of an Articular Cartilage Defect Using Adipose-Derived Stem Cells Loaded on a Polyelectrolyte Complex Scaffold Based on Poly(L-Glutamic Acid) and Chitosan. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7276–7288.
- (134) Qian, J.; Yong, X.; Xu, W.; Jin, X. Preparation and Characterization of Bimodal Porous Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 4587–4593.
- (135) Cui, N.; Qian, J.; Wang, J.; Ji, C.; Xu, W.; Wang, H. Preparation and Characterization of Foamy Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate-Co-L-Phenylalanine)/Bioglass Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 73699–73708.
- (136) Griffin, W. C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB.” *J Soc Cosmet Chem* **1949**, *1*, 311–326.
- (137) Cameron, N. R.; Sherrington, D. C. Non-Aqueous High Internal Phase Emulsions. Preparation and Stability. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 1543–1547.
- (138) Gurevitch, I.; Silverstein, M. S. Polymerized Pickering HIPEs: Effects of Synthesis Parameters on Porous Structure. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48*, 1516–1525.
- (139) Aveyard, R.; Binks, B. P.; Clint, J. H. Emulsions Stabilised Solely by Colloidal Particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102*, 503–546.
- (140) Chevalier, Y.; Bolzinger, M.-A. Emulsions Stabilized with Solid Nanoparticles: Pickering Emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *439*, 23–34.
- (141) Palocci, C.; Barbetta, A.; La Grotta, A.; Dentini, M. Porous Biomaterials Obtained Using Supercritical CO₂-Water Emulsions. *Langmuir* **2007**, *23*, 8243–8251.
- (142) Barbetta, A.; Dentini, M.; Zannoni, E. M.; De Stefano, M. E. Tailoring the Porosity and Morphology of Gelatin-Methacrylate PolyHIPE Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Langmuir* **2005**, *21*, 12333–12341.
- (143) Barbetta, A.; Massimi, M.; Conti Devirgiliis, L.; Dentini, M. Enzymatic Cross-Linking versus Radical Polymerization in the Preparation of Gelatin PolyHIPEs and Their Performance as Scaffolds in the Culture of Hepatocytes. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3059–3068.
- (144) Barbetta, A.; Massimi, M.; Di Rosario, B.; Nardecchia, S.; De Colli, M.; Devirgiliis, L. C.; Dentini, M. Emulsion Templated Scaffolds That Include Gelatin and Glycosaminoglycans. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2844–2856.
- (145) Lamson, M.; Epshtein-Assor, Y.; Silverstein, M. S.; Matyjaszewski, K. Synthesis of Degradable PolyHIPEs by AGET ATRP. *Polymer* **2013**, *54*, 4480–4485.
- (146) Christenson, E. M.; Soofi, W.; Holm, J. L.; Cameron, N. R.; Mikos, A. G. Biodegradable Fumarate-Based PolyHIPEs as Tissue Engineering Scaffolds. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3806–3814.

- (147) Robinson, J. L.; Moglia, R. S.; Stuebben, M. C.; McEnery, M. A. P.; Cosgriff-Hernandez, E. Achieving Interconnected Pore Architecture in Injectable PolyHIPEs for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 1103–1112.
- (148) Moglia, R. S.; Holm, J. L.; Sears, N. A.; Wilson, C. J.; Harrison, D. M.; Cosgriff-Hernandez, E. Injectable PolyHIPEs as High-Porosity Bone Grafts. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3621–3628.
- (149) Robinson, J. L.; McEnery, M. A. P.; Pearce, H.; Whitely, M. E.; Munoz-Pinto, D. J.; Hahn, M. S.; Li, H.; Sears, N. A.; Cosgriff-Hernandez, E. Osteoinductive PolyHIPE Foams as Injectable Bone Grafts. *Tissue Eng. Part A* **2016**, *22*, 403–414.
- (150) Caldwell, S.; Johnson, D. W.; Didsbury, M. P.; Murray, B. A.; Wu, J. J.; Przyborski, S. A.; Cameron, N. R. Degradable Emulsion-Templated Scaffolds for Tissue Engineering from Thiol–Ene Photopolymerisation. *Soft Matter* **2012**, *8*, 10344–10351.
- (151) Paljevac, M.; Gradišnik, L.; Lipovšek, S.; Maver, U.; Kotek, J.; Krajnc, P. Multiple-Level Porous Polymer Monoliths with Interconnected Cellular Topology Prepared by Combining Hard Sphere and Emulsion Templating for Use in Bone Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **2018**, *18*, 1700306.
- (152) Lee, A.; Langford, C. R.; Rodriguez-Lorenzo, L. M.; Thissen, H.; Cameron, N. R. Bioceramic Nanocomposite Thiol-Acrylate PolyHIPE Scaffolds for Enhanced Osteoblastic Cell Culture in 3D. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 2035–2047.
- (153) Murphy, A. R.; Ghobrial, I.; Jamshidi, P.; Laslett, A.; O'Brien, C. M.; Cameron, N. R. Tailored Emulsion-Templated Porous Polymer Scaffolds for iPSC-Derived Human Neural Precursor Cell Culture. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 6617–6627.
- (154) Sušec, M.; Liska, R.; Rusmüller, G.; Kotek, J.; Krajnc, P. Microcellular Open Porous Monoliths for Cell Growth by Thiol-Ene Polymerization of Low-Toxicity Monomers in High Internal Phase Emulsions. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15*, 253–261.
- (155) Lovelady, E.; Kimmins, S. D.; Wu, J.; Cameron, N. R. Preparation of Emulsion-Templated Porous Polymers Using Thiol–Ene and Thiol–Yne Chemistry. *Polym Chem* **2011**, *2*, 559–562.
- (156) Naranda, J.; Sušec, M.; Maver, U.; Gradišnik, L.; Gorenjak, M.; Vukasović, A.; Ivković, A.; Rupnik, M. S.; Vogrin, M.; Krajnc, P. Polyester Type PolyHIPE Scaffolds with an Interconnected Porous Structure for Cartilage Regeneration. *Sci. Rep.* **2016**, *6*.
- (157) Samanta, A.; Nandan, B.; Srivastava, R. K. Morphology of Electrospun Fibers Derived from High Internal Phase Emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *471*, 29–36.
- (158) Hu, Y.; Gao, H.; Du, Z.; Liu, Y.; Yang, Y.; Wang, C. Pickering High Internal Phase Emulsion-Based Hydroxyapatite–Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocomposite Scaffolds. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 3848–3857.
- (159) Pérez-García, M. G.; Gutiérrez, M. C.; Mota-Morales, J. D.; Luna-Bárceñas, G.; del Monte, F. Synthesis of Biodegradable Macroporous Poly(L-Lactide)/Poly(ϵ -Caprolactone) Blend Using Oil-in-Eutectic-Mixture High-Internal-Phase Emulsions as Template. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 16939–16949.
- (160) Yadav, A.; Pal, J.; Nandan, B.; Srivastava, R. K. Macroporous Scaffolds of Cross-Linked Poly(ϵ -Caprolactone) via High Internal Phase Emulsion Templating. *Polymer* **2019**, *176*, 66–73.
- (161) Tan, H.; Tu, Z.; Jia, H.; Gou, X.; Ngai, T. Hierarchical Porous Protein Scaffold Templated from High Internal Phase Emulsion Costabilized by Gelatin and Gelatin Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 4820–4829.

- (162) Audouin, F.; Fox, M.; Larragy, R.; Clarke, P.; Huang, J.; O'Connor, B.; Heise, A. Polypeptide-Grafted Macroporous PolyHIPE by Surface-Initiated *N*-Carboxyanhydride (NCA) Polymerization as a Platform for Bioconjugation. *Macromolecules* **2012**, *45*, 6127–6135.
- (163) Nguyen, N. T.; Thurecht, K. J.; Howdle, S. M.; Irvine, D. J. Facile One-Spot Synthesis of Highly Branched Polycaprolactone. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 2997.
- (164) Gutiérrez, A.; Marzo, I.; Cativiela, C.; Laguna, A.; Gimeno, M. C. Highly Cytotoxic Bioconjugated Gold(I) Complexes with Cysteine-Containing Dipeptides. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 11088–11095.
- (165) Mbizana, S.; Hlalele, L.; Pfukwa, R.; Du Toit, A.; Lumkwana, D.; Loos, B.; Klumperman, B. Synthesis and Cell Interaction of Statistical L-Arginine–Glycine–L-Aspartic Acid Terpolypeptides. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 3058–3066.
- (166) Utroša, P.; Onder, O. C.; Žagar, E.; Kovačič, S.; Pahovnik, D. Shape Memory Behavior of Emulsion-Templated Poly(ϵ -Caprolactone) Synthesized by Organocatalyzed Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **2019**, *52*, 9291–9298.
- (167) Onder, O. C.; Utroša, P.; Caserman, S.; Podobnik, M.; Žnidarič, M. T.; Grdadolnik, J.; Kovačič, S.; Žagar, E.; Pahovnik, D. Emulsion-Templated Synthetic Polypeptide Scaffolds Prepared by Ring-Opening Polymerization of *N*-Carboxyanhydrides. *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 4260–4270.
- (168) Zhao, J.; Gou, M.; Dai, M.; Li, X.; Cao, M.; Huang, M.; Wen, Y.; Kan, B.; Qian, Z.; Wei, Y. Preparation, Characterization, and *in Vitro* Cytotoxicity Study of Cationic PCL-Pluronic-PCL (PCFC) Nanoparticles for Gene Delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *90A*, 506–513.
- (169) Kovačič, S.; Preishuber-Pflügl, F.; Pahovnik, D.; Žagar, E.; Slugovc, C. Covalent Incorporation of the Surfactant into High Internal Phase Emulsion Templated Polymeric Foams. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7725–7728.
- (170) Williams, J. M.; Wroblewski, D. A. Spatial Distribution of the Phases in Water-in-Oil Emulsions. Open and Closed Microcellular Foams from Cross-Linked Polystyrene. *Langmuir* **1988**, *4*, 656–662.
- (171) Crescenzi, V.; Manzini, G.; Calzolari, G.; Borri, C. Thermodynamics of Fusion of Poly- β -Propiolactone and Poly- ϵ -Caprolactone. Comparative Analysis of the Melting of Aliphatic Polylactone and Polyester Chains. *Eur. Polym. J.* **1972**, *8*, 449–463.
- (172) Pitt, C. G.; Hendren, R. W.; Schindler, A.; Woodward, S. C. The Enzymatic Surface Erosion of Aliphatic Polyesters. *J. Controlled Release* **1984**, *1*, 3–14.
- (173) Hearon, K.; Singhal, P.; Horn, J.; Small, W.; Olsovsky, C.; Maitland, K. C.; Wilson, T. S.; Maitland, D. J. Porous Shape-Memory Polymers. *Polym. Rev.* **2013**, *53*, 41–75.
- (174) Mazo, A. R.; Allison-Logan, S.; Karimi, F.; Chan, N. J.-A.; Qiu, W.; Duan, W.; O'Brien-Simpson, N. M.; Qiao, G. G. Ring Opening Polymerization of α -Amino Acids: Advances in Synthesis, Architecture and Applications of Polypeptides and Their Hybrids. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 4737–4834.
- (175) Xing, T.; Lai, B.; Ye, X.; Yan, L. Disulfide Core Cross-Linked PEGylated Polypeptide Nanogel Prepared by a One-Step Ring Opening Copolymerization of *N*-Carboxyanhydrides for Drug Delivery: Disulfide Core Cross-Linked PEGylated *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 962–969.
- (176) Sulistio, A.; Blencowe, A.; Widjaya, A.; Zhang, X.; Qiao, G. Development of Functional Amino Acid-Based Star Polymers. *Polym Chem* **2012**, *3*, 224–234.

- (177) Grassi, L.; Cabrele, C. Susceptibility of Protein Therapeutics to Spontaneous Chemical Modifications by Oxidation, Cyclization, and Elimination Reactions. *Amino Acids* **2019**, *51*, 1409–1431.
- (178) Kricheldorf, H. R.; von Lossow, C.; Schwarz, G. Cyclic Polypeptides by Solvent-Induced Polymerizations of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides. *Macromolecules* **2005**, *38*, 5513–5518.
- (179) Habraken, G. J. M.; Peeters, M.; Dietz, C. H. J. T.; Koning, C. E.; Heise, A. How Controlled and Versatile Is *N*-Carboxy Anhydride (NCA) Polymerization at 0 °C? Effect of Temperature on Homo-, Block- and Graft (Co)Polymerization. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 514.
- (180) Song, Z.; Tan, Z.; Cheng, J. Recent Advances and Future Perspectives of Synthetic Polypeptides from *N*-Carboxyanhydrides. *Macromolecules* **2019**, *52*, 8521–8539.
- (181) Colton, J. S.; Suh, N. P. Nucleation of Microcellular Foam: Theory and Practice. *Polym. Eng. Sci.* **1987**, *27*, 500–503.
- (182) Kumar, V.; Suh, N. P. A Process for Making Microcellular Thermoplastic Parts. *Polym. Eng. Sci.* **1990**, *30*, 1323–1329.
- (183) Han, J. H.; Han, C. D. A Study of Bubble Nucleation in a Mixture of Molten Polymer and Volatile Liquid in a Shear Flow Field. *Polym. Eng. Sci.* **1988**, *28*, 1616–1627.
- (184) Niehoff, A.; Mantion, A.; McAloney, R.; Huber, A.; Falkenhagen, J.; Goh, C. M.; Thünemann, A. F.; Winnik, M. A.; Menzel, H. Elucidation of the Structure of Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate) Nanofibers and Gel Networks in a Helicogenic Solvent. *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291*, 1353–1363.
- (185) Sasaki, S.; Hikata, M.; Shiraki, C.; Uematsu, I. Molecular Aggregation and Gelation in Poly(γ -Benzyl L-Glutamate) Solutions. *Polym. J.* **1982**, *14*, 205–213.
- (186) Ginzburg, B.; Siromyatnikova, T.; Frenkel, S. Gelation in the Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate) — Dimethylformamide System. *Polym. Bull.* **1985**, *13*, 139–144.
- (187) Izumi, Y.; Takezawa, H.; Kikuta, N.; Uemura, S.; Tsutsumi, A. Two-Stage Melting in Dilute Gels of Poly(γ -Benzyl L-Glutamate). *Macromolecules* **1998**, *31*, 430–435.
- (188) Sridhar, C. G.; Hines, W. A.; Samulski, E. T. Polypeptide Liquid Crystals: Magnetic Susceptibility, Twist Elastic Constant, Rotational Viscosity Coefficient, and Poly- γ -benzyl-L-glutamate Sidechain Conformation. *J. Chem. Phys.* **1974**, *61*, 947–953.
- (189) Bandekar, J. Amide Modes and Protein Conformation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, *1120*, 123–143.
- (190) Schweitzer-Stenner, R.; Eker, F.; Huang, Q.; Griebenow, K.; Mroz, P. A.; Kozlowski, P. M. Structure Analysis of Dipeptides in Water by Exploring and Utilizing the Structural Sensitivity of Amide III by Polarized Visible Raman, FTIR-Spectroscopy and DFT Based Normal Coordinate Analysis. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 4294–4304.
- (191) Grdadolnik, J.; Mohacek-Grosov, V.; Baldwin, R. L.; Avbelj, F. Populations of the Three Major Backbone Conformations in 19 Amino Acid Dipeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 1794–1798.
- (192) Mirtič, A.; Grdadolnik, J. The Structure of Poly-L-Lysine in Different Solvents. *Biophys. Chem.* **2013**, *175–176*, 47–53.
- (193) Murphy, C. M.; Haugh, M. G.; O'Brien, F. J. The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2010**, *31*, 461–466.

- (194) Ren, X.; Tapias, L. F.; Jank, B. J.; Mathisen, D. J.; Lanuti, M.; Ott, H. C. Ex Vivo Non-Invasive Assessment of Cell Viability and Proliferation in Bio-Engineered Whole Organ Constructs. *Biomaterials* **2015**, *52*, 103–112.
- (195) Itou, S.; Nishioka, N.; Norisuye, T.; Teramoto, A. Rodlike Nature of α -Helical Polypeptides in Solution. *Macromolecules* **1981**, *14*, 904–909.
- (196) Spach, G.; Freund, L.; Daune, M.; Benoît, H. Détermination de La Dimension Des Molécules de Poly-L- γ -Glutamate de Benzyle et de Poly-L- ϵ -Carbobenzoxy-Lysine Par Des Méthodes Hydrodynamiques—Effets de La Flexibilité. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 468–482.
- (197) Zelzer, M.; Heise, A. Determination of Copolymerisation Characteristics in the N-Carboxy Anhydride Polymerisation of Two Amino Acids. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 3896–3904.
- (198) Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. RGD Modified Polymers: Biomaterials for Stimulated Cell Adhesion and Beyond. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- (199) Holowka, E. P.; Sun, V. Z.; Kamei, D. T.; Deming, T. J. Polyarginine Segments in Block Copolypeptides Drive Both Vesicular Assembly and Intracellular Delivery. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 52–57.
- (200) Kudo, S.; Nagasaki, Y. Facile and Quantitative Synthesis of a Poly(Ethylene Glycol)-*b*-Poly(L-Arginine) Block Copolymer and Its Use for the Preparation of Polyion Complex Micelles with Polyanions for Biomedical Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 1916–1922.
- (201) Chang, J.-Y.; Knecht, R. Direct Analysis of the Disulfide Content of Proteins: Methods for Monitoring the Stability and Refolding Process of Cystine-Containing Proteins. *Anal. Biochem.* **1991**, *197*, 52–58.
- (202) Can Onder, O.; Utroša, P.; Caserman, S.; Podobnik, M.; Žagar, E.; Pahovnik, D. Preparation of Synthetic Polypeptide PolyHIPE Hydrogels with Stimuli-Responsive Behavior. *Macromolecules* **2021**, *v postopku objave*.
- (203) Zhou, X.; Li, Z. Advances and Biomedical Applications of Polypeptide Hydrogels Derived from α -Amino Acid N-Carboxyanhydride (NCA) Polymerizations. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1800020.
- (204) Ovadia, M.; Silverstein, M. S. High Porosity, Responsive Hydrogel Copolymers from Emulsion Templating. *Polym. Int.* **2016**, *65*, 280–289.
- (205) Beardsley, R. L.; Reilly, J. P. Optimization of Guanidination Procedures for MALDI Mass Mapping. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1884–1890.

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Izjava doktorskega kandidata

Podpisana **Petra Utroša**, vpisna številka **K3000968**

izjavljam,

da je doktorska disertacija z naslovom **Porozni polimeri, pripravljene s polimerizacijo z odpiranjem obroča v emulzijah**

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da predložena disertacija v celoti ali v delih ni bila predložena za pridobitev kakršnekoli izobrazbe po študijskih programih drugih fakultet ali univerz,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Petra Utroša

Bibliografija kandidata

v neposredni zvezi z doktorsko disertacijo

UTROŠA, Petra, ÖNDER, Özgün Can, ŽAGAR, Ema, KOVAČIČ, Sebastijan, PAHOVNIK, David. Shape memory behavior of emulsion-templated poly(ϵ -caprolactone) synthesized by organocatalyzed ring-opening polymerization. *Macromolecules*. 10 Dec. 2019, vol. 52, iss. 23, str. 9291-9298. ISSN 0024-9297.

ÖNDER, Özgün Can, UTROŠA, Petra, CASERMAN, Simon, PODOBNIK, Marjetka, TUŠEK-ŽNIDARIČ, Magda, GRDADOLNIK, Jože, KOVAČIČ, Sebastijan, ŽAGAR, Ema, PAHOVNIK, David. Emulsion-templated synthetic polypeptide scaffolds prepared by ring-opening polymerization of *N*-carboxyanhydrides. *Polymer chemistry*. 14 Jul. 2020, vol. 11, iss. 26, str. 4260-4270. ISSN 1759-9962.

ÖNDER, Özgün Can, UTROŠA, Petra, CASERMAN, Simon, PODOBNIK, Marjetka, ŽAGAR, Ema, PAHOVNIK, David. Preparation of synthetic polypeptide polyHIPE hydrogels with stimuli-responsive behavior. *Macromolecules*. v postopku objave.