

**Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické technologie**



**Studium vlivu kombinace mukoadhezivních polymerů na chování  
matricových systémů v prostředí žaludku**

**Effect of combination of mucoadhesive polymers on the behaviour of  
matrix tablets in the gastric environment**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Vedoucí diplomové práce:  
Konzultant:  
Hradec Králové, 2021**

**PharmDr. Barbora Vraníková, Ph.D.  
Mgr. Chiazor Ugo Ogadah  
Karolína Johnová**

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne

Karolína Johnová

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Barboře Vraníkové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Chiazor Ugo Ugadah za jejich odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a čas během vypracovávání této práce. Dále děkuji za finanční podporu projektům GAUK 70119/2019 a SVV 260 547.

# Obsah

1. Abstrakt.....	6
2. Abstract .....	7
3. Cíl práce .....	8
4. Seznam symbolů a zkratek.....	9
5. Úvod.....	10
6. Teoretická část .....	12
6.1 Biofarmaceutické aspekty podání léčiv do kolonu.....	12
6.1.1 Anatomie a fyziologie kolonu .....	12
6.1.2 Patofyziologie kolonu .....	13
6.2 Možnosti cílení léčiv do tlustého střeva .....	13
6.2.1 Využití proléčiv.....	13
6.2.2 Polymerní obaly .....	13
6.2.3 Polymerní matrice .....	16
6.2.4 Časově-dependentní formulace .....	17
6.2.5 Částicové systémy .....	18
6.2.6 Mukoadhezivní systémy.....	19
6.2.7 Moderní metody cílení léčiv .....	19
6.3 Mukoadheze.....	22
6.3.1 Teorie mukoadheze a typy vazeb .....	23
6.3.2 Faktory ovlivňující mukoadhezi.....	24
6.4 Hodnocení mukoadheze .....	26
6.4.1 <i>In vitro</i> a <i>ex vivo</i> testy .....	26
6.4.2 <i>In vivo</i> testy .....	38
7. Experimentální část.....	39
7.1 Použité suroviny .....	39
7.2 Použité přístroje.....	40
7.3 Použité metody .....	41
7.3.1 Příprava práškových směsí.....	41
7.3.2 Příprava tablet .....	41
7.3.3 Příprava pufru a biorelevantního média FaSSGF.....	42
7.3.4 Měření viskozity polymerních disperzí.....	43
7.3.5 Stanovení indexu bobtnání .....	45
7.3.6 Hodnocení tablet disolučními testy .....	46

8. Výsledky a diskuse.....	47
8.1 Hodnocení viskozity polymerů a jejich směsí.....	47
8.2 Hodnocení bobtnavosti tablet .....	52
8.3 Vyhodnocení disolučních profilů .....	55
9. Závěr .....	58
10. Použitá literatura .....	59

# 1. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra:	Farmaceutické technologie
Školitel:	PharmDr. Barbora Vraníková, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Chiazor Ugo Ogadah
Posluchač:	Karolína Johnová
Název diplomové práce:	Studium vlivu kombinace mukoadhezivních polymerů na chování matricových systémů v prostředí žaludku

Cílený přívod léčiv do kolonu zaujímá významné postavení ve farmakoterapii lokálních onemocnění tlustého střeva (kolorektální karcinom, nespecifické střevní záněty apod.). V rámci řízeného uvolňování léčiv musí formulace odolávat kyselému prostředí horní části gastrointestinálního traktu. Vyšší účinnosti léčivé látky v postižené oblasti je mimo jiné možné dosáhnout použitím tzv. mukoadhezivních transportních lékových systémů, které prodlouží dobu setrvání formulace v místě absorpce. Tato preformulační studie se proto zabývala hodnocením vlastností matricových tablet založených na mukoadhezivních polymerech v prostředí žaludku, jelikož znalost chování systémů v kyselém prostředí je důležitá z důvodu změn pH vyvolaných záněty tlustého střeva.

Vybrané polymery guarová klovatina (GK) a hypromelóza K15M (HPMC K15M) se použily samostatně nebo v kombinacích v poměrech 100:0; 85,4:14,6; 50:50; 14,6:85,6 a 0:100. Na absolutním rotačním reometru se měřila viskozita příslušných polymerních disperzí v biorelevantním disolučním médiu simulujícím prostředí žaludku (FaSSGF). Vylisované tablety s modelovým léčivem theofylinem se podrobily testu bobtnavosti a disolučním zkouškám. Na základě výsledků lze konstatovat, že všechny hydrofilní matricové systémy byly schopné prodloužit uvolňování léčiva na 24 hodin. Nicméně, kombinace polymerů s dominantním zastoupením HPMC K15M (14,6:85,6 a 0:100) se zdá být nejslibnější z důvodu vytvoření silné, odolné gelové bariéry během prvních 2 hodin disoluce, čímž se potlačilo riziko předčasného uvolnění léčiva. Naopak u směsí s vysokým zastoupením GK byl pozorován tzv. burst-effect, ke kterému došlo v důsledku rapidního nabobtnání a rozpuštění vnějších kompletně hydratovaných vrstev GK způsobující rychlou difúzi léčiva do média.

## 2. Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of:	Pharmaceutical Technology
Mentor:	PharmDr. Barbora Vraníková, Ph.D.
Consultant:	Mgr. Chiazor Ugo Ogadah
Student:	Karolína Johnová
Title of Thesis:	Effect of combination of mucoadhesive polymers on the behaviour of matrix tablets in the gastric environment

Colon-targeted drug delivery plays a significant role in the pharmacotherapy of local diseases situated in the large intestine (colorectal cancer, inflammatory bowel diseases etc.). In terms of sustained drug release, such formulations carrying the active substance must be resistant to the acidic environment of the upper gastrointestinal tract. In addition, an enhanced therapeutic efficacy may be achieved by prolonging the residence time of the formulation at the absorption site by means of mucoadhesive drug delivery systems. For these reasons, the presented preformulation study investigates the behaviour of matrix tablets based on mucoadhesive polymers in the gastric environment. Knowledge of the system behaviour in acidic pH is important as the surrounding of an inflammatory colon may be lower in comparison to the physiological conditions.

The selected polymers, guar gum (GK) and hydroxypropyl methylcellulose K15M (HPMC K15M) were used separately or combined in ratios 100:0, 85.4:14.6, 50:50, 14.6:85.4 and 0:100, respectively. The viscosity of polymers dispersions was evaluated in biorelevant dissolution media Fasted State Simulating Gastric Fluid (FaSSGF) using a rotational rheometer. Subsequently, compacts containing model drug theophylline were prepared and evaluated for their swelling behaviour and dissolution profiles. The obtained data shows that all hydrophilic matrix systems were able to sustain the drug release for up to 24 hours. Mixtures containing mainly HPMC K15M (14.6:85.4 and 0:100) seems to be the most promising as HPMC forms the strongest gel barrier preventing premature drug release. Contrarily, compacts with a high amount of GK performed poorly as a pronounced burst-effect may be observed due to its rapid swelling and dissolving of outer, fully hydrated layers into the gastric medium.

### 3. Cíl práce

Teoretická část této diplomové práce se zabývá problematikou cíleného přívodu léčiv do tlustého střeva a stručně charakterizuje specifické lékové systémy s tím spojené. Detailněji je pak popsán mechanismus mukoadheze společně s faktory, které mohou přilnutí materiálu k mukózní membráně ovlivnit, a především pak hodnocení míry mukoadheze prostřednictvím *in vitro* a *ex vivo* testů, kde se zaměřuje na jejich podstatu a provedení.

Cílem experimentální části je hodnocení chování a vlastností mukoadhezivních polymerů guarové klovatiny, hypromelózy K15M a jejich směsí v biorelevantním médiu s pH 1,6 simulujícím kyselé prostředí žaludku. Připravené polymerní směsi budou podrobeny stanovení viskozity různě koncentrovaných disperzí. Následně budou připraveny matricové tablety s obsahem modelového léčiva theofylinu, které budou podrobeny testování bobtnavosti a disolučním zkouškám. Získané výsledky by měly následně společně s výstupy z navazujících zkoušek provedených v biorelevantním médiu simulující prostředí tenkého a tlustého střeva poskytnout komplexnější znalosti o chování těchto polymerů, což umožní využít racionální přístup k formulaci lékových systémů zacílených do tlustého střeva.



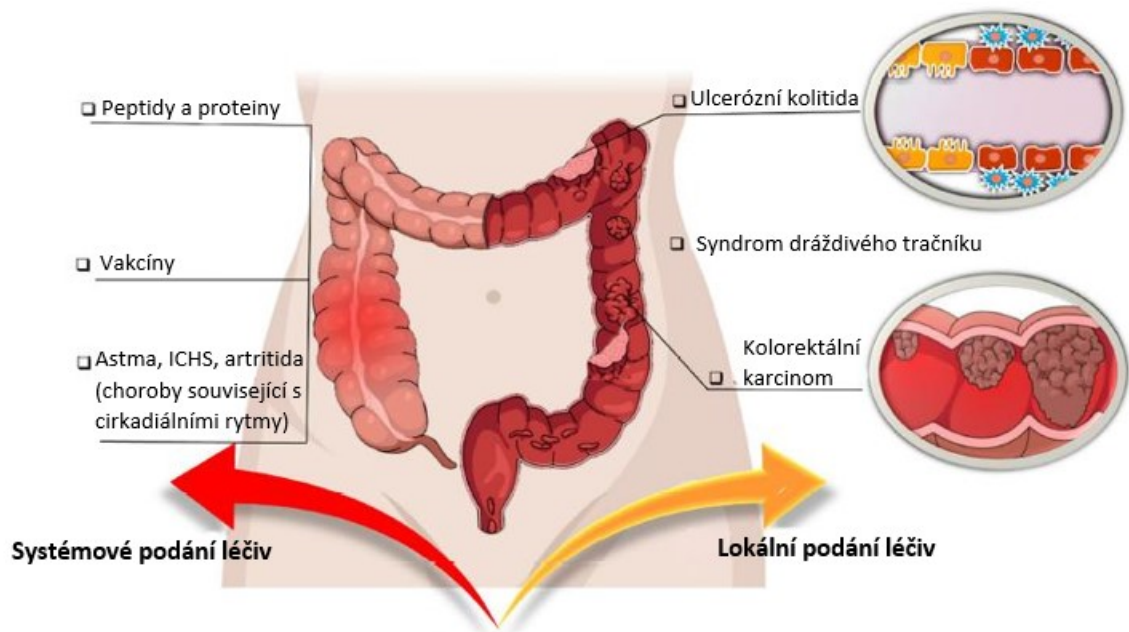
## 4. Seznam symbolů a zkratk

Zkratka/symbol	Význam
FaSSGF	biorelevantní disoluční médium simulující prostředí žaludku nalačno (Fasted State Simulated Gastric Fluid)
GIT	gastrointestinální trakt
GK	guarová klovatina
HPMC	hypromelóza (hydroxypropylmethylcelulóza)
HPMC K15M	hypromelóza s viskozitním stupněm 15 000 [mPa.s]
K	koeficient konzistence [Pa.s]
LSS	systemy kapalina v pevné fázi, liquisolid systemy
$n$	index tokového chování
SI	index bobtnavosti (Swelling Index) [%]

## 5. Úvod

Především v posledních 25 letech je cílenému přívodu léčiv do kolonu (angl. colon-targeting) věnována zvyšující se pozornost, a to pro jeho unikátní farmaceutický potenciál a klinické přínosy, kterých nelze dosáhnout tradičním podáváním léčiv s okamžitým nebo postupným uvolňováním. K cílené distribuci léčivých látek do kolonu se využívají speciální transportní lékové systémy, které jsou schopny dopravit léčivo v nejvyšší možné koncentraci až na požadované místo působení, tedy do tlustého střeva.<sup>1</sup> Výsledkem je zvýšená účinnost léčiva díky jeho přímému působení v postižené oblasti, redukce dávky a minimalizace nežádoucích účinků, které se jinak mohou objevit v případě předčasného uvolnění léčiva v horní části gastrointestinálního traktu (GIT) nebo v důsledku systémové absorpce.<sup>1,2</sup> Mezi další výhody patří zvýšená absorpce léčiv s nízkou biologickou dostupností, snížená iritace žaludku a redukované náklady spojené s nižší frekvencí dávkování především ekonomicky náročné farmakoterapie. Nevýhodou cíleného přívodu léčiv do tlustého střeva může být na druhé straně složité technologické zpracování, nekompletní uvolnění léčiva, možné ovlivnění účinku přítomnou mikroflórou (metabolickými procesy), potenciální nescifická vazba léčiva na zbytky potravy, hlen či na stolici vedoucí ke snížení jeho biodostupnosti.<sup>3</sup>

Distribuce léčiv do kolonu nachází své uplatnění jak při lokálním, tak systémovém podání (Obr. 1). Lokálně lze léčit střevní infekce, syndrom dráždivého tračnicku, spastický kolon, kolorektální karcinom a obstipaci a dále nescifické střevní záněty, tj. Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu, v jejichž terapii se hojně využívají aminosalicyláty, kortikosteroidy (hydrokortizon, budesonid, prednisolon), dále imunosupresiva (azathioprin, 6-merkaptopurin, methotrexát, takrolimus a cyklosporin) a nově moderní biologická léčiva.<sup>4,5</sup> Taktéž je známo efektivní podání anthelmintik a diagnostických látek přímo do zasažené oblasti kolonu.<sup>4</sup> V rámci systémové terapie představuje tlusté střevo vhodné místo pro zpožděnou absorpci léčiv, která je žádoucí v případě chronických onemocnění s manifestací a elevací těžkých symptomů v noci či nad ránem (tj. noční astma, angina pectoris, infarkt myokardu či artritida následující cirkadiální rytmus).<sup>4,6</sup> Významné je také perorální podání peptidů a proteinů, jež jsou lépe absorbovány z kolonu (nižší aktivita peptidáz a pankreatických enzymů) než z tenkého střeva a žaludku, kde podléhají kyselému a enzymatickému rozkladu.<sup>1</sup> Příkladem mohou být peptidová analgetika, kontraceptiva, perorální vakcíny, růstové hormony, inzulín, kalcitonin, vazopresin, interferony, interleukiny či erythropoetin.<sup>4,7</sup> Efektivní je i využití bohaté lymfatické tkáně tlustého střeva pro účinnou dodávku vakcín na základě absorpce antigenů mastocyty střevní mukózy, která indukuje velmi rychlou produkci protilátek.<sup>2</sup>



Obr. 1: Terapeutické možnosti systémů cíleného přívodu léčiv do kolonu.

(ICHS - ischemická choroba srdeční).<sup>8</sup>

## 6. Teoretická část

### 6.1 Biofarmaceutické aspekty podání léčiv do kolonu

Systémy cílené distribuce léčiv do kolonu jsou založeny na principu selektivního uvolnění léčiva v tlustém střevě, aniž by došlo k jeho předčasnému uvolnění v horní části GIT.<sup>9</sup> Proto musí být léčivá látka chráněna před absorpcí a/nebo kyselým prostředím žaludku a následně proměnlivým prostředím tenkého střeva (pH v rozmezí 6 - 7,4 nalačno, po požití potravy 3 – 7).<sup>2, 10</sup> V průběhu vývoje těchto formulací je nezbytné vzít do úvahy anatomické, fyziologické i dynamicky se měnící patofyziologické vlastnosti kolonu, včetně mikroprostředí obklopující postižené místo, které je značně odlišné od toho zdravého.<sup>9</sup>

#### 6.1.1 Anatomie a fyziologie kolonu

V tlustém střevě se nachází nižší počet klků mukózy (jemné výběžky sliznice) oproti tenkému střevu a absorpční plocha je tak významně redukována navzdory velkému průměru tlustého střeva. Střevní obsah je viskóznější a méně promísený, obzvláště při větší produkci tráveniny do stolice, což se může projevit nízkou biodostupností špatně vstřebatelných léčiv. Lipidová dvojvrstva kolonocytů (buněk tlustého střeva) s těsnými mezibuněčnými spoji mající charakter fyzické bariéry je příčinou omezené permeability polárních sloučenin.<sup>4</sup> Pozitivním aspektem absorpce léčiva je prodloužený čas setrvání formulace v kolonu (6 – 70 hodin), jenž se odvíjí od motility ovlivňované potravou a obsahem vlákniny v ní, dále stresem, léčivy či chorobnými stavy.<sup>4,8</sup> Při vstupu do kolonu bývá pH lehce kyselé (okolo 5,5) navozené přítomností kyseliny mléčné, krátkých řetězců mastných kyselin a dalších produktů vzniklých bakteriální fermentací polysacharidů. Poté pH nabývá hodnot 6 – 8 v závislosti na příjmu tekutin a potravy a na metabolismu bakterií.<sup>7</sup> Poměrná většina intestinální mikroflóry setravává v kolonu s převahou anaerobních bakterií, které získávají energii degradací polysacharidů enzymy účastnících se redukčních a hydrolytických reakcí. Toto bohaté bakteriální osídlení je využito v rámci strategií cíleného přívodu léčiv do kolonu. Nicméně je nezbytné vzít v úvahu, že věk, různá střevní onemocnění, složení potravy či terapie léčivy (př. antibiotika) ji mohou narušit a oslabit.<sup>4,8</sup>

## 6.1.2 Patofyziologie kolonu

U chronických nespecifických střevních zánětů dochází k narušení integrity sliznice, zvýšené produkci hlenu, infiltraci imunitních buněk a produkci reaktivních forem kyslíku a prozánětlivých cytokinů (výsledek nedostatku důležitých antioxidantů), což se projeví ve snížené prostupnosti léčiva zanícenou tkání.<sup>9,11</sup> Během relapsů je typická zrychlená pasáž kolonem rezultující průjemem, zvýšený objem tekutin v lumen střeva a nižší hodnoty pH (př. ulcerózní kolitida pH 2,3 – 5,5), které jsou příčinou rozvratu mikrobiomu a kolísavosti enzymatické aktivity. Všechny tyto změny mohou negativně ovlivnit účinnost podávaných lékových systémů.<sup>11</sup>

## 6.2 Možnosti cílení léčiv do tlustého střeva

### 6.2.1 Využití proléčiv

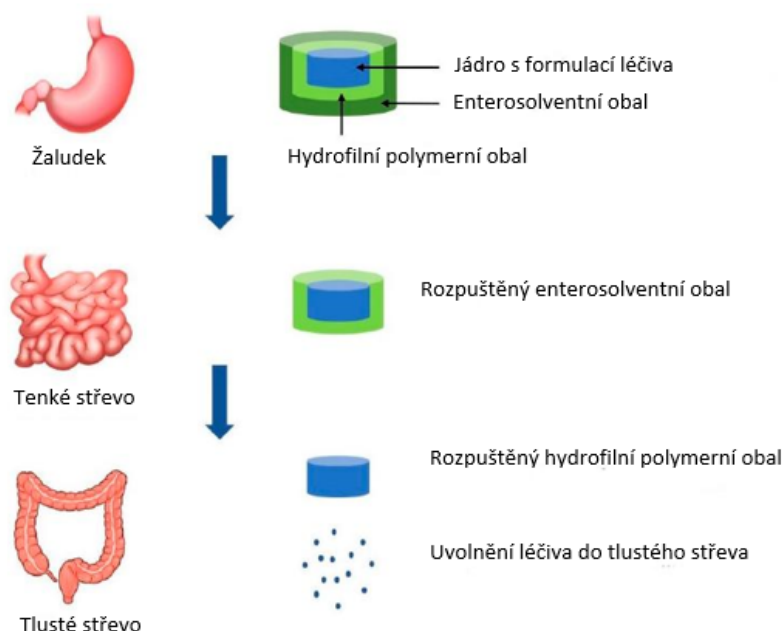
Proléčiva jsou farmakologicky neaktivní deriváty parentní molekuly léčiva, které zůstávají intaktní v prostředí žaludku a tenkého střeva.<sup>2</sup> Proléčiva mohou být konjugáty spojené azo vazbou (např. sulfasalazin, olsalazin)<sup>2</sup>, glykosidickou vazbou (prednisolon, hydrocortison, fludrokortizon atd.)<sup>13</sup> či cyklodextrinové konjugáty (např. kyselina bifenyloctová konjugovaná s hydroxylovou skupinou  $\alpha$ -,  $\beta$ - nebo  $\gamma$ -cyklodextrinu esterovou nebo amidovou vazbou).<sup>12</sup> V kolonu podléhají enzymatické biotransformaci, kdy enzymy produkované rezidentními bakteriemi rozštěpí kovalentní vazbu mezi léčivem a nosičem, čímž se uvolní samotná účinná látka. V konverzi proléčiv dominují jak reakce hydrolytické (enzymy  $\beta$ -glukuronidáza,  $\beta$ -xylosidáza,  $\beta$ -galaktosidáza,  $\alpha$ -L-arabinosidáza), tak reakce redoxní (enzymy nitroreduktáza, azoreduktáza, deamináza, urea dehydroxydáza). Formulace založené na proléčivech patří mezi široce využívané v cíleném přívodu léčiva do kolonu, avšak před jejich použitím je potřeba zvážit věk a zdravotní stav pacienta a současné podávání antibiotik, jelikož tyto faktory ovlivňují metabolickou aktivitu mikroflóry.<sup>2,13</sup>

### 6.2.2 Polymerní obaly

Molekula léčiva cílená do tlustého střeva musí být chráněna před absorpcí v horních segmentech GIT. Jednou z možností je použití stimul-responzivních polymerních obalů, které se rozpadnou při expozici endogenním stimulům kolonu. Mezi nejvýznamnější stimuly patří posun hladin pH, přítomnost střevní mikroflóry a změna redoxního potenciálu.<sup>14</sup>

### 6.2.2.1 pH-senzitivní polymerní obaly

Princip systémů založených na pH-senzitivních polymerních obalech spočívá ve využití progresivně rostoucího pH gradientu GIT.<sup>2</sup> V žaludku nalačno je pH zpravidla kyselé, tj. 1,5 – 1,9 a po jídle se hodnoty pH pohybují v rozmezí 3 – 7; v tenkém střevě nalačno je pH obvykle mezi 6 – 7,4 a po jídle v rozmezí hodnot 3 – 7; ve tlustém střevě je pak pH 5,5 – 8.<sup>10</sup> Z tohoto důvodu se léková forma, např. tablety, tobolky nebo pelety, obalí pH-senzitivním polymerem. Ten je nerozpustný při nižších hodnotách pH, tj. v žaludku a proximální části tenkého střeva, zatímco v neutrálním a lehce alkalickém pH terminálního ilea (a preferenčně v ileocekální oblasti) se již rozpouští. Na pH závislé rozpouštění polymerního obalu tak zabrání předčasnému uvolnění léčiva v horních částech GIT, a naopak zprostředkuje uvolnění zpožděné (Obr. 2).<sup>2</sup>



Obr. 2: Schématické znázornění uvolnění léčiva z pH-dependentních polymerních obalů.<sup>9</sup>

Nevýhodou pH-senzitivních systémů je však proměnlivost hodnot pH jednotlivých částí GIT, které jsou ovlivňovány stravou, příjmem tekutin, chorobnými stavy, metabolismem bakterií, přítomnými mastnými kyselinami, oxidem uhličitým a dalšími fermentačními produkty.<sup>9,13</sup> Rovněž značné intra- a interindividuální rozdíly v pH zažívacího traktu představují překážku v reprodukovatelnosti uvolňování léčiv z těchto systémů.<sup>13</sup>

Mezi nejpoužívanější pH-senzitivními polymery patří syntetické kopolymery kyseliny methakrylové, komerčně dostupné pod označením Eudragit® (Evonik). Konkrétními příklady mohou být Eudragit® L rozpustný při  $\text{pH} \geq 5,6$  a Eudragit® S rozpustný při  $\text{pH} \geq 7$ . Dále je

známý Eudragit® FS 30D rozpustný při  $\text{pH} \geq 6,8$ , Eudragit® L100 rozpustný při  $\text{pH} \geq 6$  a Eudragit® S100 rozpustný při  $\text{pH} \geq 7$ , celulóza acetát ftalát rozpustná při  $\text{pH} \geq 5$  a ftalát hypromelózy rozpustný při  $\text{pH} 5,2 - 5,4$ .<sup>2,9</sup>

### **6.2.2.2 Biodegradovatelné polymerní obaly**

Vzhledem k faktu, že je tlusté střevo bohatě osídleno bakteriální mikroflórou, je koncept této strategie založen na použití biodegradovatelných polymerních obalů, které jsou v kolonu rozloženy bakteriálními enzymy. Polymery obalená molekula léčiva tak zůstane v částech s nízkou mikrobiální aktivitou (žaludek a tenké střevo) intaktní.<sup>2</sup>

Jednou z metabolických reakcí bakterií tlustého střeva je redukce azo vazby enzymem azoreduktázou. Z tohoto důvodu byly syntetické azopolymery ve velké míře předmětem studií cíleného přívodu léčiv do kolonu, kde nachází své využití právě jako polymerní obaly.<sup>2,13</sup> Lze ovšem použít i přírodní polysacharidy, např. pektin, guarovou klovatinou (GK), inulin nebo chitosan, které jsou štěpeny nejčastěji amylázou.<sup>13</sup> Výhodou těchto systémů je dostupnost poměrně široké škály biodegradovatelných polymerů, relativně nízké výrobní náklady, nízká toxicita a imunogenicita a vysoká biokompatibilita. Řada polysacharidů má navíc také mukoadhezivní vlastnosti, čímž dokážou prodloužit čas setrvání formulace v místě jejího působení. Potenciální překážky biodegradovatelných polymerů tkví ve velkém rozpětí molekulárních hmotností, chemické variabilitě a nízké rozpustnosti polymerů ve většině organických rozpouštědlech, což omezuje možnosti jejich chemické modifikace (viz kapitola 6.2.3.2). Nadměrná hydrofilita a rozpustnost polymerů ve vodě může mít navíc na svědomí předčasné uvolnění léčiva v horních částech GIT.<sup>9</sup>

### **6.2.2.3 Redox-senzitivní polymerní obaly**

Biodegradovatelné polymery obsahující azo vazbu (vazba  $\text{N}=\text{N}$ ) jsou citlivé na změny redoxního potenciálu tlustého střeva (nejnižší ze všech částí GIT), ke kterým dochází v důsledku metabolické a bakteriální aktivity. Princip jejich rozpadu je analogický k redukci azo vazby intestinálními enzymy a spočívá v neenzymatické hydrolyze enzymaticky generovanými flaviny (kofaktory oxidačních a redukčních reakcí).<sup>2,15</sup> Nevýhoda azopolymerů tkví v toxických produktech vzniklých rozštěpením azo vazby (aromatické aminy a hydrazosloučeniny) a v nízkém stupni jejich degradace způsobené nízkou rozpustností azo vazby ve vodě.<sup>14</sup> Mezi redox-senzitivní polymery se řadí i takové, které obsahují disulfidickou vazbu.<sup>2</sup>

Ta zůstává zcela intaktní v kyselém prostředí žaludku a tenkého střeva a v kolonu s nízkým redoxním potenciálem je lehce rozštěpena. Polymery s disulfidickou vazbou tedy představují efektivní a vhodnou alternativu azopolymerů. Nicméně, jejich potenciál ve využití jako filmotvorných látek u formulací cílených do kolonu byl dosud prozkoumán jen omezeně.<sup>14</sup>

### 6.2.3 Polymerní matrice

Další možností technologického zpracování je inkorporace léčiva do polymerní matrice. Polymery vybrané pro jejich výrobu by měly být schopné degradace v kolonu, aby mohlo dojít k liberaci léčiva.<sup>2</sup>

#### 6.2.3.1 *pH-senzitivní polymerní matrice*

Základem těchto formulací je pH-senzitivní polymerní matrix (např. Eudragit L100 nebo S100), která je většinou obalena vhodným acidorezistentním polymerem a při expozici alkalickému prostředí kolonu ( $\text{pH} \geq 7,4$ , tj.  $\text{pH}$  vyššímu než v tenkém střevě) se částečně nebo kompletně rozpouští.<sup>16,17</sup> Na základě toho dojde ke tvorbě pórů, skrze které je umožněn prostup disolučního média do matrix. Postupně se tak prostřednictvím difúze nebo eroze matrix začne uvolňovat inkorporované léčivo. Tyto formulace představují nižší riziko nedostatečného uvolnění léčiva, než je tomu u formulací nesoucí pouze polymerní obal. U těch nedojde k uvolnění léčiva uloženého v jádře dříve, než nastane kompletní rozpuštění všech vrstev obalu.<sup>17</sup>

#### 6.2.3.2 *Biodegradovatelné matrice a hydrogely*

Druhou variantou jsou formulace tvořené léčivem inkorporovaným do polymerní biodegradovatelné matrix, která musí zůstat neporušena až do chvíle, než dosáhne kolonu, ve kterém je nejčastěji bakteriálním enzymem amylázou degradována. Pro přípravu těchto systémů se zpravidla používají přírodní polysacharidy, např. amylóza, GK, pektin, chitosan, inulin, cyklodextriny, chondroitin sulfát a dextran. Protože jsou tyto látky obvykle dobře rozpustné ve vodě, musí se jejich rozpustnost snížit polymerním zesíťováním nebo hydrofobní derivatizací, což je nezbytné pro rezistenci lékové formy v kyselém prostředí. V molekule polymeru je důležitý optimální poměr hydrofóbních a hydrofilních skupin a počet volných hydroxylových skupin<sup>2</sup>, což dokazuje i práce Rubinsteina a kol.<sup>18</sup> V této studii byl sledován vliv stupně zesíťování polymerní matrix chondroitin sulfátu na *in vitro* liberaci inkorporovaného



indometacinu. Výsledky práce ukázaly, že existuje lineární vztah mezi stupněm zesítnění polymeru a množstvím uvolněného léčiva.<sup>18</sup>

Hydrogely jsou tvořené sítí kovalentně zesíťovaného lineárního hydrofilního polymeru, která je schopna absorbovat vodu a nabobtnat, přičemž stupeň nabobtnání řídí rychlost disoluce léčiva.<sup>2,19</sup> Brondsted a Kopeček<sup>20</sup> připravili metodou crosslinking polymerizace několik typů azo-aromatických biodegradovatelných hydrogelů, konkrétně hydrogely tvořené N- substituovaným methakrylamidem, N-terc-butylakrylamidem a kyselinou akrylovou. Díky inkorporaci kyselých monomerů byl stupeň jejich bobtnavosti pH-dependentní, přičemž největší v pH typickém pro kolon, kde jsou následně mikrobiálními azoreduktázami degradovány.<sup>20</sup> Negativem těchto systémů byl však vznik toxického anilinu při mikrobiální degradaci. Z tohoto důvodu se preferují hydrogely sestávající z přírodních polymerů vykazující nižší toxicitu, na kterých se provádí chemické modifikace umožňující penetraci enzymů do polymerní sítě, což vede k celkové degradaci hydrogelu (namísto degradace povrchové) a rychlejšímu uvolnění léčiva. Příkladem může být hydrogel dextransu s přídavkem diisokyanátu jako síťovacího činidla nebo hydrogel polymeru GK zesíťované boraxem.<sup>2</sup>

#### 6.2.4 Časově-dependentní formulace

Časově-dependentní systémy jsou užitečné v terapii onemocnění závislých na cirkadiálních rytmech, avšak v léčbě syndromu dráždivého tračníku, ulcerózní kolitidy a karcinoidového syndromu nemají využití z důvodu zrychlené pasáže kolonem.<sup>7</sup> Jedná se o formulace založené na zpožděném uvolnění léčiva po předem stanoveném časovém intervalu, během kterého proběhne tranzit formulace s léčivem z dutiny ústní až do kolonu. Ačkoliv je vyprazdňování žaludku vysoce variabilní, průchod tenkým střevem je relativně konstantní. Časová prodleva v uvolňování léčiva by tedy měla být okolo 5 hodin vzhledem k 3- až 4 hodinové pasáži tenkým střevem.<sup>2</sup>

Existuje hned několik možností, jak dosáhnout zpožděného uvolnění léčiva. Jednou z nich je systém s pulzním uvolňováním léčivé látky zvaný Pulsincap<sup>®</sup>, který sestává ze želatinové tobolky s tělem ve vodě nerozpustným a z vnějšího enterosolventního polymerního obalu. Při vstupu do tenkého střeva se tento obal rozpadne a odkryje se hydrogelová zátka, která postupně bobtná až do svého objemového maxima. V ten moment je vypuzena z tobolky, a proto je délka zátky faktorem určujícím časovou prodlevu uvolnění léčiva.<sup>7,13</sup> Druhou možností jsou osmoticky řízené systémy fungující na principu osmotické pumpy. Příkladem je systém

Port<sup>®</sup> tvořený želatinovou tobolkou obsahující osmoticky aktivní látku, která díky difúzi vody semipermeabilní membránou zvýší tlak uvnitř tobolky a tím se vysune jinak nerozpustná lipidová zátka. Míra zpoždění uvolnění léčiva je opět dána tloušťkou zátky.<sup>7</sup> Třetí varianta představuje tlakově řízené systémy, kdy je vnitřní stěna tobolky potažena ve vodě nerozpustným polymerem ethylcelulózou, který se rozpadá působením lumenálního tlaku generovaného střevní peristaltikou v tlustém střevě. V tomto případě je determinujícím faktorem síla ethylcelulózové membrány.<sup>7,13</sup> Dalším přístupem je kombinace pH- a časově dependentních lékových systémů s cílem specifitější distribuce do kolonu a minimalizace předčasného uvolnění léčiva v horní části GIT. Příkladem takovéto kombinace mohou být např. nanočástice s pH-dependentním polymerem Eudragit<sup>®</sup> FS-30D (rozpustný při pH > 7,0) kombinovaným s časově-dependentním polymerem Eudragit<sup>®</sup> RS100.<sup>21</sup>

### 6.2.5 Částicové systémy

Částicové systémy (perorální násobné lékové formy) jsou tvořeny mnoha samostatně fungujícími jednotkami, mezi které je distribuována jedna celá dávka léčiva. Vzhledem k velmi malé velikosti částic projde formulace GIT snadno a nezávisle na rychlosti vyprazdňování žaludku, což mimo jiné potlačí inter- a intraindividuální variabilitu. Oproti jednotkovým lékovým formám jsou schopné rychlejšího zacílení kolonu, specifické akumulace, uniformní disperze a delší retence v postižené tkáni, čímž se zlepší biodostupnost a sníží riziko systémové toxicity a lokální iritace.<sup>7,22</sup>

Mezi částicové formulace cílené do kolonu patří pelety (velikost 0,5 – 1,5 mm), zrněné prášky (0,5 – 2 mm) a minitablety (2 – 4 mm) a dále mikročástice (1 – 1000 μm) a nanočástice (<100 nm). Každá individuální jednotka vznikne enkapsulací nebo obalením molekuly léčiva jednou nebo více vrstvami polymeru, který řídí uvolňování léčiva. Používají se buď přírodní polymerní nosiče, např. pektin, chitosan, celulóza, xyloglukan, anebo syntetické nosiče, např. azopolymery či syntetické kopolymery kyseliny methakrylové (Eudragit<sup>®</sup>).<sup>22</sup>

Další částicovou lékovou formu představují formulace založené na liposomech, tj. vezikulárních nosičích léčiv tvořených fosfolipidovou (hydrofobní) dvouvrstvou a hydrofilním jádrem, což jim ukládá amfoterní vlastnosti a možnost nést jak hydrofilní, tak lipofilní léčiva.<sup>23</sup> Kromě biodegradabilního a biokompatibilního charakteru spočívá jejich výhoda v možnosti konjugace jejich povrchu s ligandy, které zvyšující specifitu lokálního působení.

## 6.2.6 Mukoadhezivní systémy

Mukoadhezivní systémy se staly předmětem zájmu technologického výzkumu díky jejich schopnosti prodloužit dobu setrvání lékové formy v místě aplikace nebo absorpce na základě jejich interakce s mukózní vrstvou pokrývající povrch epitelu. Výrazně se tak zvýší biologická dostupnost a účinnost zejména špatně vstřebatelných léčiv<sup>24,25</sup> a současně se tak sníží frekvence jejich podání.<sup>26</sup> Hlavní potenciál těchto systémů tedy spočívá v optimalizaci řízeného uvolňování, a to jak v rámci lokálního, tak i systémového podání (platí zejména pro perorálně aplikované peptidy, proteiny a oligonukleotidy). Mukoadhezivní systémy představují atraktivní strategii pro zdoání překážek konvenčních lékových systémů, mezi které patří především efekt metabolismu prvního průchodu játry rezultující nízkou biodostupností, předčasná degradace léčiv v kyselém prostředí žaludku a příliš krátká doba setrvání formulace v absorpčním místě GIT.<sup>24,27</sup> Klasifikují se dle cesty podání na bukální, sublinguální, vaginální, rektální, nasální, okulární a gastrointestinální mukoadhezivní systémy.<sup>24</sup>

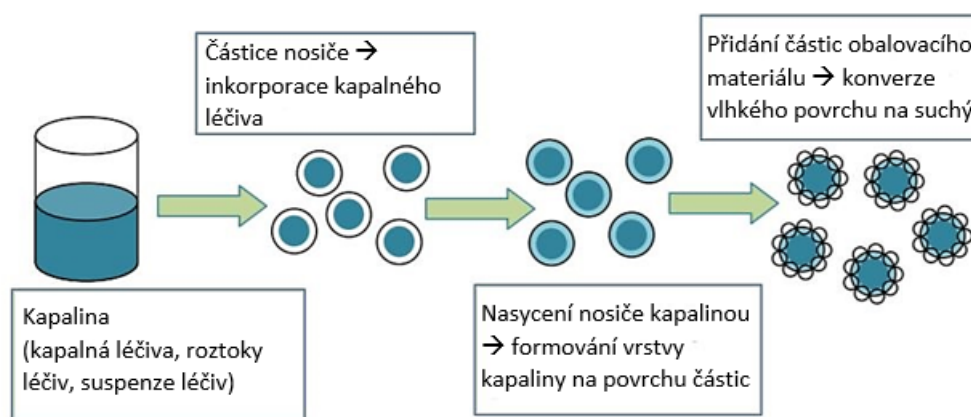
Důležité postavení zaujímají mukoadhezivní formulace cílené do kolonu, které nacházejí využití ve výzkumu a léčbě lokálních patologií, tj. kolorektální rakoviny (např. nanočástice s inkorporovaným kurkuminem s protinádorovou aktivitou<sup>28</sup> nebo mikrosféry nesoucí v jádře COX-2 inhibitor valdekoib<sup>29</sup>), a dále v terapii nespecifických střevních zánětů (např. pelety obsahující protizánětlivý kurkumin a imunomodulátor cyklosporin<sup>30</sup> nebo mikrosféry formulované s kortikosteroidem deflazakort<sup>31</sup>). Lokálně se dá za pomoci mukoadhezivních systémů léčit i parazitární infekce zvaná amebiáza zasahující kolon, např. prostřednictvím antiparazitika diloxanidu uloženého v mukoadhezivních mikrosférách konjugovaných s ligandem konkanavalinem-A.<sup>32</sup> Taktéž probíhají studie o využití mukoadhezivních polymerů pro efektivnější systémovou absorpci perorálně podaných makromolekul z tlustého střeva, jako jsou např. inzulin nebo kalcitonin.<sup>33</sup>

## 6.2.7 Moderní metody cílení léčiv

### 6.2.7.1 *Liquisolid systémy (LSS)*

Princip liquisolid systémů neboli systémů kapalina v pevné fázi (angl. liquisolid systems, LSS) je založen na přeměně léčiva v kapalnou formu (kapalná léčiva, roztoky, suspenze nebo emulze léčivých látek) do suchého, volně tekoucího, neadherentního a dobře stlačitelného prášku. K tomu jsou zapotřebí specifické pomocné látky označované jako nosiče a obalovací materiály.<sup>34</sup> Nosiče jsou obvykle porézní materiály s velkým specifickým měrným povrchem

a vysokou absorpční kapacitou; používá se např. mikrokrystalická celulóza, mezoporézní silikáty (nejčastěji magnesium aluminometasilikát Neusilin®) nebo bezvodý hydrogenfosforečnan vápenatý.<sup>35</sup> V prvním procesním kroku se na nosič sorbuje kapalná formulace léčiva, jež se získá dispergováním léčiva v organickém netěkavém rozpouštědle mísitelném s vodou (např. propylenglykol, kapalné makrogoly či polysorbáty).<sup>34,35</sup> Jakmile je porézní nosič léčivem nasycen, vznikne na jeho povrchu tenký film kapaliny, který je následně adsorbován obalovacím materiálem,<sup>34</sup> jako je např. koloidní oxid křemičitý nebo křemičitan vápenatý.<sup>35</sup> Celý proces přípravy je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Schématické znázornění formování vrstvy kapaliny na povrchu částic.<sup>34</sup>

LSS se zpravidla využívají k urychlení uvolňování ve vodě špatně rozpustných léčivých látek, byly však zkoumány i jako nástroje pro zpožděné uvolňování léčiv, formulace minimalizující vliv pH na disoluční profil léčiva nebo ke zlepšení fotostability léčiva v pevné lékové formě.<sup>34</sup> V posledních letech se liquisolid systémy zkoumají i v rámci cílení přívodu léčiv do kolonu. Příkladem takovéto studie mohou být matricové tablety na bázi LSS s obsahem indomethacinu. V tomto případě byly jako nosiče použity polysacharidy degradovatelné bakteriální mikroflórou, jmenovitě GK, pektin a chitosan. Formulace LSS vykazující slibné výsledky v rámci uvolnění léčiva v pH 1,2 a pH 6,8 se po přidání časově-dependentního polymeru Eudragitu® RL 100 lisovaly do tablet. Výsledky všech typů formulací prokázaly prodloužené uvolňování indomethacinu po dobu 24 hodin.<sup>36</sup>

### **6.2.7.2 Samoemulgující systémy**

Jedny z moderních formulací pro cílený přívod léčiva do kolonu jsou tzv. samoemulgující systémy (angl. self-emulsifying drug delivery system, SEEDS). Vzhledem k jejich lipidové bázi jsou určeny zejména pro administraci léčiv s nízkou biodostupností (tj. látky s nízkou rozpustností ve vodě). Snadno prochází přes mukózu, čímž zlepšují absorpci léčiv. Jedná se o izotropní směsi olejů a surfaktantů, popř. kosolventů, které po kontaktu s vodným médiem GIT podléhají samoemulgaci a v důsledku agitace způsobené intestinální peristaltikou tak vzniknou mikro- nebo nanoemulze olej ve vodě. Ramshankar, Y. V. a kol.<sup>22</sup> vyvinuli např. samoemulgující systém pro dodání kurkuminu do terminálního ilea a kolonu pro léčbu syndromu dráždivého tračníku.<sup>22</sup>

### **6.2.7.3 Ligand - receptor zprostředkované systémy**

Efektivnější léčby střevních onemocnění s přesnějším zacílením a minimalizací vedlejších účinků lze dosáhnout prostřednictvím různých ligandů konjugovaných na povrchu nosiče (často nanočástice). Vznikne tak komplex s inkorporovaným léčivem uvnitř. Ligand (např. protilátka, peptid, transferin, folát nebo kyselina hyaluronová) se váže na specifické membránové receptory nebo proteiny exprimované postiženou tkání. Vyšší GIT stability těchto systémů je možné dosáhnout jejich kombinací s pH-senzitivními obaly.<sup>9,22</sup> Konkrétním příkladem je použití kyseliny listové jako ligandu (vázejícího se na folátové receptory) konjugovaného s liposomy nesoucí cytostatikum daunorubicin s cílem zlepšit jeho účinnost v léčbě kolorektální rakoviny.<sup>37</sup>

### **6.2.7.4 Magneticky řízené systémy**

Další pokročilou metodou jsou magneticky řízené lékové systémy sloužící k transportu a zacílení formulace na specifické místo v těle prostřednictvím externího magnetického pole generovaného permanentním magnetem. Formulace je magneticky označena nejčastěji oxidy železa a jako nosiče s magnetickým jádrem a léčivem imobilizovaným uvnitř se používají nanočástice, liposomy nebo emulze. Vzniklý komplex se aplikuje injekčně a po dosažení cíle je léčivo z magnetického nosiče uvolněno (enzymaticky nebo změnou fyziologických podmínek, tj. pH, osmolalitou nebo teplotou).<sup>9,38</sup> Grifantini a kol.<sup>39</sup> vytvořili dva magneticky řízené systémy pro cílenou léčbu kolorektální rakoviny pomocí FAT1-specifické monoklonální protilátky (mAB198.3) buď přímo navázané k superparamagnetickým nanočásticím nebo

inkorporované do magnetických nosičů vytvořených na bázi lidských erytrocytů. Oba systémy byly velice efektivní v zasažení rakovinných buněk v kolonu a taktéž v inhibici progresu rakoviny prostřednictvím značně nižších dávek protilátek.<sup>9,39</sup>

#### 6.2.7.5 3D tisk

Třidimenzionální tisk neboli 3D tisk je moderní sofistikovaná technika užívaná v přípravě lékových forem s více než jednou účinnou látkou s duálními profily uvolňování (okamžité vs. prodloužené).<sup>40</sup> Podle digitální předlohy objektu se skládá jedna vrstva za druhou, dokud nevznikne hmotný produkt.<sup>22</sup> V dnešní době patří mezi nejpoužívanější techniky 3D tisku metoda inkoustového tisku, extruze tryskou, dále tzv. fused deposition modeling (např. enterální 3D tobolky) a stereolitografie.<sup>41</sup> V rámci cílení do kolonu mohou být 3D tiskem vytvořeny například modifikované acidorezistentní tablety s prodlouženým uvolňováním, jak ukázala studie Goyanes a kol.<sup>42</sup>

### 6.3 Mukoadheze

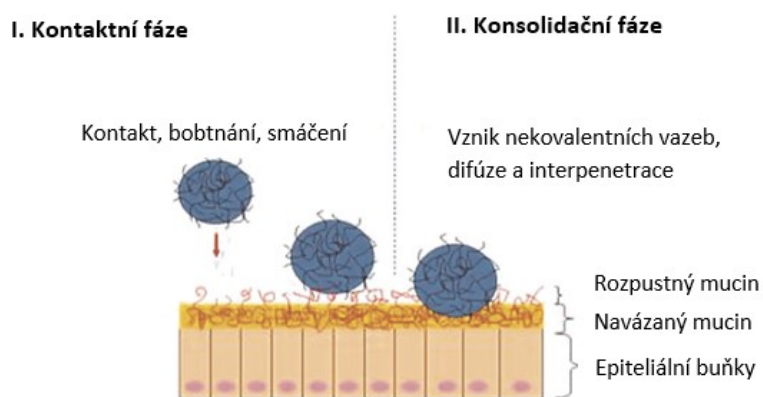
Bioadheze je definována jako schopnost materiálu přilnout k biologické tkáni a zůstat na ní po delší časový úsek díky přítomnosti mezipovrchových sil. Specifičtější termínem je mukoadheze, která definuje přilnutí materiálu k mukózní membráně, tedy epitelu s mukusem (hlenem).<sup>24</sup> Tento hlen je viskózní heterogenní produkt sliznic gelovité konzistence tvořený mucinem (vysokomolekulární glykoprotein), lipidy, anorganickými solemi a vodou (z 83 %).<sup>25,43</sup> Při fyziologickém pH nese negativní náboj daný přítomností kyseliny sialové a sulfátů. Právě vysoká hustota negativního náboje významně přispívá k bioadhezi.<sup>24</sup> Mukus pokrývá mnoho epiteliálních povrchů (sliznic), kde funguje jako lubrikant, což znamená, že zajišťuje zvlhčování a ochranu epitelů před mechanickým namáháním (smykovým napětím). Dále zde tvoří difúzní bariéru pro xenobiotika (především léčiva) a také chrání žaludeční mukózu před lumenální kyselinou chlorovodíkovou.<sup>25,43</sup>

Mukoadhezivní formulace zpravidla využívají mukoadhezivní polymery (např. anionické zesíťované polyakryláty či karmelózu, kationický polymer chitosan nebo neionické poloxamery, HPMC, polyvinylalkohol) jako adhezivní komponenty,<sup>25</sup> jejichž úkolem je přilnout ke sliznici a efektivně prodloužit dobu setrvání lékové formy na gastrointestinální mukóze. Tím výrazně omezí problém relativně krátkého tranzitu GIT a zároveň zlepši zacílení a terapeutický efekt systémů se zpožděným uvolňováním.<sup>27</sup>

### 6.3.1 Teorie mukoadheze a typy vazeb

Existuje několik různých teorií, které popisují mukoadhezi. Elektronová teorie je založena na předpokladu, že na mezipovrchu fází vzniká elektronová dvouvrstva a formují se zde přitažlivé síly, a to díky transferu elektronů mezi mukusem a mukoadhezivním systémem. Dále je mukoadheze vysvětlována teorií adsorpce, podle které dochází k přilnutí mukoadhezivního materiálu prostřednictvím povrchových interakcí po kontaktu molekul obou povrchů. Teorie smáčení popisuje mukoadhezi kapalných nízkoviskózních systémů, kdy se tato kapalina rozprostře přes mukózu, a to na základě její afinity, která se stanoví změřením kontaktního úhlu. Difúzní teorie charakterizuje vznik pevné semipermanentní adhezivní vazby prostřednictvím difúze, propletení a interpenetrace polymerního řetězce s glykoproteiny mukózy v závislosti na jejich difúzním koeficientu. Teorie lomu se opírá o fakt, že síla adhezivní vazby koreluje se silou nutnou k oddělení polymeru od mukusu. Dle mechanické teorie lze mukoadhezi chápat tak, že dochází k vmezeření kapaliny mezi nepravidelnosti drsného povrchu, které navíc zvyšují povrch dostupný pro interakce. Poslední teorie zvaná dehydratace mukusu předpokládá, že dehydratace mukózní vrstvy zlepši kohezivní vlastnosti a zvýší retenční čas mukoadhezivního systému.<sup>27,43</sup>

Mechanismus mukoadheze je obecně rozdělen na dvě fáze (Obr. 4). První fáze se označuje jako fáze kontaktní a zahrnuje blízký kontakt mezi mukoadhezivním polymerem a mukózní gelovou vrstvou, smáčení a bobtnání polymeru po jeho rozprostření po povrchu mukózní membrány. Poté následuje fáze konsolidační vyznačující se difúzí a interpenetrací řetězců polymeru a glykoproteinů mucinu, jejich vzájemné propletení a zpevnění adhezivního spojení prostřednictvím chemických vazeb. Doba adheze je pak přímo úměrná stupni interpenetrace.<sup>24,43</sup>



Obr. 4.: Kontaktní a konsolidační fáze mukoadheze.<sup>44</sup>

Vazby mezi mukusem a mukoadhezivní molekulou mohou být:<sup>25,43</sup>

- kovalentní, např. disulfidové vazby mezi thiomery a subdoménami mukózní vrstvy bohatými na cystein (permanentní adheze; separace možná pouze obměnou mukusu nebo odlupováním epitelu).
- iontové, např. interakce mezi kationickými polymery a kyselinou sialovou v mukusu.
- vodíkové tvořené hydrofilními funkčními skupinami, tj. hydroxylovými, karboxylovými, sulfátovými nebo aminoskupinami.
- Van der Waalsovy vyskytující se mezi dipóly.
- hydrofobní prostřednictvím nepolárních skupin ve vodném roztoku.

### 6.3.2 Faktory ovlivňující mukoadhezi

Mukoadheze může být ovlivněna vlastnostmi polymeru, okolním prostředím a jeho fyziologickými podmínkami.<sup>24</sup>

#### 6.3.2.1 Vlastnosti polymerů

Ideální polymer by měl být netoxický, nízkonákladový, biokompatibilní a biodegradovatelný. Výběr vhodného polymeru by měl být proveden na základě následujících parametrů:<sup>27</sup>

- Molekulová hmotnost: Záleží na typu polymeru, avšak obecně nízkomolekulární polymery interpenetrují snadněji, vysokomolekulární vykazují lepší proplétání řetězců. Mukoadhezivní síla polymeru zpravidla roste s jeho molekulovou hmotností (nad 100 000).<sup>25,43</sup>
- Délka polymerního řetězce: Zvyšující se délka řetězce umožňuje větší interpenetraci a zvyšuje mukoadhezivní sílu, nicméně příliš dlouhý řetězec naopak zhoršuje difúzi.<sup>27</sup>
- Koncentrace polymeru: Čím vyšší koncentrace polymeru, tím více polymerních řetězců je k dispozici na jednotku objemu mukusu a tím větší je adhezivní síla. Tato závislost platí v případě pevných lékových forem; u polotuhých se adhezivní síla s rostoucí koncentrací snižuje a penetrace je významně horší, proto je u nich nutné stanovení optimální koncentrace.<sup>25,27</sup>
- Flexibilita polymerního řetězce: Vypovídá o pohyblivosti daného polymeru a závisí na jeho viskozitě a difúzním koeficientu. Vyšší flexibilita polymerních řetězců ulehčí difúzi a tím i jejich propletení a interpenetraci.<sup>27,43,45</sup>



- Viskozita: Vyšší viskozita polymeru spolu s viskoelasticitou a smáčivostí přispívá k vyšší míře bioadheze.<sup>24,27</sup>
- Stupeň zesítení: Ovlivňuje mobilitu řetězce a schopnost vody difundovat do struktury polymeru, což se projeví jeho bobtnáním, které zvyšuje interpenetraci polymeru a je výhodné pro řízené uvolňování. Příliš velký stupeň zesítení je nepřímo úměrný mobilitě řetězce a difúzi vody, výsledkem je nedostatečné bobtnání, obtížnější interpenetrace a slabší mukoadheze.<sup>25,27</sup>
- Prostorová konformace: Velmi důležitá pro interpenetraci polymerních řetězců do mukusu.<sup>46</sup>
- Náboj a stupeň ionizace: Od povrchového náboje polymerů se odvíjí velikost adhezní síly. Největší vykazují aniontové polymery (např. karbomery), za nimi stojí kationtové polymery (např. chitosan) a nejmenší adhezní sílu mají neiontové polymery (např. poloxamery, HPMC, methylcelulóza, polyvinylalkohol a polyvinylpyrrolidon).<sup>27</sup>
- Hydratace: Existuje kritický stupeň hydratace polymeru determinující optimální míru bobtnání a mukoadhezi.<sup>25</sup> Nadměrná hydratace vede ke snížení adhezní síly v důsledku vytvoření kluzkého slizu.<sup>27</sup>
- Chemická modifikace: Efektivnější mukoadheze polymerních nosičů lze dosáhnout např. vytvořením kovalentní disulfidové vazby mezi thiolovanými polymery neboli thiomery a subdoménami glykoproteinů mukusu (bohaté na cystein). Mukoadhezivní vlastnosti polymerů jsou pak přímo úměrné počtu jejich imobilizovaných thiolových skupin.<sup>47</sup>

### 6.3.2.2 Faktory prostředí

Důležitým faktorem ovlivňujícím míru mukoadheze je pH. To může zapříčinit změny povrchového náboje adherujícího polymeru i mukusu, a to v důsledku rozdílné disociace funkčních skupin polymerů a aminokyselin polypeptidové kostry.<sup>43</sup> Dále je známo, že přilnutí mukoadhezivního systému nastane vyvinutím určitého počátečního tlaku na mukoadhezivní tkáň a platí, že čím větší tento tlak je, tím větší bude hloubka interpenetrace v místě kontaktu. Stejně tak je zásadní počáteční doba kontaktu mezi polymerem a mukózní vrstvou, protože určuje míru bobtnání a interpenetraci polymerních řetězců a je přímo úměrná mukoadhezivní síle.<sup>25,43</sup> Stupeň bobtnání polymeru je další významnou charakteristikou mukoadheze odvíjející se od jeho koncentrace a přítomnosti vody<sup>43</sup> (viz 6.3.2.1).

### 6.3.2.3 Fyziologické faktory

Sekrece hlenu se liší s ohledem na věk a pohlaví pacienta a také dle místa jeho produkce. Průměrná doba jeho přirozené obměny, která se v průměru pohybuje okolo 6 hodin<sup>25</sup> (v lidském střevě až 12–24 hodin<sup>47</sup>), může nepříznivě ovlivnit dobu setrvání formulace na mukóze a tím i rychlost a míru absorpce léčiva. Fyzikálně-chemické vlastnosti mucinové vrstvy se mění za patologických podmínek různých onemocnění (např. při ulcerózní kolitidě, žaludečních vředech, cystické fibróze apod). Již drobné změny ve složení mukózy mohou mít významný dopad na mukoadhezivní chování formulace, proto je žádoucí vyhodnocovat vlastnosti polymerů za fyziologických, tak i patofyziologických podmínek.<sup>24,48</sup>

## 6.4 Hodnocení mukoadheze

Jak již bylo zmíněno výše, účinnost a potenciál léčiv se může rozvíjet prostřednictvím vývoje nových mukoadhezivních lékových systémů. Pro úspěšnou předpověď chování podaného systémů je nezbytnou součástí jejich testování hodnocení mukoadhezivních vlastností.<sup>27,49</sup> Mukoadhezivní testy je možné rozdělit na testy *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo*.

### 6.4.1 *In vitro* a *ex vivo* testy

*In vitro* a *ex vivo* testy využívají syntetický popřípadě přírodní mucinový gel (nejčastěji prasečí) nebo čerstvě vypreparovanou či zmraženou mukózní tkáň.<sup>50</sup> Cílem těchto testů je simulovat různé cesty podání (perorální, bukální, periodontální, nasální, gastrointestinální, vaginální, rektální).<sup>49</sup> Tradiční *in vitro* metody zahrnují tahové zkoušky, jež jsou nezbytné jak pro výběr vhodného polymeru, tak pro studium jejich mechanismu mukoadheze.<sup>27,44</sup> Mezi další patří vizuální stanovení času odpojení nebo rozpuštění formulace a zkoušky retenčního průtoku. K určení povahy a intenzity mukoadhezivních interakcí se používají i některé techniky fyzikální, např. reologické, optické a spektroskopické.<sup>44</sup> *In vitro* a *ex vivo* metody mohou být dále klasifikovány na přímé, kam patří zkoušky hodnotící sílu nebo čas nutný k odpojení formulace od mukózní tkáně, a nepřímé zahrnující charakteristiku interakcí mezi polymerem a mukózní vrstvou.<sup>51</sup> Získaná data pak přispívají ke studiím mechanické a fyzikální stability, kompatibility, rychlosti uvolnění léčiva z lékové formy, povrchových interakcí a síly bioadhezivních vazeb.<sup>49</sup>

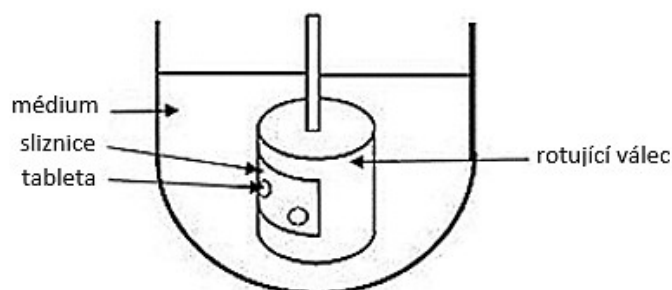
Odborná literatura popisuje celou řadu metod hodnocení mukoadheze. S ohledem na jejich rozdílný charakter mohou vést různé metody k nesourodým výsledkům v důsledku

heterogenity použitých parametrů a podmínek. Z toho důvodu je vhodné mukoadhezi hodnotit několika testy zaměřenými na jiné fáze tohoto procesu.<sup>49</sup>

#### 6.4.1.1 Testy měřící retenční čas

##### 1) Metoda rotujícího válce

Testy měřící retenční čas, tedy jeden z nejdůležitějších fyzikálních parametrů ve studiích mukoadhezivních polymerů, zahrnují metodu rotujícího válce, která byla vyvinuta skupinou Grabovac a kol.<sup>52</sup> Zkouška se provádí tak, že se formulace (např. tableta) obsahující testovaný polymer přichytí k čerstvě vypreparované mukóze upevněné na povrch nerezového ocelového válce (rotační válec dle Českého lékopisu 2017). Ten se umístí do disolučního aparátu s vhodným médiem (např. fosfátový pufr o pH 6,8) o teplotě  $37 \pm 2$  °C a nechá se rotovat s frekvencí 125 otáček/min (Obr. 5). Vizuálně se každých 30 minut hodnotí změny systému až do chvíle, kdy se stanoví kompletní odtrhnutí, rozpad a/nebo eroze testované lékové formy.<sup>43,52</sup> Metodou je možné stanovit dobu setrvání formulace na mukóze a kohezivitu (soudržnost) mukoadhezivních polymerů v dynamickém prostředí simulující fyziologické podmínky GIT.

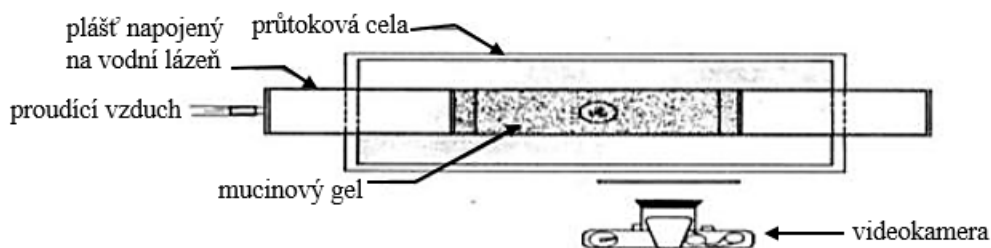


Obr. 5: Schématické znázornění rotujícího válce.<sup>43</sup>

##### 2) Metoda průtokového kanálu (Flow channel method)

Specifická *in vitro* metoda průtokového kanálu testující adhezivní potenciál mikročásteček byla představena v roce 1988. Slouží ke stanovení retenčního času formulace a adhezivních sil mezi polymerními mikročástečkami a mucinovým gelem nebo mukózou.<sup>53</sup> Průtokový kanál z plexiskla potažený vodným roztokem mucinu anebo sliznicí společně s mikročástečkami umístěnými na jeho středě se vloží do vodní lázně o konstantní teplotě. Skrze kanál proudí vlhký vzduch vycházející z plynového válce, který reguluje rychlost průtoku – ta se zvyšuje, dokud se mikročástečky neodtrhnou. Kanál se nachází mezi světelným zdrojem a detekčním

aparátém složeným z mikroskopu a napojené videokamery monitorující statické a dynamické chování částic, tj. odtrhnutí a pohyb, ve stanovených časových intervalech (Obr. 6).<sup>51,53</sup> Experiment je možné provést také s konstantní rychlostí průtoku, kdy se měří čas potřebný k odpojení částice z povrchu sliznice.<sup>51</sup>



Obr. 6: Schématické znázornění průtokového kanálu pro testování bioadheze polymerních mikročástic na mucinovém gelu.<sup>54</sup>

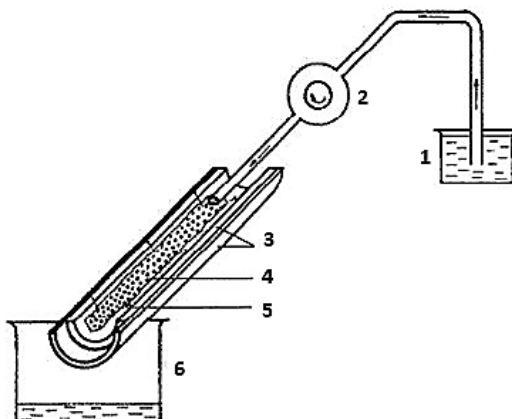
### 3) Další metody hodnocení retenčního času

Stanovení doby setrvání mukoadhezivní formulace se mohou provádět i tak, že se vypreparovaná prasečí mukóza nebo roztok mucinu připevní na podložní sklíčko (či jiný vhodný podklad) a hydratuje se ponořením do nádoby obsahující vhodné médium, zpravidla roztok pufru. Poté se ke sliznici/mucinu přitiskne hodnocená mukoadhezivní léková forma a detekuje se čas rozpadu nebo odtržení lékové formy od mukózy/mucinu způsobené rotací míchadla umístěného blízko formulace v nádobě nebo vertikálním ponořováním sklíčka s formulací do nádoby.<sup>27</sup>

#### 6.4.1.2 **Testy hodnotící počet adheovaných částic**

##### 1) Metoda stékající kapaliny (Falling liquid film method)

Metoda stékající kapaliny, která je vhodná především pro hodnocení mikro- a nanosystémů či polotuhých formulací (př. gely, krémy), byla poprvé popsána v práci Rao a Buri.<sup>55</sup> Podstatou této techniky je testování mukoadhezivních vlastností lékových forem aplikovaných do oblastí lidského těla s mukózní tkání vysoce namáhanou průtokem biologických tekutin, který může formulace z povrchu mukózy odplavit.<sup>44</sup> Velmi důležitým momentem je správný výběr experimentálních podmínek, jež mimikují biologické prostředí cesty podání; tj. teplotu na povrchu sliznice, vlhkost, složení simulovaných biologických tekutin a rychlost průtoku kapaliny.<sup>44</sup> Princip metody je schematicky znázorněn na Obr. 7.



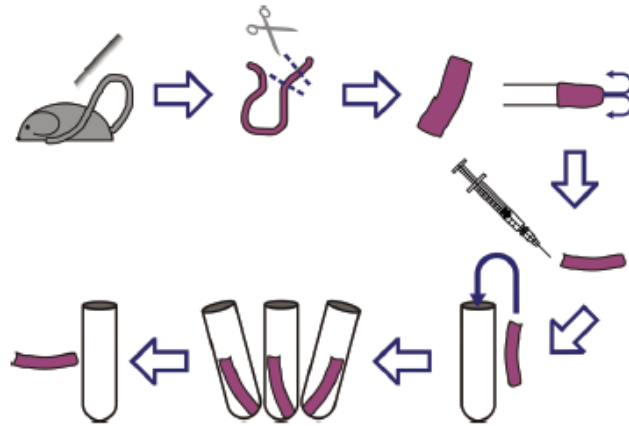
Obr. 7: Schématické znázornění metody stékající kapaliny. (1) Rezervoár s promývacím roztokem; (2) peristaltická pumpa; (3) plastová podpora; (4) mukózní tkáň; (5) mikročástice; (6) sběrací kádinka.<sup>55</sup>

V typickém experimentu se čerstvá mukózní tkáň připevní na šikmo situovaný žlábek a pokryje se testovaným materiálem<sup>44</sup>, např. částicemi obalenými polymery. Poté se po žlábku nechá konstantní rychlostí stékat vhodné médium (za využití peristaltické pumpy) simulující žaludeční nebo intestinální tekutinu, která je schopna odplavit formulaci z mukózy. Na konci žlábku se médium sbírá do kádinky a následně se dekantuje; zbylý pevný obsah v kádince se vysuší horkým vzduchem. Procentuální zastoupení vymytých částic se stanoví spektrofotometrickou analýzou (UV-VIS nebo fluorescencí), popřípadě chromatograficky (HPLC nebo gelovou permeační chromatografií). Procentuální zastoupení zachycených částic se stanoví jako index bioadheze.<sup>44,55</sup>

## 2) Metoda převráceného střeva (Everted sac technique)

Dalším příkladem *ex vivo* metody hodnotící počet přilnutých částic je snadno reprodukovatelná technika “převráceného střeva“ využívaná především pro studium mukoadheze částicových systémů. Poprvé byla představena v roce 1954 ve studii intestinálního transportu a v roce 1999 ji Santos a kol.<sup>56</sup> modifikovali pro studium mukoadheze.<sup>49</sup> Segment intestinální tkáně se vyjme z GIT potkanů, převrátí se, na obou koncích podváže a injekčně naplní fyziologickým roztokem (Obr. 8). Poté se segment přemístí do zkumavky obsahující známé množství suspendovaných částic v roztoku pufru a vzniklá směs se inkubuje a třepe po stanovený čas (obvykle 30 minut). Střevní vak se poté odejme, částice se vymyjí a následně

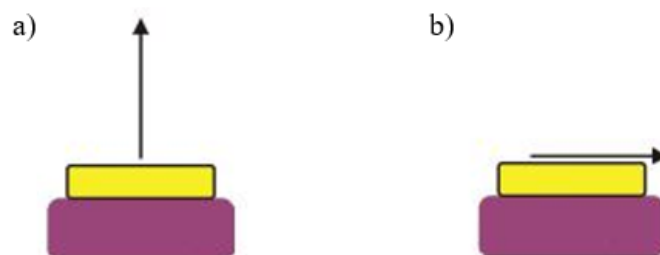
lyofilizují. Procentuální zastoupení přilnutých částic na vaku se vypočítá na základě rozdílu hmotnosti reziduálních částic od hmotnosti částic na počátku.<sup>57</sup>



Obr. 8: Schématické znázornění metody převráceného střeva.<sup>49</sup>

#### 6.4.1.3 Testy měřící adhezní sílu

Hodnocení adhezní síly je v literatuře nejčastěji používaným testem k charakterizaci mukoadheze. Jedná se o metody zkoumající velikost síly nutné k přerušení adhezní vazby mezi modelovou membránou a mukoadhezivním polymerem. V závislosti na směru, ve kterém je přilnutý materiál separován od substrátu se používají odtrhávací a smykové zkoušky (Obr. 9).<sup>49</sup>



Obr. 9: (a) tažná odtrhávací síla, (b) smyková síla.<sup>49</sup>

#### 6.4.1.3.1 Odtrhávací zkoušky

Nejčastěji se používají zkoušky odtrhávací, jež slouží k hodnocení tažné odtrhávací síly potřebné ke kolmému odtržení lékové formy od povrchu mukózy.<sup>27</sup> Do této skupiny zkoušek se řadí metoda modifikovaných fyzikálních vah, mechanické a automatické měření tažné síly (pomocí analyzátorů textury), elektromagnetické snímání síly a metoda mikroskopie atomárních sil.

##### 1) Metoda modifikovaných fyzikálních vah

Modifikované fyzikální váhy se využívají ke stanovování síly, která je potřebná k odtrhnutí tablet či jiné aplikační formy, jak se uvádí např. ve studii Venkatesh a kol.<sup>58</sup> V této studii použili jako modelovou mukózní membránu čerstvou prasečí bukální sliznici, nastříhanou na kousky a omytou fosfátovým pufrem o pH 6,8. Tableta navlhčená pufrem se přilepila ke spodní části misky se závažím, pod ní se umístila kádinka s médiem, na jehož hladinu se položil kousek sliznice. Do předem zvažené kádinky na druhé misce se pomalu přidávala voda, dokud se tableta neoddělila od povrchu sliznice (Obr. 10).<sup>58</sup>



Obr. 10: Modifikované fyzikální váhy pro měření mukoadheze tablet.<sup>58</sup>

##### 2) Mechanické měření tažné síly (Tensile tester)

Tažnou sílu adhezivních polymerních systémů lze měřit také za pomoci přístrojů pro tahové zkoušky, jejichž hlavní součástí jsou zpravidla dva disky. K hornímu pohyblivému disku se přichytí čerstvě získaná mukóza a na dolní stacionární disk se položí testovaný polymer. Přiblížením disků dojde k jejich kontaktu a po určitém čase je mukóza prostřednictvím kolmo působící tažné síly odtažena od polymeru. Stanoví se maximální tažná síla a celková adhezivní práce, reprezentující plochu pod křivkou síla vs. vzdálenost.<sup>27,43</sup> Příkladem využití této metody je např. studie Dyvik a Graffner.<sup>59</sup>, kde testovali mukoadhezivní vlastnosti čtyř polymerů

polykarbopolu (karbopol EX-55), karboxypolymethylenu (karbopol 934P), HPMC (Methocel™ K4M) a alginátu sodného v pěti rozdílných koncentracích. Zjistilo se, že tažná síla je závislá právě na koncentraci a typu použitého polymeru.<sup>59</sup>

### 3) Automatické měření tažné síly s použitím analyzátorů textury (Texture analyser)

Analyzátoary textury (Obr. 11) jsou obecně užitečným nástrojem pro hodnocení mechanických vlastností lékových forem, jako jsou např. pevnost, lisovatelnost a pružnost a dále slouží i k měření adhezní tažné síly.<sup>60</sup> V rámci experimentu se čerstvá zvířecí mukóza připevní oboustrannou adhezivní páskou k sondě připojené k horní platformě, která se následně pohybuje konstantní rychlostí směrem dolů k povrchu tablety umístěné na dolní statické platformě. Ve chvíli prvního kontaktu mukózy s tabletou se aplikuje určená kompresní síla po daný čas, což umožní vznik interakcí. Sonda se poté vrátí stejnou rychlostí zpět do výchozí pozice. Určí se dva důležité parametry vypovídající o mukoadhezivních vlastnostech zkoušeného materiálu, tj. maximální odtrhávací tažná síla a celková adhezní práce odpovídající ploše pod křivkou síla vs. vzdálenost.<sup>44,61,62</sup>



a) CT 3 Analyzátor textury.<sup>63</sup>



b) TA.XT Plus Analyzátor textury.<sup>64</sup>

Obr. 11: Typy analyzátorů textury.

Metoda byla aplikována např. ve studii Rao a kol.<sup>61</sup> využívající liquisolid techniku k přípravě vaginálních mukoadhezivních tablet s klotrimazolem (antifugální léčivo) a mukoadhezivním polymerem sodnou solí karmelózy. Výsledky ukázaly, že se zvyšující se koncentrací polymeru docházelo k nárůstu mukoadhezivní síly přípravku.<sup>61</sup> Dalším příkladem



využití této metody může být studie Varuma a kol.<sup>62</sup>, kde zkoumali mukoadhezivní pelety s prednisolonem potažené jedno- a dvouvrstevným enterosolventním obalem s rozdílným zastoupením karbomerů.<sup>62</sup>

#### 4) Elektromagnetické snímání síly (Electromagnetic force transducer)

Tahové zkoušky lze dále provést za pomoci elektromagnetického snímače síly, který používá elektromagnetické pole k odtažení magneticky zatížených polymerních částic od mukózní tkáně. Přístroj pak vzdáleně zaznamenává tažnou adhezní sílu monitorováním magnetické síly vytvářející odpor mukoadhezivní síle. Metoda poskytuje vysoce zvětšené videosnímky mukoadhezivních interakcí a jelikož nevyžaduje fyzické spojení snímače síly a částic, je možné provést přesné měření mukoadheze i na částicích malých rozměrů (např. mikrosférách).<sup>57</sup>

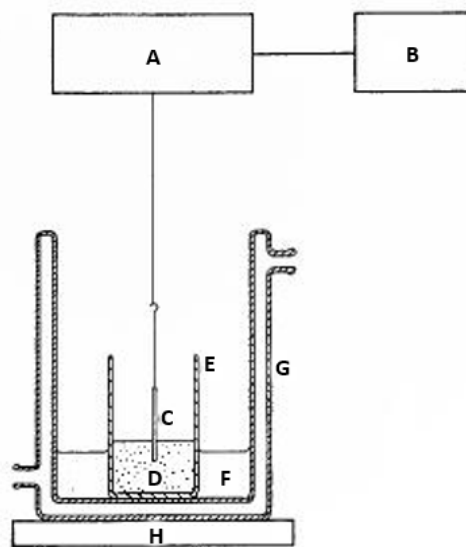
#### 5) Mikroskopie atomárních sil (Atomic force microscopy)

Metoda mikroskopie atomárních sil je založená na snímání odrazu laseru z cantilevru a používá se k zobrazení struktury nebo zkoumání adhezních sil. Sestava se skládá z opory a na ní kolmo připojené sondy (cantilevru), jež se během měření pohybuje přímo po povrchu vzorku (je v kontaktu s povrchem) nebo v poklepovém režimu. Pozice hrotu cantilevru je zaznamenána fotodetektořem díky vychýlení laseru, na jehož základě se shromažďují a vyhodnocují topografické charakteristiky. Získaná data je možné využít pro zhotovení křivky závislosti síly na vzdálenosti sloužící pro studium bioadheze. Narozdíl od elektronové mikroskopie, která neumožňuje zkoumat vzorek za vhodných fyziologických podmínek, může být tato metoda provedena za téměř jakýchkoliv podmínek prostředí, tzn. ve vzduchu, v tekutinách nebo ve vakuové komoře.<sup>49,51</sup> Nevýhodou je časová náročnost a testování omezené jen na některé lékové formy.<sup>51</sup>

#### 6.4.1.3.2 *Smykové zkoušky*

Druhý způsob stanovení adhezní síly představují zkoušky smykové, které předpokládají, že mukoadhezivní chování lékové formulace může být v průběhu GIT ovlivněno smykovým namáháním.<sup>46</sup> Místo tažné síly se měří síla smyková, což je síla nutná k paralelnímu oddělení polymeru od mukózní membrány.<sup>27</sup> Na tomto principu je založena metoda Wilhelmyho destičky (Obr. 12) tradičně užívána pro měření povrchového napětí a dynamického kontaktního úhlu za pomoci mikrotenziometru a mikrovah.<sup>57,65</sup> Pro účely smykových zkoušek se místo

platinové destičky používá destička skleněná, jež je zavěšená na mikrováhách. Potahuje se zkoušeným polymerem ponořením do polymerního roztoku a následným vysušením. Takto připravená destička se umístí na platformu, která se mechanicky pohybuje směrem nahoru až do pozice, ve které deska s polymerem penetruje do mukózního gelu a dosáhne dna nádoby. Po uplynutí dané kontaktní doby se platforma stejnou rychlostí pohybuje směrem dolů. Vyhodnocení maximální síly nutné k odtažení skleněné desky potažené polymerem od roztoku mucinu se provede pomocí mikrovah, a výsledek je zobrazen na grafovém záznamu.<sup>65</sup> V rámci smykových zkoušek je možné určit sílu adhezní vazby (rovnice 1) a její pevnost (rovnice 2).<sup>66</sup>



Obr. 12: Schématické znázornění metody Wilhelmyho destičky pro testování mukoadheze. A, mikrováhy; B, grafový záznamník; C, skleněná destička (boční pohled); D, roztok mucinu; E, kádinka; F, voda; G, nádoba pro vodní lázeň; H, vertikálně se pohybující platforma.<sup>65</sup>

$$\text{Adhezní síla [N]} = \frac{\text{Zatížení [g]}}{1000} \times 9,81 \quad (1)$$

$$\text{Pevnost vazby [N/m}^2\text{]} = \frac{\text{Adhezní síla [N]}}{\text{Povrch polymeru [m}^2\text{]}} \quad (2)$$

#### 6.4.1.4 Reologické metody makroskopické analýzy interakcí

Kromě testů měřících adhezní sílu existují také reologické metody, jež jsou běžnou součástí porovnávání a hodnocení mukoadhezivních vlastností polymerů.<sup>46</sup> První *in vitro* reologické metody byly představeny Hassanem a Gallem,<sup>67</sup> kteří použili viskozimetrii k makroskopické analýze interakcí mezi formulací a mucinem.<sup>49,67</sup> Poměrně jednoduchým způsobem hodnotili a kvantifikovali absolutní bioadhezní sílu monitorováním změn viskozity systému tvořeného prasečím žaludečním mucinem a roztoky polymerů. V důsledku tvorby molekulárních vazeb, propletení a interpenetrace řetězců mukoadhezivního materiálu s makromolekulami mucinu totiž dochází ke změnám reologického chování. Tyto změny reflektují stupeň interakcí mezi mukoadhezivním polymerem a mukusem. Energie fyzikálních a chemických vazeb interakcí mezi mucinem a polymerem se může transformovat do energie mechanické, jež je příčinou změn tvaru a seskupení makromolekul, a tudíž i příčinou změn viskozity.<sup>67</sup> Pokud je viskozita systému mucin-polymer větší než součet viskozit každé složky systému zvláště, hovoří se o reologickém synergismu. Jde o parametr užívaný pro *in vitro* hodnocení mukoadhezivních vlastností polymerů a jeho exprese je tím větší, čím mohutnější propletení řetězců polymeru a glykoproteinů mukusu a intenzivnější tvorba molekulárních vazeb nastane.<sup>44,46</sup>

Dalším důležitým reologickým parametrem je tzv. viskózní komponenta, která vzniká v důsledku bioadheze. Slouží pro odhad bioadhezní síly a při konstantním smykovém namáhání je komparativní veličinou bioadhezivních materiálů. Vypočítá se z rozdílu viskózních koeficientů mucinu, polymeru a celého systému. Finální bioadhezní síla reprezentující aditivní třecí sílu mezi molekulami vztaženou na jednotku plochy se vypočítá vynásobením viskózní komponenty rychlostí smykového namáhání, jak znázorňuje rovnice 3.<sup>67</sup>

$$F = \eta_b * \sigma \quad (3)$$

kde  $F$  – finální bioadhezní síla [ $\text{dyn}^2/\text{cm}$ ];  $\eta_b$  – viskózní komponenta [ $\text{cps}$ ] a  $\sigma$  – rychlost smykového namáhání [ $\text{s}^{-1}$ ].<sup>67</sup>

Hlavní nevýhodou viskozimetrie je však rozpad polymer-mucinové sítě kontinuálním smykovým namáháním. Výhodnější a nedestruktivní metodou hodnocení reologického synergismu je oscilační reometrie. Jde o techniku měřící viskoelastické chování vzorku stanovující mukoadhezi mezi polymerem a mucinem.<sup>27</sup> Princip spočívá v měření viskozity a

elasticity vzorku na reometru v oscilačním režimu, tj. měří se při konstantní frekvenci a rostoucí amplitudě smykového namáhání nebo se naopak mění frekvence a smykové namáhání zůstává konstantní. Stanovením tzv. paměťového modulu  $G'$  (elastického) a ztrátového modulu  $G''$  (viskózního) a závislostí mezi nimi lze provést analýzu interakcí (tj. přítomnost vodíkových vazeb a propletení polymerních řetězců).<sup>68</sup> Například Callens a kol.<sup>68</sup> testovali práškové směsi pro nasální administraci inzulínu vykazující rozdílné hodnoty biodostupností. Výsledky interpretovali pomocí oscilační reometrie, kdy nejvyšší hodnoty viskozity a elasticity (tj. hodnoty  $G'$  a  $G''$ ) byly získány u formulací s nejvyšší biodostupností.<sup>68</sup>

#### **6.4.1.5 Mukoadhezní testy analyzující molekulární interakce**

Reologické metody a techniky měřící adhezní sílu charakterizují mukoadhezi makroskopicky, avšak neumožní zhodnotit mukoadhezi mikroskopicky. Pochopení mukoadhezivních dějů probíhajících na molekulární úrovni přispívá k efektivnímu vývoji nových lékových systémů. Následující níže zmíněné metody analyzují mukoadhezi právě na základě molekulárních interakcí.<sup>49</sup>

##### **1) Metoda s mucinovými částicemi**

Mukoadhezi založenou na elektrostatických interakcích lze hodnotit poměrně jednoduchým testem využívající komerčně dostupné částice prasečího mucinu, které se po suspenzi v roztocích pufru smíchají s vhodným objemem polymerních roztoků. Důkaz mukoadheze polymeru se stanoví na základě změn povrchových vlastností mucinových částic, ke kterým dojde právě v důsledku adheze polymeru. Detekce těchto změn se provede změřením zeta potenciálu, tedy náboje částic v disperzním systému.<sup>69</sup> Metodu lze demonstrovat na studii s chitosanem a karbopolem různých molekulárních hmotností a koncentrací roztoků, které se při různém pH smíchaly se suspenzí mucinových částic. Zjistilo se, že oba polymery měly dostatečně velkou afinitu k mucinovým částicím a přilnuly tak k jejich povrchu, což se projevilo změnou zeta potenciálu.<sup>69</sup>

##### **2) Metoda povrchové plasmonové rezonance (Surface plasmon resonance)**

Moderní metoda detekce mukoadhezivních vlastností polymerů a kvantitativního měření vazebných interakcí je založená na principu povrchové plasmonové rezonance s využitím přístroje BIACORE®. Postup spočívá v imobilizaci polymeru na povrchu senzorkého čipu, skrze který projde mucinová suspenze. Čip má skleněný povrch, jenž pokrývá tenká zlatá vrstva

nesoucí funkční skupiny umožňující adhezi polymeru. Navázáním mucinových částic na polymer dojde ke změně refrakterního indexu a nárůstu rezonanční odezvy, která se zaznamenává na tzv. senzogramu zobrazující závislost rezonance na čase. Hlavní výhodou přístroje BIACORE® je možnost monitorování změn v reálném čase a použití velmi malého množství polymeru. Příkladem využití této techniky je studie zabývající se chitosanem imobilizovaným na povrchu čipu chemickou aminací. Výsledky této práce ukázaly, že změna rezonanční odezvy a stejně tak schopnost mukoadheze chitosanu závisí na jeho molekulární hmotnosti.<sup>69</sup>

### 3) Nízkofrekvenční dielektrická spektroskopie

Studium povrchových fyzikálně-chemických interakcí (předstupeň vzniku vazeb) např. mezi polymerními gely a glykoproteiny mukusu na molekulární úrovni může být učiněno nízkofrekvenční dielektrickou spektroskopií. Jde o metodu zkoumající odezvu materiálu po zapojení elektrického pole. Vzorkem projde v průběhu testu sinusové napětí a jeho odpověď je měřena jako funkce frekvence, ze které se dále určí impedance nebo permitivita vzorku. Detekuje tedy pohyb měnících se nábojů v systému a hodnotí jejich chování. V závislosti na tom, jak snadno projde nabitá částice bariérou mezi gelem a mukózní membránou, se určí tzv. kompatibilita systému.<sup>49</sup> Jak se uvádí ve studii Hägerström a kol.<sup>70</sup> platí, že kompatibilita systému bude tím větší, čím menší bariéru musí nabitá částice překonat.

### 4) Elipsometrie

Další metodou stanovení adhezivních vlastností polymerů a prokázání efektu hydrofobních interakcí je elipsometrie,<sup>51</sup> což je optická technika založená na změně polarizovaného světla v závislosti na odrazu od povrchu vzorku.<sup>71</sup> Malmsten a Lindman<sup>71</sup> publikovali studii stanovující adsorpční potenciál polymeru ethyl(hydroxyethyl)celulózy na základě zvyšování polarizace povrchu křemičitého skla. Větší nárůst adsorbovaných částic mucinu i polymeru se detekoval současně s rostoucím hydrofobním gradientem křemičitého povrchu.<sup>71</sup>

### 5) Měření intenzity zbarvení konjugátu koloidního zlata s mucinem

Základem této techniky je použití červených koloidních částic zlata, jež jsou stabilizovány adsorpcí molekul mucinu. Při interakci mukoadhezivního polymeru s konjugátem zlata a mucinu se povrch polymeru zbarví do červena. Intenzita červené barvy v podstatě odpovídá hustotě koloidních částic zlata a jejím měřením mohou být kvantitativně porovnány

mukoadhezivní vlastnosti a interakce polymerů. Mezi výhody této metody patří možnost studování interakcí mezi mucinem a polymerními řetězci na molekulární úrovni (výsledky méně ovlivněné faktorem hustoty a tloušťky testované mukózy), výroba velkého množství konjugátů zlata s mucinem, tudíž i možnost současného porovnání více různých polymerů, dále jednoduchost provedení bez nutnosti užití speciálních přístrojů (pouze spektrofotometr měřící absorpenci), nižší náklady v porovnání s experimenty používající zvířecí tkáň, užití identických experimentálních podmínek, tj. koncentrace konjugátu zlata s mucinem a čas barvení, a vysoce reprodukovatelné výsledky.<sup>72</sup>

#### 6.4.2 *In vivo* testy

*In vivo* mukoadhezivní studie jsou v literatuře popsány v podstatně menším měřítku než studie *in vitro*. Důvodem jsou větší finanční náklady, časová náročnost a omezující etické hledisko výzkumu na zvířatech.<sup>27</sup> Důležitost *in vivo* studií byla zdůrazněna např. v práci Säkkinen a kol.<sup>73</sup>, kde se věnovali analýze mukoadhezivního chování chitosanu v GIT *in vivo*. Ačkoli chitosan projevuje dobré mukoadhezivní vlastnosti *in vitro*, retenční čas v místě absorpce v lidském GIT byl relativně krátký a nebyl dostatečně reprodukovatelný.<sup>49</sup>

Pro hodnocení mukoadhezivních vlastností *in vivo* je možné využít např. techniku fluorescenčních markerů<sup>74</sup> k určení místa přilnutí mukoadhezivní lékové formy, gama scintigrafii<sup>43,75</sup> nebo radiokontrastní látky<sup>76</sup> k určení doby jejího setrvání v požadované části GIT.

## 7. Experimentální část

### 7.1 Použité suroviny

- Theofylin  
Výrobce: Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika  
Šarže: TAM/13053R
- Guarová klovatina  
Výrobce: Sigma-Aldrich, Česká republika  
Šarže: SLCB9098
- Methocel<sup>TM</sup> K15M Premium CR Grade Hydroxypropylmethylcelulóza  
Výrobce: Colorcon, Lmt., Velká Británie  
Šarže: DT366117/000001
- Prášek pro přípravu biorelevantního disolučního média simulujícího prostředí žaludku nalačno (Fasted State Simulated Gastric Fluid, FaSSGF)  
Výrobce: Biorelevant.com, Velká Británie  
Šarže: FFF-0918-B
- Chlorid sodný (NaCl)  
Výrobce: Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika  
Šarže: CRS100310
- Kyselina chlorovodíková (1M HCl)  
Výrobce: Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.  
Šarže: 1804150413
- Čištěná voda (FaF UK)

## 7.2 Použité přístroje

- Mísící zařízení T2F Turbula®  
Výrobce: Willy A. Bachhofen AG, Švýcarsko
- Laboratorní váhy s citlivostí 0,01 g  
Výrobce: A&D Company, Ltd.; Japonsko
- Analytické váhy HR-20 s citlivostí 0,1 mg  
Výrobce: HELAGO, s.r.o.; Česká republika
- Magnetická míchačka MR 3001  
Výrobce: Heidolph Instruments GmbH & CO. KG; Německo
- Rotační reometr Kinexus; horní měřící geometrie CP 2/20 L0220 SS  
Výrobce: Malvern Instruments Ltd., Velká Británie
- pH-metr HI 221  
Výrobce: Hanna Instruments; Rumunsko
- Lisovací přípravek Adamus HT  
Výrobce: Machine Factory Group, Polsko
- Trhací lis Zwick/Roell T1-FRO 50  
Výrobce: Zwick GmbH, Německo
- Přístroj na hodnocení pevnosti tablet 8M Tablet Hardness Tester  
Výrobce: Dr. Schleuniger® Pharmatron AG, Švýcarsko
- Disoluční systém AT7 Smart + autosampler C 613  
Výrobce: Sotax; Švýcarsko
- Spektrofotometr SPECORD 205  
Výrobce: Analytik Jena; Německo
- Vodní lázeň Grant JB series  
Výrobce: Grant Instruments, Ltd; Velká Británie



## 7.3 Použité metody

### 7.3.1 Příprava práškových směsí

Směsi mukoadhezivních polymerů, použité pro hodnocení viskozity, se připravily prostým smísením guarové klovatiny (GK) a hypromelózy (HPMC K15M) v tříosém homogenizátoru Turbula® T2F po dobu 10 minut rychlostí 34 otáček/min. Obě suroviny se nejdříve přesítovaly přes síto o velikosti ok 400 µm, aby došlo k rozbití veškerých shluků. Celkem se připravily 3 směsi s rozdílným zastoupením jednotlivých polymerů, jejichž označování a složení je uvedeno v *Tabulce 1*.

*Tabulka 1: Směsi mukoadhezivních polymerů.*

<b>Polymer</b> <b>Vzorek</b>	<b>GK [g]</b>	<b>HPMC K15M</b> <b>[g]</b>
100:0	15,00	-
85,4:14,6	12,81	2,19
50:50	7,50	7,50
14,6:85,4	2,19	12,81
0:100	-	15,00

Obdobně se připravily také tabletové směsi s obsahem polymerů a modelového léčiva theofylinu. Jednotlivé suroviny se opět přesítovaly přes síto o velikosti ok 400 µm, čímž došlo k rozbití případných aglomerátů částic. Polymery či jejich směsi se následně smísily s theofylinem v poměru 1:1 za pomoci mísicího zařízení Turbula® T2F. Mísení probíhalo po dobu 10 minut rychlostí 34 otáček/min.

### 7.3.2 Příprava tablet

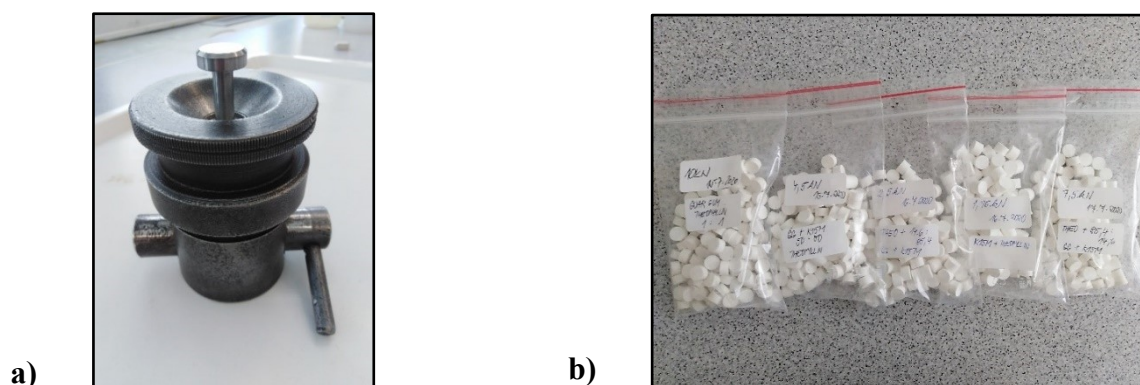
Ze směsi mukoadhezivních polymerů s modelovým léčivem theofylinem se připravily matricové tablety o hmotnosti  $200,0 \pm 1,0$  mg. Přesně navážená tabletovina pro přípravu jedné tablety se kvantitativně přemístila do lisovacího přípravku Adamus HT (Obr. 13 a), který se skládal z matrice a dvou lisovacích trnů o průměru 7 mm. Pro samotné lisování byl použit přístroj Zwick/Roell T1-FRO 50 spolu se softwarem TestXpert III- V1.2. Lisovací síla byla

nastavena u každé směsi zvlášť tak, aby se získaly tablety se srovnatelnou pevností v rozmezí 60 – 80 N. Jednotlivé použité lisovací síly zobrazuje *Tabulka 2*.

*Tabulka 2: Hodnoty použitých lisovacích sil [kN].*

Vzorek	Lisovací síla [kN]
100:0	10,00
85,4:14,6	7,50
50:50	4,50
14,6:85,4	2,50
0:100	1,75

Z každé směsi se připravilo celkem 120 tablet. Před hodnocením jejich vlastností byly tablety uchovávány v polyethylenových uzavíratelných sáčcích (Obr. 13b) po dobu minimálně 24 hodin.



*Obr. 13: a) Lisovací přípravek připravený k vylisování tablety, b) vylisované tablety.*

### 7.3.3 Příprava pufru a biorelevantního média FaSSGF

Hodnocení směsí polymerů i mukoadhezivních tablet probíhalo v prostředí biorelevantního disolučního média simulujícího stav žaludku na lačno (Fasted State Simulated Gastric Fluid, FaSSGF), jehož složení uvádí *Tabulka 3*. K jeho přípravě byl zapotřebí pufr, který se skládal z chloridu sodného, 1 M kyseliny chlorovodíkové a čištěné vody. Přesně navážené množství chloridu sodného (1,999 g) se kvantitativně přidalo k přibližně 900 ml čištěné destilované vody pokojové teploty. Po jeho úplném rozpuštění se pH upravilo na

hodnotu 1,6 pomocí 1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové. Následně se objem pufry v odměrné baňce doplnil čištěnou vodou do 1 000 ml.

Tabulka 3: Složení biorelevantního média simulující kyselé prostředí žaludku.<sup>77</sup>

Složení	FaSSGF
Pepsin [mg.ml <sup>-1</sup> ]	0,1
Taurocholát sodný [μM]	80,0
Lecitin [μM]	20,0
Chlorid sodný [mM]	34,2
Povrchové napětí [mN.m <sup>-1</sup> ]	42,6
Osmolarita [mosm.kg <sup>-1</sup> ]	120,7 ± 2,5
pH	1,6

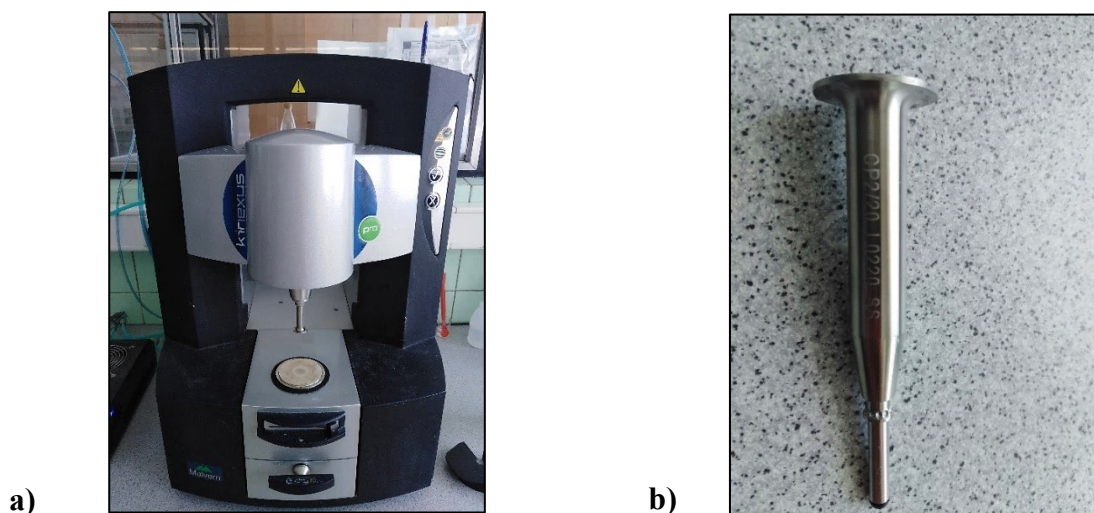
Druhá fáze přípravy obnášela navážení 59,7 mg práškové směsi FaSSGF. Navážený prášek se kvantitativně se přenesl do odměrné baňky o objemu 1 000 ml a doplnil po rysku předem připraveným pufrem. Následně se baňka umístila na magnetickou míchačku a počkalo se do úplného rozpuštění FaSSGF prášku. Takto připravené médium se vždy uchovávalo maximálně 48 hodin při pokojové teplotě.

#### 7.3.4 Měření viskozity polymerních disperzí

Vzorky pro měření viskozity se připravily smísením 1,00 g ± 0,01 g s různými objemy biorelevantního média FaSSGF (12,5; 15; 20; 30 nebo 50 ml) v nerezové třence s těrku. Vzniklá polymerní disperze se přikryla aluminiovou fólií za účelem ochrany před změnou vlhkosti (odpařování média). Z každého polymeru/polymerní směsi se takto připravily 3 vzorky v každém zředění.

Reologické měření viskozity vzniklých polymerních disperzí se uskutečnilo na absolutním rotačním reometru Malvern Kinexus (Obr. 14 a) propojeném se softwarem rSPACE. K měření se použila měřící geometrie CP 2°/20, tj. geometrie s úhlem 2° a průměrem 20 mm (Obr. 14 b), a sekvence *Alternative Flow Curve – Toolkit V005 Shear Rate Ramp* v rozmezí rychlostních spádu 0,01 – 100 s<sup>-1</sup>. Plastovou kopistkou se na střed dolní ploché geometrie z nerezové oceli nanasle vzorek o průměru 0,5 – 1 cm. Horní geometrií byl vzorek stlačen a jeho přebytečné množství se opatrně odstranilo. Poté se nasadil ochranný kryt a

spustila se výše zmíněná sekvence měření. Veškerá měření probíhala při teplotě 37 °C. Po dokončení sekvence se kryt odstranil a horní i dolní geometrie se důkladně očistily destilovanou vodou pomocí buničité vaty. Každý vzorek polymerní disperze se v dané koncentraci měřil ve třech opakováních.



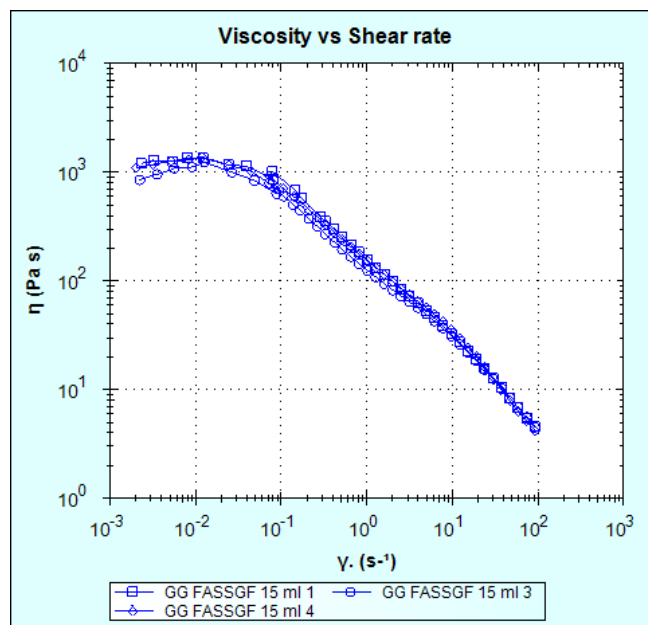
Obr. 14: a) Rotační reometr Kinexus s nasazenou horní měřící geometrií (Malvern Instruments),  
b) detail horní měřící geometrie CP 2/20.

Vyhodnocení získaných viskozitních křivek (Obr. 15) testovaných polymerních disperzí proběhlo v softwaru rSPACE. Jejich analýza se provedla dle mocninného vztahu, tzv. power law modelu, který je vyjádřen rovnicí 4. Pro vyhodnocení dat se použila lineární část logaritmické křivky ležící v rozmezí hodnot rychlostního spádu  $10^0 - 10^1 \text{ s}^{-1}$ .

$$\tau = K * D^n \quad (4)$$

kde  $\tau$  – posuvné napětí [Pa]; K – koeficient konzistence [Pa.s]; D – rychlostní spád [ $\text{s}^{-1}$ ];  $n$  – index tokového chování.

Pomocí zmíněného modelu se vyjádřil koeficient konzistence (K), tj. viskozita při rychlostním spádu  $1 \text{ s}^{-1}$ , a index tokového chování ( $n$ ), tzv. power law index udávající míru odlišnosti od newtonského chování neboli citlivost materiálu k namáhání.<sup>78</sup>



Obr. 15: Viskozitní křivka závislosti viskozity  $[\eta]$  na rychlostním spádu  $[s^{-1}]$ .

### 7.3.5 Stanovení indexu bobtnání

Míra nabobtnání tablet se stanovila u šesti tablet z každého vzorku, které se před začátkem zkoušky přesně zvažily. Poté se každá tableta vložila do předem zváženého disolučního košíčku z nerezové oceli a následně do kádinky obsahující  $75,0 \pm 0,5$  g biorelevantního média FaSSGF. Takto připravené kádinky se umístily do vodní lázně vytemperované na  $37 \pm 0,5$  °C (Obr. 16). V předem určených časových intervalech 15 min; 30 min; 60 min; 120 min; 180 min; 240 min; 360 min; 480 min se košíčky s nabobtnalou tabletou vyjmuly z kádinky, opatrně se odstranila přebytečná vlhkost vně košíčku a opětovně se košíčky i s tabletou zvažily s přesností 0,001 g. Kádinky byly po celou dobu experimentu překryty aluminiovou fólií, aby se předešlo vypařování média. Index bobtnavosti (angl. Swelling Index, SI; %), tj. procentuální navýšení hmotnosti tablety bobtnáním v daném čase se vypočítal dle rovnice 5:

$$SI = \frac{w_t - w_0}{w_0 \cdot 100} \quad (5)$$

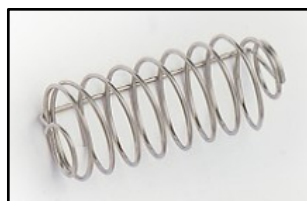
kde  $w_0$  je počáteční váha tablety [g],  $w_t$  [g] je váha tablety v čase  $t$ . Ze získaných hodnot se vypočítal průměr a směrodatná odchylka.



*Obr. 16: Kádinky ve vodní lázni obsahující set košíček s tabletou.*

### **7.3.6 Hodnocení tablet disolučními testy**

Šest náhodně vybraných tablet z každé šarže se podrobilo zkoušce disoluce v disolučním přístroji Sotax AT7 Smart v uspořádání s pádly (USP II metoda) s rychlostí otáčení 100 otáček/min. Ke stanovení rychlosti uvolňování se použilo 900 ml biorelevantního média FaSSGF o pH 1,6 vytemperovaného na  $37,0 \pm 0,5$  °C. Tablety byly před zkouškou opatrně umístěny do sinkerů (Obr. 17) za účelem jejich udržení u dna nádob a omezení flotace nabobtnalých tablet v médiu. V předem stanovených intervalech (0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 16; 20 a 24 hod) se odebíraly vzorky (5 ml) za pomoci autosampleru a zároveň se do nádob automaticky doplňovalo nové disoluční médium v ekvivalentním množství (5 ml).



*Obr. 17: Sinker (spirálovitě zatočený drátek).<sup>79</sup>*

Vyhodnocení množství uvolněného léčiva probíhalo spektrofotometricky při vlnové délce 272 nm po naředění odebraného vzorku médiem v poměru 1:3. Ze získaných hodnot absorbance se za pomoci kalibrační křivky zjistilo procentuální množství uvolněného léčiva v daném čase. Následně se vypočítal průměr a směrodatné odchylky měření.

## 8. Výsledky a diskuse

Cílem experimentální části této práce bylo vyhodnotit vliv mukoadhezivních polymerů na chování matricových systémů s obsahem modelového léčiva theofylinu v prostředí žaludku. Vybrané polymery guarová klovatina (GK) a hypromelóza K15M (HPMC K15M) se použily samostatně nebo v kombinaci, jak znázorňuje *Tabulka 1*. Polymery a jejich směsi se podrobily testování viskozity za použití absolutního rotačního reometru, hodnocení bobtnavosti tablet a rychlosti uvolňování léčiva z matrice. Prostor žaludku bylo simulováno použitím biorelevantního média FaSSGF s pH 1,6. Toto médium se zvolilo z důvodu získání komplexních znalostí o chování lékové formy, a to především kvůli možným změnám pH tlustého střeva v zánětu, které je značně nižší (2,3 – 5,5) než pH fyziologické (6,8 – 7,2).<sup>11</sup> Získané výsledky se mezi sebou následně porovnávaly za účelem stanovení neoptimálnější kombinace mukoadhezivních polymerů.

### 8.1 Hodnocení viskozity polymerů a jejich směsí

Viskozita je definována jako míra vnitřního odporu kapaliny vůči toku a je jedním z významných faktorů ovlivňujících míru řízeného uvolňování léčiva z hydrofilních maticí, jejichž základem jsou ve vodě bobtnající polymery nebo jejich kombinace.<sup>80</sup> Hodnota viskozity výsledné disperze polymeru může být ovlivněna hodnotou pH, která se napříč GIT značně proměňuje, peristaltikou a smykovou silou.<sup>2</sup> Všechny tyto faktory mohou následně značně ovlivňovat rychlost uvolňování léčiva z hydrofilních matricových systémů.<sup>81</sup> Z tohoto důvodu byly různě koncentrované disperze obou polymerů i jejich směsí podrobeny zkoušce viskozity. K přípravě disperzí se využilo biorelevantní médium FaSSGF, díky čemuž se simulovala hydratace polymerů ve střevě s právě probíhajícím zánětem či v prvotních fázích průchodu GIT, kdy se okolo matrice tvoří viskózní gelová vrstva.<sup>80</sup> Ta může být ovlivněna a narušena pohybem peristaltiky,<sup>82</sup> jež byla v průběhu testu simulována rostoucím rychlostním spádem (smykovým namáháním).

Získané viskozitní křivky se označují také jako nerovnovážné či alternativní, neboť se viskozita měří současně s kontinuálně rostoucím rychlostním spádem a nečeká se na dosažení rovnovážného stavu viskozity.<sup>83</sup> K jejich analýze se využil mocninný vztah, tzv. power law model (*rovnice 4*), který umožnil získat hodnoty indexu tokového chování ( $n$ ). Tento index, označovaný také jako power law index, udává míru odlišnosti od newtonského chování neboli citlivost materiálu k namáhání. Pro index tokového chování pak platí, že:<sup>78</sup>

- pokud je  $0 < n < 1$ , vykazuje kapalina pseudoplastický tok, kdy viskozita klesá při rostoucím rychlostním spádu (angl. shear thinning behaviour),
- pokud je  $n$  blíže nebo rovno 1, vykazuje kapalina newtonské chování,
- pokud je  $n > 1$ , vykazuje kapalina dilatantní tok, kdy viskozita roste při rostoucím rychlostním spádu (angl. shear thickening behaviour).<sup>78</sup>

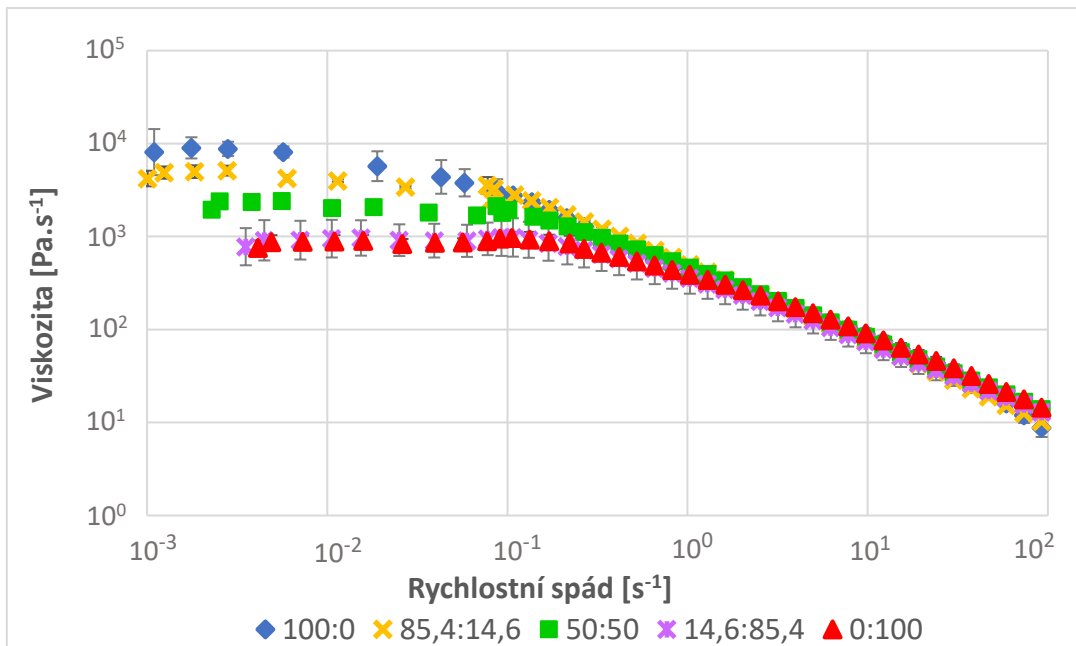
Zjištěné hodnoty indexu tokového chování ( $n$ ) spolu s korelačními koeficienty všech měřených polymerních disperzí uvádí *Tabulka 4*. Všechny testované směsi vykazovaly pseudoplastické, neneutonské chování, jelikož se jejich hodnoty indexu tokového chování ve všech ředěních pohybovaly v intervalu  $0 < n < 1$ . Navíc bylo zjištěno, že čím více se hodnota  $n$  blížila nule, tím signifikantněji klesala viskozita při zvyšujícím se rychlostním spádu (Obr. 18, Obr. 19). Hodnota korelačního koeficientu odpovídala míře lineární závislosti sledovaných veličin, tedy čím blíže byla jedné, tím významnější byla shoda (tj. korelace) mezi očekávanými a získanými daty.

*Tabulka 4: Hodnoty power law indexu ( $n$ ) a korelačního koeficientu získané analýzou dle power law modelu. (průměr  $\pm$  SD, počet měření = 9).*

	<i>zředění [ml]</i>	<b>100:0</b>	<b>85,4:14,6</b>	<b>50:50</b>	<b>14,6:85,4</b>	<b>0:100</b>
<b><math>n</math></b>	12,5	0,363 $\pm$ 0,016	0,148 $\pm$ 0,036	0,178 $\pm$ 0,020	0,266 $\pm$ 0,027	0,295 $\pm$ 0,026
	15	0,359 $\pm$ 0,029	0,170 $\pm$ 0,030	0,234 $\pm$ 0,014	0,303 $\pm$ 0,058	0,358 $\pm$ 0,036
	20	0,349 $\pm$ 0,031	0,211 $\pm$ 0,024	0,304 $\pm$ 0,029	0,337 $\pm$ 0,045	0,388 $\pm$ 0,060
	30	0,354 $\pm$ 0,030	0,307 $\pm$ 0,009	0,478 $\pm$ 0,022	0,437 $\pm$ 0,036	0,445 $\pm$ 0,110
	50	0,405 $\pm$ 0,026	0,430 $\pm$ 0,021	0,545 $\pm$ 0,021	0,469 $\pm$ 0,117	0,449 $\pm$ 0,092
<b>korelační koeficient</b>	12,5	0,997 $\pm$ 0,001	0,984 $\pm$ 0,018	0,996 $\pm$ 0,001	0,993 $\pm$ 0,003	0,994 $\pm$ 0,003
	15	0,998 $\pm$ 0,001	0,950 $\pm$ 0,010	0,997 $\pm$ 0,002	0,992 $\pm$ 0,010	0,995 $\pm$ 0,002
	20	0,997 $\pm$ 0,001	0,998 $\pm$ 0,003	0,997 $\pm$ 0,002	0,996 $\pm$ 0,004	0,996 $\pm$ 0,002
	30	0,998 $\pm$ 0,001	0,999 $\pm$ 0,001	0,998 $\pm$ 0,000	0,997 $\pm$ 0,001	0,996 $\pm$ 0,002
	50	0,998 $\pm$ 0,001	0,999 $\pm$ 0,001	0,944 $\pm$ 0,155	0,985 $\pm$ 0,027	0,990 $\pm$ 0,012

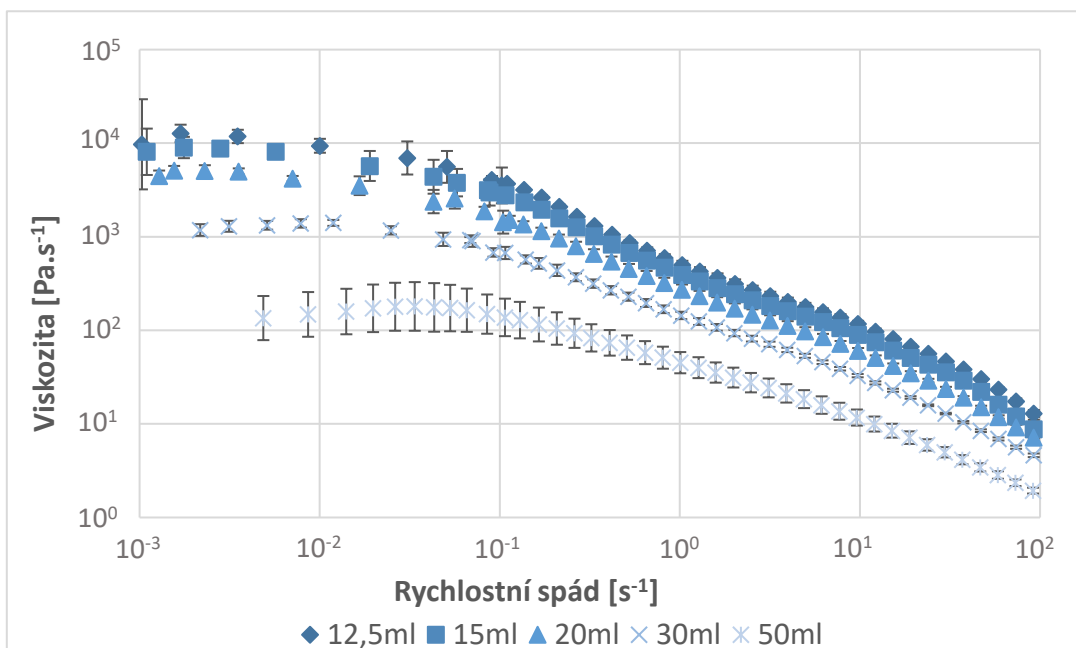
Obr. 18 znázorňuje jako ukázkou získané viskozitní křivky disperzí připravených za použití 15 ml biorelevantního média. U všech viskozitních křivek je patrné tzv. newtonské plató (*zero shear viscosity*), což znamená, že při nižších hodnotách rychlostního spádu je viskozita konstantní a začne rychle klesat až při určité hodnotě namáhání. Není zde přítomná mez toku (*yield stress*), tedy stále rostoucí viskozita při nižších hodnotách rychlostního spádu, díky čemu se pak soustava chová jako tuhá látka.<sup>84,85</sup>





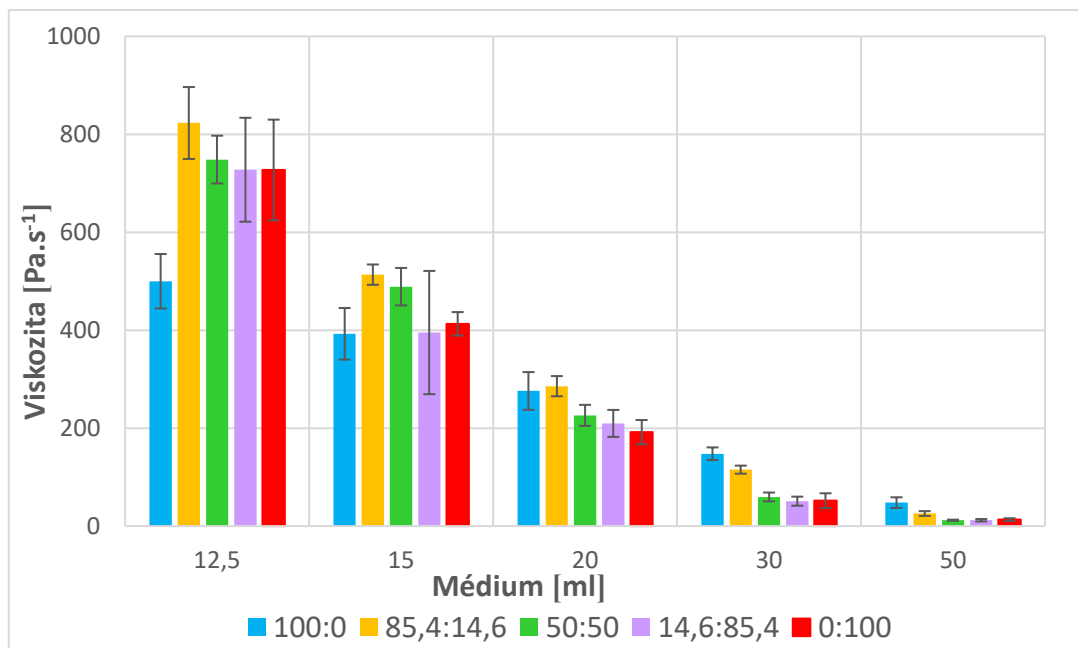
Obr. 18: Viskozitní křivky polymerních disperzí ve zředění 15 ml.

Vliv ředění na viskozitní křivky je demonstrován na disperzích GK (Obr. 19). U vzorku 100:0 (samotná GK) bylo pseudoplastické chování zřetelnější u nejvíce koncentrované disperze, naopak s rostoucím zředěním klesala viskozita pomaleji. Důvodem pro to může být pomalejší rozpouštění gelové vrstvy GK vytvořené v průběhu hydratace polymeru. K podobným závěrům došli také v práci Mudgil a kol.<sup>85</sup> zabývající se vlastnostmi GK.



Obr. 19: Viskozitní křivky disperze GK ve zředěních 12,5; 15; 20; 30 a 50 ml.

Hodnocení viskozity disperzí polymerů při rychlostním spádu  $1 \text{ s}^{-1}$ , který nejvíce napodobuje peristaltickou činnost GIT<sup>86</sup>, ukázalo, že dle očekávání docházelo u všech vzorků k poklesu hodnoty viskozity s rostoucím naředěním disperze (Obr. 20). V případě GK lze trend vyšší viskozity u více koncentrovaných disperzí vysvětlit na základě interakcí, ke kterým dochází mezi postranními řetězci galaktózy ve struktuře GK a molekulami vody. Zvýšením koncentrace GK tak dochází k většímu proplétání řetězců a zesílení intermolekulárních interakcí, což vede ke zvýšení viskozity.<sup>85</sup> Podobně objasňuje nárůst viskozity polymerních roztoků i Nokhodchi a kol.<sup>80</sup> Tato studie popisuje zvýšení viskozity jako důsledek hydratace polymerních řetězců, které se rozpínají a formují do relativně volných, náhodných smyček. Ty na sebe navazují další molekuly vody anebo se proplétají mezi sebou navzájem. Polymerní struktura tak nabývá na velikosti a postupně se zvyšuje míra vnitřního odporu vůči toku, tedy viskozita.<sup>80,87</sup> Obdobný trend snižující se viskozity s rostoucím zředěním disperze byl pozorován také ve studii Cheong a kol.<sup>88</sup>, kde se sledoval vliv viskozitních stupňů K4, K15, K30, K50, K100 a zvyšující se koncentrace HPMC na výslednou relativní viskozitu vodných disperzí při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Výsledky této práce ukázaly, že viskozita polymerních roztoků je přímo úměrná stupni viskozity a koncentraci polymeru. To může být vysvětleno strukturou tohoto derivátu celulózy, jehož kostra je tvořena makromolekulami, které se skládají ze stovek řetězců uspořádaných v náhodných smyčkách, jež jsou propojeny vodíkovými vazbami. Hydrofilní charakter HPMC jí udává vysokou afinitu k vodě a při kontaktu polymerních řetězců s vodou se začne struktura HPMC rozpínat úměrně jejímu viskozitnímu stupni a stejně tak se zvětší její hydrodynamický objem. Z toho vyplývá, že čím vyšší je koncentrace nebo stupeň viskozity HPMC, tím viskóznější gelová vrstva se vytvoří okolo matrix tablety, která je rezistentní k penetraci média. Výsledkem je pomalejší difúze léčiva z hydrofilní matricové tablety. Pro formulaci lékového systému s řízeným uvolňováním je proto viskozitní stupeň HPMC dalším důležitým aspektem.<sup>88</sup>



Obr. 20: Porovnání viskozit polymerních disperzí při rychlostním spádu  $1 \text{ s}^{-1}$  (koeficient konzistence).

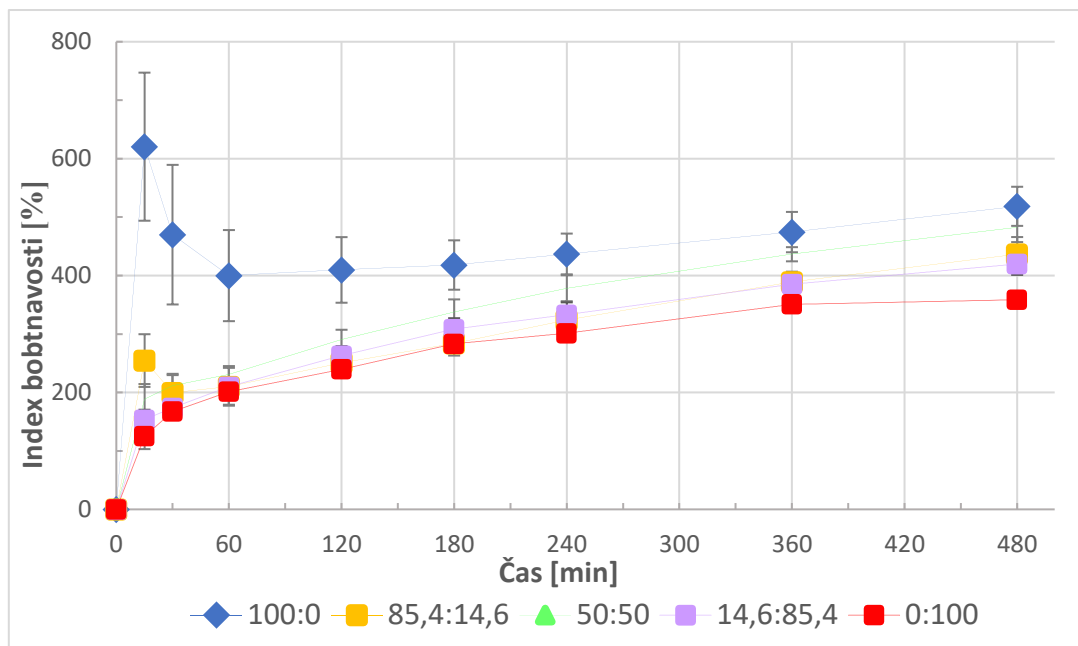
Z grafu vzájemného porovnání viskozit polymerních disperzí (Obr. 20) dále vyplývá, že přestože vzorky obsahující HPMC K15M vykazovaly při nižším ředění vyšší hodnoty viskozity (až  $823,03 \pm 102,09 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ ), snižující se koncentrace polymeru v disperzi vedla k výraznějšímu poklesu jejich hodnot, a to především u vzorků s vyšším zastoupením HPMC K15M (0:100 a 14,6:85,4). Naopak nejnižší vliv množství biorelevantního média byl pozorován u vzorků s vyšším obsahem GK, především pak u GK samotné, kde viskozita klesala z  $500,01 \pm 55,54 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$  na  $47,96 \pm 10,87 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Soudržnost disperze GK při vyšším zředění je možné připisovat pomalejší erozi gelové vrstvy vzniklé v průběhu hydratace.<sup>89</sup> Rozdíl v míře poklesu viskozit v závislosti na zředění pravděpodobně také souvisí s poklesem pH polymerní disperze s rostoucím množstvím kyselého média. Oba testované polymery jsou neionické povahy, díky čemuž jsou stabilní v širokém rozmezí pH, což snižuje riziko interakcí a s tím spojených změn ve viskozitě v kyselém i zásaditém prostředí. Nicméně rozmezí pH, ve kterých je polymerní disperze stabilní, je pro GK širší (1 – 10,5) v porovnání s HPMC (3 – 11).<sup>80,85</sup> Z tohoto důvodu je možné usuzovat, že vyšší množství kyselého média může vést v případě HPMC k rychlejšímu rozplétání řetězců a tvorbě méně viskózní disperze. Hodnota pH média se navíc může projevovat i na stupni a rychlosti hydratace polymeru, což může mít dopad taktéž i na výslednou viskozitu.<sup>85</sup> V případě nižších zředění (12,5 – 20 ml média) je navíc patrný synergický efekt polymerů na hodnoty viskozity. Přídavek malého množství HPMC K15M ke GK (vzorek 85,4:14,6) vedl k výraznému zvýšení viskozity až na  $823,03 \pm 102,09 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ . To znamená, že HPMC K15M dokáže i v minoritním množství ve směsi vytvořit silnou gelovou

vrstvu díky své vysoké viskozitě, což je zde navíc podpořeno současnou rychlou hydratací obou polymerů. Tento efekt byl pozorován také ve studii Varshosaz a kol.<sup>90</sup>, ve které zjistili, že přítomnost HPMC ve směsi s přírodním polymerem (GK, xanthanová guma) je výhodnější než kombinace samotných přírodních polymerů. Obdobné synergické působení bylo popsáno také ve studii Maad a kol.<sup>91</sup> pro kombinace přírodního polymeru (xanthanové gumy nebo GK) s polymery HPMC K15M a/nebo Eudragit S100.

## 8.2 Hodnocení bobtnavosti tablet

Vylisované tablety se podrobily testu bobtnavosti za účelem studia chování polymerních matic v prostředí žaludku. Nabobtnání tablety je výsledkem absorpce vody maticí a obnáší několik kroků. V momentě prvního kontaktu hydrofilní polymerní matrix s disolučním médiem dochází ke smáčení jejího povrchu. Médium prochází mikroskopickými póry, dochází k hydrataci a bobtnání polymeru, čímž se formuluje gelová viskózní vrstva na povrchu formulace. Ta v důsledku další penetrace vody roste, stává se odolnější a nese funkci difúzní bariéry řídící rozpouštění a disoluci léčiva z tablety. Stupeň bobtnání, tj. tloušťka gelové vrstvy proto hraje důležitou roli v řízeném uvolňování hydrofilních léčiv z hydrofilní matrice.<sup>80,92</sup>

Z Obr. 21 je patrné, že tablety 100:0 tvořené jednodlitou polymerní maticí z GK vykazovaly po celých 8 hodin nejvyšší stupeň nabobtnání (tj. index bobtnavosti, SI). Počáteční dominantní ostrý pík křivky značí velmi rychlý nárůst hmotnosti matrice následovaný jejím rychlým poklesem v průběhu dalších 30 minut (z hodnoty SI  $620,5 \pm 126,7$  % na  $399,9 \pm 77,9$  %). Tento jev souvisí se schopností GK velmi rychle absorbovat vodu a rapidně nabobtnat,<sup>85</sup> což vede v krátkém časovém úseku ke kompletní hydrataci vnějších vrstev polymeru. To způsobí rozpletení a relaxaci řetězců polymeru umístěných na povrchu nabobtnalé tablety. Díky tomu se následně ztrácí integrita gelové vrstvy a dochází k erozi povrchu polymerní matrice.<sup>80</sup> Iniciální hydratace a následná eroze vnějších vrstev GK je dále doprovázena konstantním nárůstem hmotnosti rezultujícím hodnotou SI  $518,5 \pm 33,5$  % po 8 hodinách zkoušky. Obdobný průběh byl pozorován také u vzorku 85,4:14,6, který rovněž obsahuje velký podíl GK. Prvotní nabobtnání ani následný pokles hmotnosti nabobtnalé tablety však nebyl v tomto případě tak markantní. To je zapříčiněno určitým podílem HPMC K15M v maticí, jelikož hydratace jejích řetězců probíhá v porovnání s GK pomaleji.<sup>93</sup>



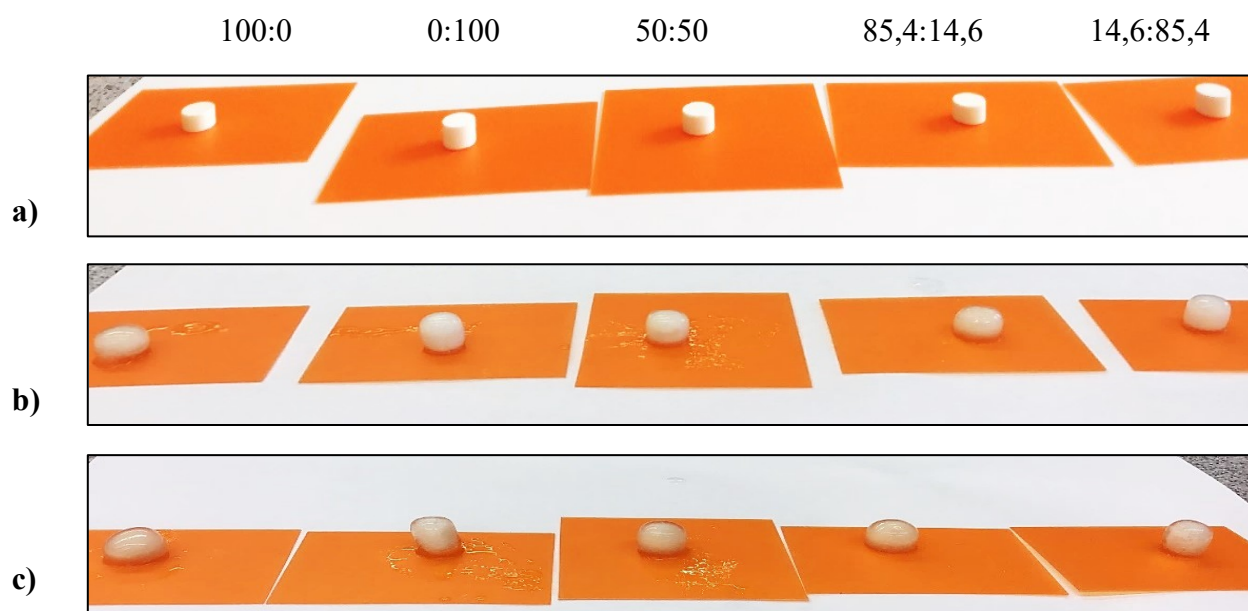
Obr. 21: Index bobtnavosti.

Další navýšení zastoupení HPMC K15M nad 50 % ve směsi polymerů vedlo k úplnému vymizení úvodního píku v křivce bobtnání (Obr. 21). U těchto tablet byl pozorován rychlý nárůst hmotnosti v prvních 15 minutách zkoušky, což je spojeno s iniciální absorpcí vody. Následná hydratace a bobtnání probíhaly po prvotní hydrataci tablety ve všech třech případech konstantně. Obdobný trend byl popsán také ve studii Dalvadi a kol.<sup>94</sup> u mukoadhezivních tablet s maticemi z HPMC K15M a K4M. Tento jev lze vysvětlit tak, že s postupnou penetrací média do struktury matrix je HPMC K15M čím dál tím více hydratovaná a okolo tablety se formuje stále silnější gelová vrstva.<sup>81</sup> Díky hydrofilním hydroxypropyl-skupinám má HPMC K15M vysokou kapacitu retence vody<sup>92</sup> a její značná viskozita zablokuje póry v matrix, čímž je potlačen další vstup média. Výsledkem je pomalejší absorpce tekutiny do matrix, a tedy i nižší stupeň nabobtnání.<sup>81</sup>

U tablet 50:50 a 14,6:85,4 nebyla pozorována ani eroze matrice, která by převyšovala její průběžné nabobtnání. Roli zde může hrát větší zastoupení vysoce viskózní HPMC K15M přispívající k větší soudržnosti gelové vrstvy v kombinaci s GK, jejíž viskozita klesá se zvyšujícím se ředěním pomaleji, jak již bylo diskutováno výše. K obdobným závěrům došli také ve studii Srivastava a kol.<sup>93</sup>, ve které se stanovovala bobtnavost flotujících tablet obsahujících HPMC K4M, HPMC K15M a GK. Výsledky studie zde ukázaly, že v počátku nejrychleji nabobtnala jednodílná matrice GK, ale po 4 hodinách u ní nastal pokles hmotnosti způsobený rozpouštěním vnějších vrstev GK. Naopak matrice HPMC K15M vykazovala

plynulý nárůst hmotnosti bez jakéhokoliv poklesu v hodnotách indexu bobtnavosti. Míra nabobtnání ovšem byla nižší než v případě HPMC K4M, a to právě díky její vyšší viskozitě a větší schopnosti retence vody.<sup>93</sup> Získané výsledky dále naznačují, že po 7 hodinách dochází v případě matric s obsahem čisté HPMC K15M k převládnutí procesu eroze gelu nad postupnou hydratací dalších hlouběji situovaných vrstev, což se opět projeví snížením hodnot indexu bobtnavosti (Obr. 21). Podobný trend byl pozorován i v odborné literatuře<sup>94,93</sup>, která uvádí, že v horizontu 7 až 8 hodin matrice polymerů HPMC a GK dosáhne maximálního stupně nabobtnání, poté již dochází v důsledku přílišné hydratace k rozpouštění a erozi polymeru do média, což vede ke snížení jeho relativní koncentrace. Gelová vrstva začne ztrácet svoji viskozitu, čímž se usnadní prostup média do jádra matrix. To se odrazí v poklesu hmotnosti tablety.<sup>88</sup>

Obr. 22 znázorňuje modelové tablety před a po nabobtnání v médiu po 4 a 8 hodinách a ukazuje míru nabobtnání a změny ve struktuře vzniklé gelové vrstvy. Z fotografií je patrné, že vnější vrstvy bobtnají, avšak po 4 i 8 hodinách je stále možné pozorovat u všech vzorků pevný střed tablety, který není zcela smáčen. Výraznější vrstva gelové vrstvy a viditelné zmenšení objemu částic je pak patrné po 8 hodinách zkoušky, kdy se tablety nejvíce blíží úplné hydrataci, která je následována postupnou erozí matrice.



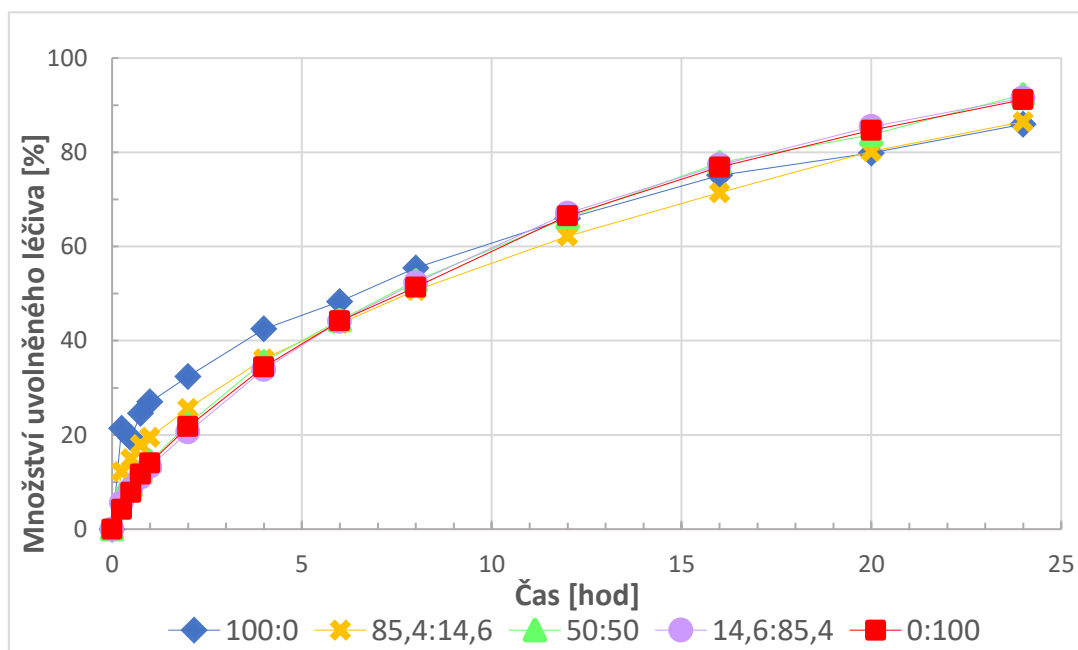
Obr. 22: a) Tablety před vložením do média; b) nabobtnalé tablety vyjmuté z média po 4 hod.; c) nabobtnalé tablety vyjmuté z média po 8 hod.

### 8.3 Vyhodnocení disolučních profilů

Cílem provedených disolučních zkoušek bylo stanovit schopnost použitých polymerů GK a HPMC K15M a jejich kombinací zpomalit rychlost uvolňování léčiva z matrice v prostředí žaludku. V případě hydrofilních matricových systémů může být proces uvolňování léčiva řízen dvěma mechanismy, tj. difúzí skrze gelovou vrstvu (platí pro rozpuštěnou frakci léčiva) nebo erozí gelové vrstvy (platí pro pevné nerozpuštěné částice léčiva).<sup>80,94</sup> Z tohoto důvodu je základním předpokladem úspěchu lékového systému hydratace a bobtnání hydrofilní polymerní matrice v okamžiku kontaktu s disolučním médiem.<sup>88</sup> Rychlost a množství uvolněného léčiva tak závisí především na typu a množství polymeru(ů) ve formulaci, viskozitním stupni a schopnosti bobtnat.<sup>92</sup> Kombinace polymerů se jeví často jako výhodnější a efektivnější pro řízené uvolňování léčiv než polymerní jednoduté matrice. Mughal a kol.<sup>95</sup> např. uvádí, že samotný hydrofilní bobtnající polymer obvykle nedosáhne disolučního profilu vykazující kinetiku nultého řádu (tj. konstantní rychlost uvolňování nezávislou na koncentraci výchozí látky). Potenciál v prodlouženém uvolňování léčiv z matricových systémů shledává právě v kombinacích HPMC s přírodními polymery jako je GK nebo xanthanová guma.<sup>95</sup> Svou roli zde zastává také pH disolučního média, které ovlivňuje sílu gelové vrstvy. To potvrdila i studie Tritt-Goc a kol.<sup>96</sup> dokazující, že uvolnění léčiva z matricových tablet s HPMC o nižší viskozitě probíhá v kyselém pH 1,2 rychleji než v pH alkalickém. Na základě snímků z magnetické rezonance se potvrdilo, že příčinou je vytvoření slabší gelové vrstvy okolo tablety, skrze kterou voda snadno penetruje do jádra matrix.<sup>96</sup> Dalším významným faktorem ovlivňujícím míru nabobtnání matrice, a tedy i disoluční profil léčiva je iontová síla GIT tekutin. Na koncentraci iontové síly má určitý vliv příjem potravy (obecně nabývá hodnot přibližně 0,1 M ve stavu na lačno a hodnot 0,4 M po jídle) a může tak do jisté míry ovlivnit uvolňování léčiva.<sup>80</sup> Zmíněné faktory je možné predikovat použitím biorelevantních médií, jež dokážou simulovat kompozici tekutin a fyzikálně-chemické podmínky v GIT, a stejně tak stav nalačno a po jídle. Použitím FaSSGF je tak možné dosáhnout reprodukovatelných výsledků, jež jsou snadno aplikovatelné na prostředí *in vivo*.<sup>77</sup>

Z grafu znázorňujícího disoluční profily léčiva (Obr. 23) vyplývá, že všechny polymerní matrice byly schopné prodloužit uvolňování modelového léčiva (theofylin) po dobu až 24 hodin. S ohledem na testování formulací v prostředí žaludku je nejvýznamnější počáteční část křivky, tedy období prvních 2 hodin odpovídající průměrné době vyprazdňování žaludku.<sup>97</sup> V případě polymerní matrice tvořené čistou GK (vzorek 100:0) byl v počátku disoluce pozorován tzv. burst-effect, tedy okamžité uvolnění vyššího množství léčiva ( $21,36 \pm 1,99$  %).

Tento jev může být v některých případech žádoucí, např. vyšší iniciální dávka analgetika následována udržováním konstantní hladiny léčiva v systémovém oběhu, ale může s sebou nést i jistá rizika. Mezi nepříznivé dopady burst-effectu patří např. podráždění žaludku, selhání léčby, dosažení toxické hladiny léčiva (zejm. u léčiv s nízkým terapeutickým indexem) a z toho plynoucí nežádoucí účinky. Příčinou pozorovaného burst-effectu, jež je některými zdroji nazýván také jako iniciální eroze povrchové matrice<sup>98</sup>, může být zachycení léčiva na povrchu polymerní matrice při přípravě tablet, které je ihned při kontaktu s médiem rozpuštěno a rychle uvolněno. Tento jev je typický zejména pro systémy s obsahem rychle bobtnajících látek. Podobný trend rychlého uvolnění iniciální dávky byl pozorován např. ve studii Mughal a kol.<sup>95</sup> u přírodních polymerů GK a xanthanové gumy anebo u hydrogelů s obsahem theofylinu.<sup>99</sup> V dalších odběrových intervalech vykazoval vzorek 100:0 již konstantní rychlost uvolňování, přičemž množství uvolněného léčiva bylo až do 8. hodiny disoluční zkoušky z této matrice nejvyšší (Obr. 23). Tyto závěry jsou v souladu i s výsledky hodnocení indexu bobtnavosti, kde bylo u formulace 100:0 pozorováno rapidní nabobtnání tablety následováno výraznou erozí gelové vrstvy spojené právě s rychlým uvolněním části léčiva do disolučního média. Následné vyrovnání rychlosti uvolňování je spojeno s konstantním bobtnáním matrice (Obr. 21).



Obr. 23: Disoluční profil theofylinu.

Méně patrný burst-effect byl pozorován také u formulace 85,4:14,6, což je v souladu s výše diskutovanými hodnotami indexu bobtnání. Příčinou je zde vyšší zastoupení GK v tabletě spojené s rychlou hydratací povrchových vrstev tablety. Další nárůst podílu HPMC



K15M v matrici vedl k potlačení uvolnění iniciální dávky léčiva, což se projevilo konstantnější rychlostí uvolňování theofylinu po celou dobu disolučního testu. To souvisí s vyšší viskozitou tohoto polymeru a konstantním formováním gelové vrstvy, která matrici obklopuje. Tloušťka této vrstvy se s časem zvětšuje a difúzní dráha léčiva je tak přímo úměrná vzdálenosti jádra od povrchu tablety.<sup>100</sup>

Podobný trend v disolučních profilech lze nalézt ve studii Srivastava a kol.<sup>93</sup>, kde zjistili, že uvolňování léčiva atenololu probíhalo rychleji u tablet s matricí tvořenou GK, zatímco matrice s HPMC K15M díky své vysoké viskozitě disoluční profil léčiva značně zpomalila.<sup>93</sup> Rovněž Dalvadi a kol.<sup>94</sup> pozorovali pomalejší uvolňování léčiva kaptoprilu z matric založených na HPMC K15M v porovnání s formulacemi obsahujícími pouze GK.<sup>94</sup> K podobnému závěru došli také Maad a kol.<sup>91</sup> ve studii cíleného přívodu matricových tablet do kolonu s extraktem z listů léčivé rostliny *Solenostemma argel* s protinádorovým účinkem. Výsledky hodnocení disolučních profilů v této studii ukázaly, že se z jednoduté matrice s GK po 5 hodinách uvolnilo 30,00 – 35,75 % léčiva, zatímco z matrice tvořené kombinací polymerů (HPMC K15M a GK) pouze 13,9 – 28,2 %.<sup>91</sup>

## 9. Závěr

Tato práce je součástí obsáhlejší studie zabývající se přípravou lékových systémů s cíleným přívodem špatně rozpustných léčiv do oblasti tlustého střeva. Cílem této preformulační práce proto bylo hodnocení chování mukoadhezivních polymerů, konkrétně guarové klovatiny (GK) a hypromelózy K15M (HPMC K15M) a jejich směsí v biorelevantním médiu s pH 1,6 simulujícím kyselé prostředí žaludku (FaSSGF).

Na základě výsledků měření viskozity lze konstatovat, že všechny testované polymerní disperze vykazovaly pseudoplastický tok. Zvyšující se naředění disperze vedlo při rychlostním spádu  $1 \text{ s}^{-1}$  k poklesu hodnot viskozity, přičemž vzorky s vyšším zastoupením GK (především disperze samotné GK) vykazovaly nižší vliv stupně naředění. Důvodem je pravděpodobně pomalejší rozpouštění gelové vrstvy spojené s nižší citlivostí GK k měnícím se hodnotám pH. Při nižších zředěních byl navíc pozorován synergický efekt kombinace GK s HPMC K15M projevující se vyšší viskozitou vzorků 85,4:14,6 a 50:50. Přítomnost HPMC K15M ve směsi podpořila absorpci vody, nabobtnání disperze a taktéž nárůst viskozity gelové vrstvy.

Hodnocení indexu bobtnavosti ukázalo, že matrice s dominantním zastoupením GK v prvních minutách rapidně nabobtnají. Tento proces je následován poklesem hmotnosti matrice, jehož příčinou je předčasné rozpuštění jejich vnějších, plně hydratovaných vrstev. Naopak čím byla koncentrace HPMC K15M v matrici vyšší, tím byla zaznamenána nižší míra nabobtnání. Důvodem je vyšší integrita gelové vrstvy bránící vstupu dalšího media do jádra tablety.

Všechny testované matricové systémy byly schopny řídit uvolňování modelového léčiva theofylinu po dobu 24 hodin. Nicméně u vzorků 100:0 a 85,4:14,6 byl patrný burst-effect, a proto tyto matrice v důsledku rychlého nabobtnání GK uvolnily během prvních dvou hodin zkoušky více než 25 % léčiva. Oproti tomu, matrice s vyšším zastoupením HPMC K15M vytvořily dostatečně viskózní a odolnou vrstvu, která zabránila penetraci média a předčasnému rozpouštění a difúzi léčiva z matrice.

V rámci této studie se jako nejvhodnější kombinace polymerů pro další testování jeví matrice obsahující směs 14,6:85,6 a 0:100. Důvodem je jejich konstantní míra bobtnání v průběhu celé zkoušky spojená s rovnoměrným uvolňováním léčiva z matrice bez výrazného burst-effectu.

## 10. Použitá literatura

---

1. MEHTA T. J., A. D. PATEL, M. R. PATEL, N. M. PATEL. Need of colon specific drug delivery: Review on primary and novel approaches. *International Journal of Pharmaceutical Research & Development*. 2011, **03**(1), s. 134-153. ISSN 0974 – 9446.
2. CHOURASIA, M. K. & JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2003, **06**(1), s. 33–66. ISSN 1482 - 1826.
3. KUMARI, B., P. K. UPADHYAY, M. KUMAR, S. NARWAL, A. PANDURANGAN a A. MALIK. An update overview of recent advances on formulation development for colon targeting. *International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*, 2020, **11**(4), s.1000-10. ISSN 0975 - 8232.
4. KINGET, R, W. KALALA, L. VERVOORT & G. van den MOOTER. Colonic Drug Targeting, *Journal of Drug Targeting*, 1998, **06**(2), s. 129 - 149. ISSN 1061 - 186.
5. TERUEL, A. H., I. GONZALEZ-ALVAREZ, M. BERMEJO, V. MERINO, M. D.MARCOS, F.SANCENON, M. GONZALEZ-ALVAREZ a R. MARTINEZ-MAÑEZ. New Insights of Oral Colonic Drug Delivery Systems for Inflammatory Bowel Disease Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(18), s. 1 - 30. ISSN 1422 - 0067.
6. SHAHIWALA, A. Cyclodextrin conjugates for colon drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020, **55**, ISSN 1773 - 2247.
7. PATEL, A., N. BHATT, Dr.K.R.PATEL, Dr.N.M.PATEL, Dr.M.E.PATEL, Shree.B.M.SHAH. Colon Targeted Drug Delivery System: A Review System. *Journal of Pharmaceutical Science & Bioscientific Research*. 2011, **01**(1), s. 37-49. ISSN 2277 - 3681.
8. NAEEM, M., U. Azeem AWAN, F. SUBHAN, et al. Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. *Archives of Pharmacal Research*. 2020, **43**(1), s. 153-169. ISSN 0253 - 6269.

- 
9. LEE, S. H., R. BAJRACHARYA, J. Y. MIN, J.-W. HAN, B. J. PARK a H.-K. HAN. Strategic Approaches for Colon Targeted Drug Delivery: An Overview of Recent Advancements. *Pharmaceutics*. 2020, **12**(1). ISSN 1999 - 4923.
10. VRANÍKOVÁ, B., A. FRANC, J. GAJDZIOK a D. VETCHÝ. Biorelevantní disoluční media simulující podmínky trávicího traktu. *Chemické listy*, 2016, **110**(2), s. 126-132. ISSN 1213 - 7103.
11. HUA, S., E. MARKS, J. J. SCHNEIDER a S. KEELY. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015, **11**(5), s. 1117-1132. ISSN 1549 - 9634.
12. MINAMI, K., F. HIRAYAMA a K. UEKAMA. Colon-Specific Drug Delivery Based on a Cyclodextrin Prodrug: Release Behavior of Biphenylacetic Acid from Its Cyclodextrin Conjugates in Rat Intestinal Tracts after Oral Administration. *Journal of Pharmaceutical Science*. 1998, **87**(6), s. 715-720. ISSN 0022 - 3549.
13. VAN DEN MOOTER, G.. Colon drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2005, **03**(1), s. 111-125. ISSN 1742 - 5247.
14. NG, Y. M., S. N. A. MAT YUSUF, H. I. CHIU a V. LIM. Redox-Sensitive Linear and Cross-Linked Cystamine-Based Polymers for Colon-Targeted Drug Delivery: Design, Synthesis, and Characterisation. *Pharmaceutics*. 2020, **12**(5). ISSN 1999 - 4923.
15. WEBER, S. a E. SCHLEICHER (Ed.). *Flavins and Flavoproteins - Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 2014, 1146. New York, Humana Press, 468 s., ISBN 978-1-4939-0452-5. EDWARDS, A. M. Structure and General Properties of Flavins. s. 3-13.
16. KROGARS, K., J. HEINÄMÄKI, J. VESALAHTI, M. MARVOLA, O. ANTIKAINEN aj. YLIRUUSI. Extrusion–spheronization of pH-sensitive polymeric matrix pellets for possible colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000, **199**(2), s. 187-194. ISSN 0378 - 5173.

- 
17. ASGHAR, L. F. A., Ch. B. CHURE a S. CHANDRAN. Colon Specific Delivery of Indomethacin: Effect of Incorporating pH Sensitive Polymers in Xanthan Gum Matrix Bases. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2009, **10**(2), s. 418-429. ISSN 1530 - 9932.
18. RUBINSTEIN, A., D. NAKAR a A. SINTOV. Colonic Drug Delivery: Enhanced Release of Indomethacin from Cross-Linked Chondroitin Matrix in Rat Caecal Content. *Pharmaceutical Research*. 1992, **09**(2), s. 276-278. ISSN 0724 - 8741.
19. GRAHAM, N.B. a M.E. MCNEILL. Hydrogels for controlled drug delivery. *Biomaterials*. 1984, **05**(1), s. 27-36. ISSN 0142 - 9612.
20. BRONDSTED, H. a J.KOPECEK. Hydrogels for site-specific oral drug delivery: synthesis and characterization. *Biomaterials*. 1991, **12**(6), s. 584-592. ISSN 0142 - 9612.
21. YOO, J.-W., M. NAEEM, M. CHOI, et al. Colon-targeted delivery of budesonide using dual pH- and time-dependent polymeric nanoparticles for colitis therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015, **9**, s. 3789–3799. ISSN 1177 - 8881.
- 22 ARÉVALO-PÉREZ, R., C. MADERUELO a J.M. LANA O. Recent advances in colon drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2020, **327**, s. 703-724. ISSN 0168 - 3659.
23. GUO, Y., S. ZONG, Y. PU, B. XU, T. ZHANG a B. WANG. Advances in Pharmaceutical Strategies Enhancing the Efficiencies of Oral Colon-Targeted Delivery Systems in Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*. 2018, **23**(7). ISSN 1420 - 3049.
24. AMIT, A., D.K.TRIPATHI, T. VERMA, et al. Mechanism responsible for mucoadhesion of mucoadhesive drug delivery system: a review. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2011, **02**(1), s. 434-445. ISSN 0976 - 4550.
25. RHUSHIKESH, S. a S. SURESH. A review on mucoadhesive drug delivery system. *International Journal of Research and Analytical Reviews*. 2020, **7**(1), s. 793-808. ISSN 2349 – 5138.

- 
26. RATHEE, P., M. JAIN, A. GARG, A. NANDA a A. HOODA. Gastrointestinal mucoadhesive drug delivery systém. A review. *Journal of Pharmaceutical Research*. 2011, **04(5)**, s. 1488-1453. ISSN 2574 - 7797.
27. MANSURI, S., P. KESHARWANI, K. JAIN, R. K. TEKADE a N.K. JAIN. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*. 2016, **100**, s. 151-172. ISSN 1381 - 5148.
28. CHUAH, L. H., N. BILLA, C. J. ROBERTS, J. C. BURLEY a S. MANICKAM. Curcumin-containing chitosan nanoparticles as a potential mucoadhesive delivery system to the colon. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2011, **18(3)**, s. 591-599. ISSN 1083 - 7450.
29. THAKRAL, N., A. R. RAY, D. B. SHALOM, A. H. ERIKSSON a D. MAJUMDAR. The quest for targeted delivery in colon cancer: mucoadhesive valdecoxib microspheres. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, **6**, s. 1057 – 1068. ISSN 1178 - 2013.
30. MALAEKEH-NIKOUEI, B., S. A. SAJADI TABASSI a M. R. JAAFARI. Preparation, Characterization, and Mucoadhesive Properties of Chitosan-Coated Microspheres Encapsulated with Cyclosporine A. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, **34(5)**, s. 492-498. ISSN 0363 - 9045.
31. GAWDE, P., S. AGRAWAL a P. JAIN. Development of mucoadhesive microsphere for colon delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2012, **3(3)**, s. 440-442. ISSN 1530 - 9932.
32. ANANDE, N. M., S. K. JAIN a N. K. JAIN. Con-A conjugated mucoadhesive microspheres for the colonic delivery of diloxanide furoate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, **359(1-2)**, s. 182-189. ISSN 0378 - 5173.

- 
33. BAI, J.P.F., L.L. CHANG a J.H. GUO. Effects of Polyacrylic Polymers on the Luminal Proteolysis of Peptide Drugs in the Colon. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1995, **84**(11), s. 1291-1294. ISSN 0022 - 3549.
34. LU, M., H. XING, J. JIANG, X. CHEN, T. YANG, D. WANG a P. DING. Liquisolid technique and its applications in pharmaceuticals. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, **12**(2), s. 115-123. ISSN 1818 - 0876.
35. VRANÍKOVÁ, B., J. GAJDZIOK, D. VETCHÝ, B. KRATOCHVÍL a L. SEILEROVÁ. Systémy kapalina v pevné fázi jako moderní trend zvyšování biologické dostupnosti léčiva. *Chemické listy*, 2013, **107**(9), s. 681 - 687. ISSN 1213 - 7103.
36. ELKHODAIRY, K. A., H. A. ELSAGHIR a A. M. AL-SUBAYIEL. Formulation of Indomethacin Colon Targeted Delivery Systems Using Polysaccharides as Carriers by Applying Liquisolid Technique. *BioMed Research International*. 2014, **2014**, s. 1 – 17. ISSN 2314 - 6133.
37. XIONG, S., B. YU, J. WU, H. LI a R.J. LEE. Preparation, therapeutic efficacy and intratumoral localization of targeted daunorubicin liposomes conjugating folate-PEG-CHEMS. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2011, **65**(1), s. 2-8. ISSN 0753 - 3322.
38. ESTELRICH, J., E.ESCRIBANO, J. QUERALT a M. BUSQUETS. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, **16**(12), s. 8070-8101. ISSN 1422 - 0067.
39. GRIFANTINI, R., M. TARANTA, L. GHERARDINI, et al. Magnetically driven drug delivery systems improving targeted immunotherapy for colon-rectal cancer. *Journal of Controlled Release*. 2018, **280**, s. 76-86. ISSN 0168 - 3659.
40. SARANGI, M. K., M. E. B. RAO a V. PARCHA. Smart polymers for colon targeted drug delivery systems: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2020, **70**, s. 1-37. ISSN 0091 - 4037.

- 
41. PANDEY, M., H. CHOUDHURY, J. L. Ch. FERN, et al. 3D printing for oral drug delivery: a new tool to customize drug delivery. *Drug Delivery and Translational Research*. 2020, **10**(4), s. 986-1001. ISSN 2190 - 393X.
42. GOYANES, A., H.CHANG, D. SEDOUGH, G. B. HATTON, J.WANG, A.BUANZ, S.GAISFORD a A. W. BASIT. Fabrication of controlled-release budesonide tablets via desktop (FDM) 3D printing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, **496**(2), s. 414-420. ISSN 0378 - 5173.
43. SCHÄFER-KORTING, M. (Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology, Drug Delivery. 2010, 197. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 501 s., ISBN 978-3-642-00477-3. HOMBACH, J. a A. BERNKOP-SCHNÜRCH. Mucoadhesive Drug Delivery Systems, s. 251-266.
44. KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromolecular Bioscience*. 2011, **11**(6), s. 748-764. ISSN 1616 - 5187.
45. SINGH R., S. DEEPAK a G.R. Review on Mucoadhesive Drug Delivery System with Special Emphasis on Buccal Route: An Important Tool in Designing of Novel Controlled Drug Delivery System for the Effective Delivery of Pharmaceuticals. *Journal of Developing Drugs*. 2017, **06**(1). ISSN 2329 - 6631.
46. DODOU, D., P. BREEDVELD a P. A. WIERINGA. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, **60**(1), s. 1-16. ISSN 0939 - 6411.
47. BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Mucoadhesive systems in oral drug delivery. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2005, **02**(1), s. 83-87. ISSN 1740 - 6749.
48. KUMAR, A., P. K. NAIK, D.PRADHAN, G. GHOSH a G.RATH. Mucoadhesive formulations: innovations, merits, drawbacks, and future outlook. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2020, **25**(7), s. 797-814. ISSN 1083 - 7450.



- 
49. CARVALHO, F. Ch., M. L. BRUSCHI, R. C. EVANGELISTA a M. P. D. GREMIÃO. Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, **46**(1), s. 1-17. ISSN 1984-8250.
50. SANTOS, C.A, J.S. JACOB, B.A. HERTZOG, B.D. FREEDMAN, D.L PRESS, P. HARNPICHARNCHAI a E. MATHIOWITZ. Correlation of two bioadhesion assays: the everted sac technique and the CAHN microbalance. *Journal of Controlled Release*. 1999, **61**(1- 2), s. 113-122. ISSN 0168 - 3659.
51. WOERTZ, Ch., M.PREIS, J. BREITKREUTZ a P. KLEINEBUDDE. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, **85**(3), s. 843-853. ISSN 0939 - 6411.
52. GRABOVAC, V, D. GUGKI a A. BERNKOPSCHNURCH. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, **57**(11), s. 1713-1723. ISSN 0169 - 409X.
53. MIKOS, A. G. a N.A. PEPPAS. Bioadhesive analysis of controlled-release systems. IV. An experimental method for testing the adhesion of microparticles with mucus. *Journal of Controlled Release*. 1990, **12**(1), s. 31-37. ISSN 0168 - 3659.
54. KANTIBHAI, P. T., K. S. PATEL; S. SHAH. Test methods of bioadhesive system. *World Journal Pharmaceutical Research*. 2018, **07**(2), s. 267-278. ISSN 2277 - 7105.
55. RAO, K.V.R. a P. BURI. A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989, **52**(3), s. 265-270. ISSN 0378 - 5173.
56. SANTOS, C.A, J.S JACOB, B.A HERTZOG, B.D FREEDMAN, D.L PRESS, P. HARNPICHARNCHAI a E. MATHIOWITZ. Correlation of two bioadhesion assays: the everted sac technique and the CAHN microbalance. *Journal of Controlled Release*. 1999, **61**(1- 2), s. 113-122. ISSN 0168 - 3659.

- 
57. CHOWDARY, K.P.R. a Y. SRINIVASA RAO. Mucoadhesive Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2004, **27**(11), s. 1717-1724. ISSN 0918-6158.
58. VENKATESH, D.N., R. RAJESHKUMAR a R.N.A. HUY. Formulation Development and In Vitro Evaluation of Buccal Tablets of Ramipril. *Materials Science Forum*. 2020, **987**, s. 83-87. ISSN 1662 - 9752.
59. DYVIK K., C. GRAFFNER. Investigation of the applicability of a tensile testing machine for measuring mucoadhesive strength. *Acta Pharmaceutica Nordica*. 1992, **04**(2), s. 79-84. ISSN 1100 - 1801.
60. PECHOVÁ, V., J. GAJDZIOK a D. VETCHÝ. Texturní analýza jako moderní přístup hodnocení lékových forem a zdravotnických prostředků. *Chemické listy*. 2017, **111**(10), s. 622-627. ISSN 1213 - 7103.
61. RAO, M. a A. ZOPE. Formulation and evaluation of mucoadhesive clotrimazole vaginal tablet using liquisolid technology. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019, **09**(4-A), s. 477-485. ISSN 2250 - 1177.
62. VARUM, F. J.O., F.VEIGA, J. S. SOUSA a A. W. BASIT. Mucoadhesive platforms for targeted delivery to the colon. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **420**(1), s. 11-19. ISSN 0378 - 5173.
63. CT3-Texture-Analyzer. *Brookfieldengineering*, 2021.  
<https://www.brookfieldengineering.com/products/texture-analyzers/ct3-texture-analyzer>
64. TA.XTPlus-Texture-Analyzer. *Texturetechnologies*, 2021.  
<https://texturetechnologies.com/texture-analyzers/ta-xtplus-texture-analyzer>
65. SMART, J. D., I. W. KELLAWAY a H. E. C. WORTHINGTON. An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1984, **36**(5), s. 295-299. ISSN 0022 - 3573.

- 
66. METIA, P. K., & BANDYOPADHYAY, A. K. In Vitro Evaluation of Novel Mucoadhesive Buccal Tablet of Oxytocin Prepared with Diospyros Peregrina Fruits Mucilages. *Yakugaku Zasshi (Journal of The Pharmaceutical Society of Japan)*. 2008, **128**(4), s. 603–609. ISSN 1347 - 5231.
67. HASSAN, E. E. a J.M. GALLO. A Simple Rheological Method for the *in Vitro* Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength. *Pharmaceutical Research*. 1990, **07**(5), s. 491-495. ISSN 0724 - 8741.
68. CALLENS, C., J. CEULEMANS, A. LUDWIG, P. FOREMAN a J.P. REMON. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003, **55**(3), s. 323-328. ISSN 0939 - 6411.
69. TAKEUCHI, H., J. THONGBORISUTE, Y. MATSUI, H. SUGIHARA, H. YAMAMOTO a Y. KAWASHIMA. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, **57**(11), s. 1583-1594. ISSN 0169 - 409X.
70. HÄGERSTRÖM, H., K.EDSMAN a M.STRØMME. Low-Frequency Dielectric Spectroscopy as a Tool for Studying the Compatibility between Pharmaceutical Gels and Mucous Tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003, **92**(9), s. 1869-1881. ISSN 0022 - 3549.
71. MALMSTEN, M. a B. LINDMAN. Ellipsometry studies of the adsorption of cellulose ethers. *Langmuir*. 1990, **06**(2), s. 357-364. ISSN 0743 - 7463.
72. PARK, K. A new approach to study mucoadhesion: colloidal gold staining. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989, **53**(3), s. 209-217. ISSN 0378 - 5173.
73. SÄKKINEN, M., J.MARVOLA, H. KANERVA, K.LINDEVALL, A. AHONEN a M.MARVOLA. Are chitosan formulations mucoadhesive in the human small intestine? *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, **307**(2), s. 285-291. ISSN 0378 - 5173.

---

74. ARBÓS, P, M.A. ARANGO, M.A. CAMPANERO a J.M. IRACHE. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, **242**(1-2), s. 129-136. ISSN 0378 - 5173.

75. IBEKWE, V. C., F.LIU, H.M. FADDA, M. K. KHELA, D. F. EVANS, G.E. PARSONS a A.W. BASIT. An Investigation into the In Vivo Performance Variability of pH Responsive Polymers for Ileo-Colonic Drug Delivery Using Gamma Scintigraphy in Humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, **95**(12), s. 2760-2766. ISSN 0022 - 3549.

76. RAJPUT, G. C., F.D. MAJMUDAR, J.K.PATEL, K.N.PATEL, R.S.THAKOR, B.P.PATEL a R. NB. Stomach specific mucoadhesive tablets as controlled drug delivery system—A review work. *International Journal of Pharmacy and Bio-Pharma Research*. 2010, **01**(1), s. 30-41. ISSN 2287 - 6898.

77. VRANÍKOVÁ, B., A.FRANC, J. GAJDZIOK a D. VETCHÝ. Biorelevantní disoluční media simulující podmínky trávicího traktu. *Chemické listy*, 2016, **110**(2), s. 126-132. ISSN 1213 - 7103.

78. Non-Newtonian models. *SimScale*, 26.11. 2020.

<https://www.simscale.com/docs/simulation-setup/materials/non-newtonian-models/#non-newtonian-models>

79. Dissolution Accessories, *Labindia-analytical*, 2021.

<https://www.labindia-analytical.com/product/analytical-products/dissolution-tester/dissolution-accessories>

80. NOKHODCHI, A., S.RAJA, P. PATEL, K. ASARE-ADDO. The Role of Oral Controlled Release Matrix Tablets in Drug Delivery Systems. *BioImpacts*, 2021, **2**(4), s. 175 – 187. ISSN 2228 – 5660.

81. LI, C.L, L. G MARTINI, J. L FORD a M. ROBERTS. The use of hypromellose in oral drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005, **57**(5), s. 533-546. ISSN 0022 - 3573.

---

82. ABRAHAMSSON, B., A.PAL, M. SJÖBERG, M. CARLSSON, E. LAURELL a J. G. BRASSEUR. A Novel in Vitro and Numerical Analysis of Shear-Induced Drug Release from Extended-Release Tablets in the Fed Stomach. *Pharmaceutical Research*. 2005, **22**(8), s. 1215-1226. ISSN 0724-8741.

83. Toolkit\_V005 Shear Rate Ramp / Alternative Flow curve. *rSPACE software Kinexus*.  
[www.malvernpanalytical.com](http://www.malvernpanalytical.com)

84. A Basic Introduction to Rheology. *Malvern*, 2016.  
<https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>

85. MUDGIL, D., S. BARAK a B. S. KHATKAR. Guar gum: processing, properties and food applications—A Review. *Journal of Food Science and Technology*. 2014, **51**(3), s. 409-418. ISSN 0022 - 1155.

86. KOZU, H., I. KOBAYASHI, M. NAKAJIMA, K. UEMURA, S. SATO a S. ICHIKAWA. Analysis of Flow Phenomena in Gastric Contents Induced by Human Gastric Peristalsis Using CFD. *Food Biophysics*. 2010, **5**(4), s. 330-336. ISSN 1557 - 1858.

87. Using Methocel cellulose ethers for controlled release of drugs in hydrophilic matrix systems. *Colorcon*, 22.4.2021.  
[https://www.colorcon.com/products-formulation/all-products/polymers-controlled-release/hydrophilic-matrix-tablets/methocel-cr/item/2063-using-methocel-cellulose-ethers-for-controlled-release-of-drugs-in-hydrophilic-matrix-systems\\_2063](https://www.colorcon.com/products-formulation/all-products/polymers-controlled-release/hydrophilic-matrix-tablets/methocel-cr/item/2063-using-methocel-cellulose-ethers-for-controlled-release-of-drugs-in-hydrophilic-matrix-systems_2063)

88. CHEONG, L. W. S., P.W. S. HENG a L. F. WONG. Relationship Between Polymer Viscosity and Drug Release from a Matrix System. *Pharmaceutical Research*. 1992, **09**(11), s. 1510-1514. ISSN 0724 - 8741.

89. SRIVASTAVA, P., R. MALVIYA, S. GUPTA a P. K. SHARMA. Evaluation of Various Natural Gums as Release Modifiers in Tablet Formulations. *Pharmacognosy Journal*. 2010, **2**(13), s. 525-529. ISSN 0975 - 3575.

---

90. VARSHOSAZ, J., N. TAVAKOLI a F. KHEIROLAHI. Use of hydrophilic natural gums in formulation of sustained-release matrix tablets of tramadol hydrochloride. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2006, **7**(1), s. E168 - E174. ISSN 1530 - 9932.

91. MAAD, A. H., M. E.-H. ALI SHAYOUB, E. I. ELNIMA, Z. OSMAN a F. F. MAGBOOL. Formulation and evaluation of colon targeted matrix tablets containing extract of solenostemma argel (hargel). *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. 2019, **4**(4), s. 35-40. ISSN 2456 - 8058.

92. VUEBA, M.L., L.A.E. BATISTA DE CARVALHO, F. VEIGA, J.J. SOUSA a M.E. PINA. Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004, **58**(1), s. 51-59. ISSN 0939 - 6411.

93. SRIVASTAVA, A. K., S. WADHWA, D. RIDHURKAR a B. MISHRA. Oral Sustained Delivery of Atenolol from Floating Matrix Tablets—Formulation and In Vitro Evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, **31**(4-5), s. 367-374. ISSN 0363 - 9045.

94. DALVADI, H. P, J. K. PATEL, G. C. RAJPUT, V. MURUGANANTHAM a B. JAYAKAR. Development and characterization of controlled release mucoadhesive tablets of captopril to increase the residence time in the gastrointestinal tract. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2011, **30**(2), s. 266-72. ISSN 2362 - 3853.

95. MUGHAL, M. A., Z.IQBAL a S. H. NEAU. Guar Gum, Xanthan Gum, and HPMC Can Define Release Mechanisms and Sustain Release of Propranolol Hydrochloride. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2011, **12**(1), s. 77-87. ISSN 1530 - 9932.

96. TRITT-GOC, J. a J. KOWALCZUK. Spatially resolved solvent interaction with glassy HPMC polymers studied by magnetic resonance microscopy. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2005, **28**(2-4), s. 250-257. ISSN 0926 - 2040.

- 
97. KRISHNAIAH, Y.S.R, V. SATYANARAYANA, B. DINESH KUMAR a R.S KARTHIKEYAN. In vitro drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, **16**(3), s. 185-192. ISSN 0928 - 0987.
98. NEP, E.I., B.R.CONWAY. Polysaccharide gum matrix tablets for oral controlled delivery of Cimetidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*. 2010, **2**(11), s. 708-716. ISSN 0975 - 8232.
99. HUANG, X. a Ch.S BRAZEL. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2001, **73**(2-3), s. 121-136. ISSN 0168 - 3659.
100. KHULLAR, P., R. K. KHAR a S. P. AGARWAL. Evaluation of Guar Gum in the Preparation of Sustained-Release Matrix Tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, **24**(11), s. 1095-1099. ISSN 0363 - 9045.