

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**LIBERACE ACIKLOVIRU Z PLASTIFIKOVANÝCH
OLIGOESTERŮ**

Diplomová práce

Hradec Králové 2008

Lucie Hlavsová

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 řádně citovány.

Také bych chtěla velice poděkovat mojí školitelce Pharm.Dr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za vřelý přístup, cenné rady a odborné vedení při vypracování diplomové práce.

Lucie Hlavsová

Obsah:

1. ÚVOD.....	5
2. SEZNAM ZKRATEK	6
3. CÍL PRÁCE.....	7
4. TEORETICKÁ ČÁST	8
4.1. BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	8
4.1.1. <i>Chemické, biologické a fyzikální vlastnosti PLA a PGA</i>	<i>8</i>
4.1.2. <i>Chemické, biologické a fyzikální vlastnosti PLGA</i>	<i>9</i>
4.2. BIODEGRADACE	10
4.2.1. <i>Biodegradace PLA a PGA</i>	<i>10</i>
4.2.2. <i>Biodegradace PLGA</i>	<i>11</i>
4.3. FYZIKÁLNĚ-MECHANICKÉ VLASTNOSTI PLA A PLGA FILMU	12
4.3.1. <i>Vlastnosti PLA filmu</i>	<i>12</i>
4.3.2. <i>Vlastnosti PLGA filmu</i>	<i>17</i>
4.4. STEREOKOMPLEXY POLYMERŮ	21
4.4.1. <i>D- a L- PLA stereokomplexy.....</i>	<i>21</i>
4.4.2. <i>Degradace stereokomplexů.....</i>	<i>22</i>
4.5. HERPETICKÉ VIRY	23
4.5.1. <i>Struktura viru.....</i>	<i>23</i>
4.5.2. <i>Přenos infekce.....</i>	<i>23</i>
4.5.3. <i>Biologická klasifikace virů.....</i>	<i>23</i>
4.6. HERPES SIMPLEX VIRUS	24
4.6.1. <i>Primární infekce</i>	<i>24</i>
4.6.2. <i>Latentní infekce a reaktivace</i>	<i>24</i>
4.7. ACIKLOVIR	25
4.7.1. <i>Rezistence.....</i>	<i>26</i>
4.8. DALŠÍ VIROSTATIKA POUŽÍVANÁ K LÉČBĚ HERPETICKÝCH INFEKČÍ.....	27
4.8.1. <i>Valaciklovir.....</i>	<i>27</i>
4.8.2. <i>Famciklovir.....</i>	<i>27</i>
4.8.3. <i>Penciklovir.....</i>	<i>28</i>
4.8.4. <i>Léčení labiálního herpes homeopaticky</i>	<i>28</i>

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
5.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	30
5.2. POUŽITÉ SUROVINY.....	30
5.3. CHARAKTERISTIKA NOSIČŮ.....	31
5.4. PRACOVNÍ POSTUP.....	32
5.4.1. Příprava liberačního média.....	32
5.4.2. Příprava matric.....	32
5.4.3. Disoluční test.....	33
5.1.1. Kalibrační přímka.....	33
5.1.2. Stanovení uvolněného acikloviru.....	34
6. VÝSLEDKY	35
6.1. TABULKY.....	35
6.2. GRAFY.....	50
7. DISKUZE	60
7.1. VLIV TYPU NOSIČE NA LIBERACI ACIKLOVIRU.....	61
7.2. VLIV PLASTIFIKÁTORU NA LIBERACI ACIKLOVIRU.....	63
8. ZÁVĚRY	67
9. SOUHRN	68
10. LITERATURA	69

1. Úvod

Objevem biodegradabilních polymerů se otevřely nové možnosti nejen v oblasti průmyslu ale také v oborech jako jsou medicína a farmacie.

Nejprve se výzkum zabýval především přírodními polymery jako jsou např. celulóza, škrob nebo želatina. Později se však pozornost obrátila směrem k synteticky vyráběným polymerům, jejichž velkou výhodou je možnost prakticky libovolně měnit jejich vlastnosti. Mezi nejlépe popsané a prostudované syntetické polymery patří skupina polyesterů, především kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová a jejich kopolymery.

V oblasti medicíny se biodegradabilní polymery využívají zejména jako vstřebatelné chirurgické šicí materiály, implantáty tvrdých i měkkých tkání, fixace fraktur, atd.. Ve farmaceutické technologii mají tyto polymery také široké uplatnění. Jsou důležitou součástí lékových forem s řízeným uvolňováním. Díky těmto léčivým přípravkům můžeme dosáhnout efektivnější terapie, ať už pozitivním ovlivněním distribuce nebo biologické dostupnosti léčiva, tak i zlepšením compliance pacienta.

Biodegradabilní polymery pro přípravu léčivých přípravků musí splňovat především požadavky na toxicitu a biokompatibilitu. Jsou využity v různých formách jako např. implantáty, filmy, pelety, mikročástice a nanočástice, které jsou součástí léčivých přípravků s řízeným uvolňováním. Výběr polymeru pro konkrétní léčivý přípravek se řídí zejména našimi požadavky na rychlost a délku uvolňování léčiva, na místo, kde má být léčivo uvolněno, a dalšími faktory, které příznivě ovlivňují terapii. Proto, abychom mohli zvolit správný polymer a zajistit tak optimální terapii, je nutné znát vlastnosti a chování polymerů za různých podmínek, které simulují vnitřní prostředí organismu. Tyto vlastnosti polymerů lze také dále modifikovat použitím vhodných plastifikátorů. Nalezení vhodného polymeru s optimálními vlastnostmi pro daný léčivý přípravek však není jednoduché.

2. Seznam zkratek

ACV.....	aciklovir
ATBC.....	acetyltributylcitrát
D.....	dipentaerythritol
D,L-LA.....	kyselina mléčná složená z racemické směsi izomerů
D,L-PLA.....	kyselina polymléčné složená z racemické směsi izomerů
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
EP.....	ethylpyruvát
HSV-1.....	herpes simplex virus typ 1
HSV-2.....	herpes simplex virus typ 2
L-PLA.....	kyselina polymléčné složená z L izomerů
M.....	mannitol
M_w	hmotnostní průměr molárních hmotností
PGA.....	kyselina polyglykolová
PLA.....	kyselina polymléčná
PLA-free.....	film kyseliny polymléčné bez obsahu plastifikátoru
PLA-TEC.....	kyselina polymléčná plastifikovaná triethylcitrátem
PLA-ATBC.....	kyselina polymléčná plastifikovaná acetyltributylcitrátem
PLGA.....	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PLGA-free.....	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové bez plastifikátoru
PLGA-TEC.....	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové plastifikovaný triethylcitrátem
PLGA-ATBC.....	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové plastifikovaný acetyltributylcitrátem
TEC.....	triethylcitrát
T_g	teplota skelného přechodu
T_m	teplota tání

3. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zjistit průběh liberace acikloviru z plastifikovaných oligoesterových nosičů. Testované nosiče byly pracovně označeny 3M, 5M, 8M, 3D, 5D a 8D. Jedná se o terpolymery kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a mannitolu resp. dipentaerythritolu (LA/GA/M (D)). Charakterizaci nosičů uvádí tabulka č.3. Nosiče byly plastifikovány 30% triethylcitrátu nebo 20% ethylpyruvátu.

Úkol diplomové práce lze rozdělit do následujících dílčích kroků:

1. Připravit matrice o hmotnosti 150,0 mg složené z nosiče, plastifikátoru a 4% acikloviru.
2. Provést modifikovaný disoluční test za statických podmínek při 37°C a použití fosfát citrátového pufru pH 6,0.
3. Porovnat liberaci acikloviru z nosičů větvených různou koncentrací mannitolu a dipentaerythritolu.
4. Porovnat liberaci acikloviru z nosičů plastifikovaných triethylcitrátem a ethylpyruvátem.

4. Teoretická část

4.1. Biodegradabilní polymery

Biodegradabilní polymery mají široké uplatnění jak ve farmaceutické technologii (implantáty, filmy, pelety, mikročástice a nanočástice sloužící k řízenému uvolňování léčiv), tak i v medicíně (chirurgický materiál, tkáňové náhrady, fixace fraktur, atd.). Jsou používány polymery přírodního původu i synteticky připravené. V těle jsou oba druhy polymerů enzymaticky či neenzymaticky odbourávány za vzniku netoxických meziproduktů, které jsou nakonec z těla odstraňovány běžnými metabolickými cestami.(1)

Nejdříve se výzkum zabýval především přírodními polymery a jejich deriváty jako jsou např. hovězí a lidský albumin, fibrinogen, kasein, hemoglobin, kolagen, želatina, chitosan, algináty, pektin, deriváty celulosy, atd. Jejich velkou nevýhodou je vysoká cena, nestandardní složení a těžko dosažitelná potřebná čistota.(2) Dnes se pozornost soustřeďuje na polymery syntetické jako jsou např. polyamidy, polyaminokyseliny, poly-alfa-kyanoakryláty, polyestery, polyuretany, polyakrylamidy, atd.. Důvodem je fakt, že u polymerů syntetického původu můžeme téměř libovolně měnit jejich vlastnosti tak, aby vyhovovaly konkrétním požadavkům. Můžeme tak ovlivnit např. dobu degradace polymeru, místo uvolnění léčiva z polymerního nosiče či množství léčiva, které se má uvolnit.

Již od 70. let minulého století se jako velice perspektivní jeví polyestery tvořené kyselinou mléčnou (PLA), kyselinou glykolovou (PGA) a kopolymery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PGLA). Jedná se o termoplastické, alifatické polyestery, které se vyznačují výbornou biokompatibilitou, biodegradací a mechanickou pevností.(3)

4.1.1. Chemické, biologické a fyzikální vlastnosti PLA a PGA

PLA se díky přítomnosti chirálního uhlíku vyskytuje ve více stereoizomerních formách. Existují L, D a DL izomery. L-PLA je tvořena z L(-)-laktidu, D-PLA z D(+)-laktidu a DL-PLA z D,L-laktidu, který je racemickou směsí L(-) a D(+) izomeru. Prakticky se využívají především L-PLA; D,L-PLA a jejich kopolymery.

L-PLA je semikrystalický, biodegradabilní polymer s teplotou tání (T_m) okolo 175°C a teplotou skelného přechodu (T_g) přibližně 65°C.(4) Krystalinita L-PLA je

přibližně 35%.(5) Polymer je rozpustný ve většině organických rozpouštědel. S PGA má srovnatelnou pevnost, ale o mnoho nižší modul elasticity.

DL-PLA je amorfni polymer s teplotou skelného přechodu okolo 57°C.(4) Má velmi malou pevnost i modul elasticity. Ve srovnání s PGA je PLA hydrolyticky stabilnější. Stabilita je však závislá na typu PLA, molekulové hmotnosti, stupni krystalinity, geometrii polymerního řetězce a fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí. Amorfni PLA je odbourávána rychleji než semikrystalická L-PLA.

PGA je krystalický polymer s teplotou tání okolo 225°C a teplotou skelného přechodu okolo 35°C. V molekule stavební jednotky PGA se nachází methylenová skupina a relativně polární esterová skupina. Ve srovnání s jinými biodegradabilními polymery je PGA vysoce krystalický polymer s krystalinitou v rozmezí 35%-75%. Polymer je rozpustný ve většině organických rozpouštědel, má vysokou pevnost a modul elasticity. Degradace PGA je založena na hydrolyze esterové vazby a závisí na molekulové hmotnosti, stupni krystalinity, fyzikální geometrii a fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí.(6)

4.1.2. Chemické, biologické a fyzikální vlastnosti PLGA

Fyzikální, chemické a biologické vlastnosti PLGA závisí především na molekulové hmotnosti a poměru PLA a PGA v molekule kopolymeru. PLA je více hydrofóbní, a proto kopolymer s vyšším obsahem PLA je méně hydrofilní, absorbuje méně vody a je tudíž pomaleji rozkládán.(2) V tomto případě trvá biologický rozklad až 5 let. Pro použití kopolymerů jako nosičů léčiv je také velice důležitá zvolená molekulová hmotnost a stupeň polydisperzity. Jsou to faktory, které určují mechanickou pevnost (7), rychlost biodegradace a hydrolyzy.(1) Další důležitou charakteristikou je teplota skelného přechodu. Platí, že se zvyšuje v závislosti na vzrůstajícím podílu PLA v kopolymeru a na zvyšující se molekulové hmotnosti.(8) Výsledný stupeň krystalinity PLGA závisí na složení kopolymeru. Pokud je připraven z L-PLA a PGA vznikne krystalický kopolymer, zatímco kombinací D,L-PLA a PGA vzniká amorfni kopolymer.(7)

4.2. Biodegradace

Albertsson a Karlsson definovali biodegradaci jako proces, při kterém dochází k enzymatickému a/nebo k chemickému rozkladu působením živého organismu nebo produkty jeho sekrece.(9) Přesné vymezení pojmu degradabilní polymer nebylo zprvu jednoduché, neboť i u nedegradabilních polymerů dochází k pozvolnému rozpadu. Za degradabilní polymery se proto považují ty, které se rozloží v průběhu jeho použití, anebo jen krátce poté. Za nedegradabilní ty, které se rozkládají dlouho poté, co splnily svůj úkol.

Jak již bylo zmíněno, jsou známy dvě hlavní cesty rozkladu polymerů v lidském těle. První z nich je zprostředkována enzymatickým systémem. Zde se enzymy aktivně váží na vazebná místa a následně polymer štěpí. Takto se odbourávají např. polysacharidy, polypeptidy a další polymery, které mají ve své molekule vazebné místo pro enzym. Druhou možností je pasivní jednoduchá chemická hydrolýza nestabilních vazeb v polymerech. Při hydrolýze obecně dochází k penetraci vody do polymeru. Ta přednostně atakuje amorfní části matrice, kde štěpí řetězce polymeru na menší fragmenty. Dochází tak sice k redukci hmotnosti matrice, avšak některé mechanické vlastnosti zůstávají zachovány do doby, než dojde k degradaci i krystalické části. Tento typ degradace se nazývá *objemová eroze*. Druhý typ, při kterém dochází ke zmenšování tělesa při současném zachování jeho integrity, je označován jako *eroze povrchová*. Hydrolytickou degradaci v lidském těle ovlivňuje spousta parametrů jako je např. molekulová hmotnost, chemická struktura, velikost matrice, typ vazby, prostupnost pro vodu, místo implantace, pH, teplota.(10)

4.2.1. Biodegradace PLA a PGA

Degradace polymerů PLA a PGA probíhá v pěti fázích, které neprobíhají odděleně, ale překrývají se. (11)

První fáze začíná ihned po vložení matrice do těla. Dochází k hydrataci systému tím, že matrice absorbuje tekutinu z okolního prostředí. Tento proces může trvat v závislosti na hmotnosti matrice a velikosti jejího povrchu dny až měsíce. Hydratace polymerů kyseliny mléčné a glykolové a též jejich kopolymerů je možná jen díky jejich hydrofilním vlastnostem. Hydratace amorfní části probíhá rychleji než části krystalické.

Při druhé fázi sledujeme depolymerizaci a chemické štěpení hlavních řetězců polymerů. Následkem je redukce jak průměrné molekulové hmotnosti, tak počtu kovalentních vazeb, dochází i ke změně fyzikálních vlastností polymeru.

Při třetí fázi se polymer rozpadá na fragmenty s nízkou molekulovou hmotností. Fyzikální vlastnosti jsou již výrazně jiné.

Během čtvrté fáze jsou tyto fragmenty dále štěpeny. Dostatečně malé fragmenty jsou poté pohlcovány fagocyty nebo jsou rozloženy na monomerní anionty, které jsou rozpustné v intracelulární tekutině.

Konečnou fází degradace je eliminace monomerů. L-laktát vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselin (citrátový cyklus). Zde je metabolizován až na vodu a CO₂. Glykolát je buď vyloučen v nezměněné formě ledvinami, nebo také vstupuje do citrátového cyklu, kde je přeměněn na vodu a CO₂.

Proces hydrolyzy může být ovlivněn kyselinami nebo zásadami, teplotou a stupněm vlhkosti. V kyselém prostředí probíhá hydrolyza především mechanismem objemové eroze. Rychlost eroze je v kyselém a neutrálním prostředí přibližně stejná, avšak vyšší než v alkalickém. Chemická hydrolyza v prostředí pufru probíhá u PLA mnohem pomaleji než u PGA. Je to způsobeno přítomností methylových skupin v molekule kyseliny mléčné, které mají hydrofóbní charakter.(12)

4.2.2. Biodegradace PLGA

Kopolymery PLGA v těle podléhají hydrolytické degradaci, při které dochází k náhodnému štěpení esterových vazeb v řetězci.(13) Tento proces závisí na faktorech jako jsou např. molekulární hmotnost, molekulární poměr PLA a PGA v řetězci kopolymeru, stupeň krystalinity a teplota skelného přechodu.(1)

Biodegradace PLGA kopolymerů probíhá ve třech fázích.(14) V první fázi dochází k náhodnému štěpení esterových vazeb v řetězcích. S tím souvisí pokles molekulové hmotnosti. Nedochází však k úbytku hmotnosti a tvorbě monomerů.

V druhé fázi se již projevuje i snížení hmotnosti matrice a jsou ve větší míře tvořeny rozpustné oligomerní a monomerní částice.

Ve třetí fázi vznikají z oligomerních částic monomery a dochází k úplné degradaci matrice. Jednotlivé monomery PLA a PGA jsou poté eliminovány. L-laktát vstupuje do citrátového cyklu. Zde je metabolizován na vodu a CO₂. Glykolát je buď vyloučen v nezměněné formě ledvinami, nebo také vstupuje do citrátového cyklu, kde je přeměněn na vodu a CO₂.(11)

4.3. Fyzikálně-mechanické vlastnosti PLA a PLGA filmu

Roku 2000 byla zveřejněna studie Kranze, Ulricha, Maincenta a Bogmeiera (15), která zkoumá fyzikálně-mechanické vlastnosti biodegradabilního polymeru kyseliny mléčné a jejího kopolymeru s kyselinou glykolovou.

Pro experiment byly vybrány polymery PLA o M_w 270 300 a kopolymer PLGA o M_w 56 500 v poměru PLA a PGA 1:1. Dále byly použity plastifikátory. Triethylcitrát (TEC) jako model plastifikátoru, který je ve vodě rozpustný a acetyltributylcitrát (ATBC) jako model plastifikátoru, který je ve vodě nerozpustný. Zkoumal se jejich vliv na fyzikálně-mechanické vlastnosti polymerů a na uvolňování léčiv z nosičů.

Vlastnosti polymerů byly zkoumány jednak v suchém stavu a dále pak po ponoření do média. V tomto případě byl použit fosfátový pufr o pH 7,4 a teplotě 37°C z důvodu velké podobnosti s prostředím v lidském těle. Délka experimentu byla 28 dní.

Při pokusu byla měřena maximální síla potřebná pro destrukci filmů, prodloužení filmů v procentech, teplota skelného přechodu a molekulová hmotnost jednotlivých filmů.

4.3.1. Vlastnosti PLA filmu

U matric s 10 % obsahem plastifikátoru došlo ke značnému vzrůstu flexibility PLA filmu. U samotného PLA filmu bez plastifikátoru (PLA-free) bylo zjištěno prodloužení 50,3%, u PLA filmu s ATBC to bylo již 181,3% a u PLA filmu s TEC dokonce 230,9%. (Obr.č.1). Na destrukci PLA-free filmu byla potřeba vyšší síla než u plastifikovaných filmů (Obr.č.2).

Po ponoření do fosfátového pufru o pH 7,4 a teplotě 37°C obě měřené veličiny klesají v pořadí PLA-TEC > PLA-ATBC > PLA-free. Mechanické vlastnosti PLA-free filmu se po odstranění média téměř neměnily.

Vysvětlení chování testovaných filmů v průběhu pokusu a výsledků vychází z faktu, že mechanické vlastnosti amorfních biodegradabilních polymerů PLA velice závisí na teplotě skelného přechodu (T_g). (16) Ve studii bylo sice použito jen 10% plastifikátoru, ale i takto nízký obsah plastifikátoru vedl u filmů v suchém stavu ke značnému snížení T_g . U PLA-free filmu byla změřena T_g 43,5°C, u PLA-TEC 18,5°C a u PLA-ATBC 30°C. (Obr.č.3) To znamená, že při teplotě 37°C je PLA-free film pod hodnotou T_g , tedy ve stavu sklovitém. Plastifikované filmy jsou nad T_g , tedy ve stavu kaučukovitém. Proto mají plastifikované filmy vyšší relativní prodloužení a nižší hodnotu destrukční síly.

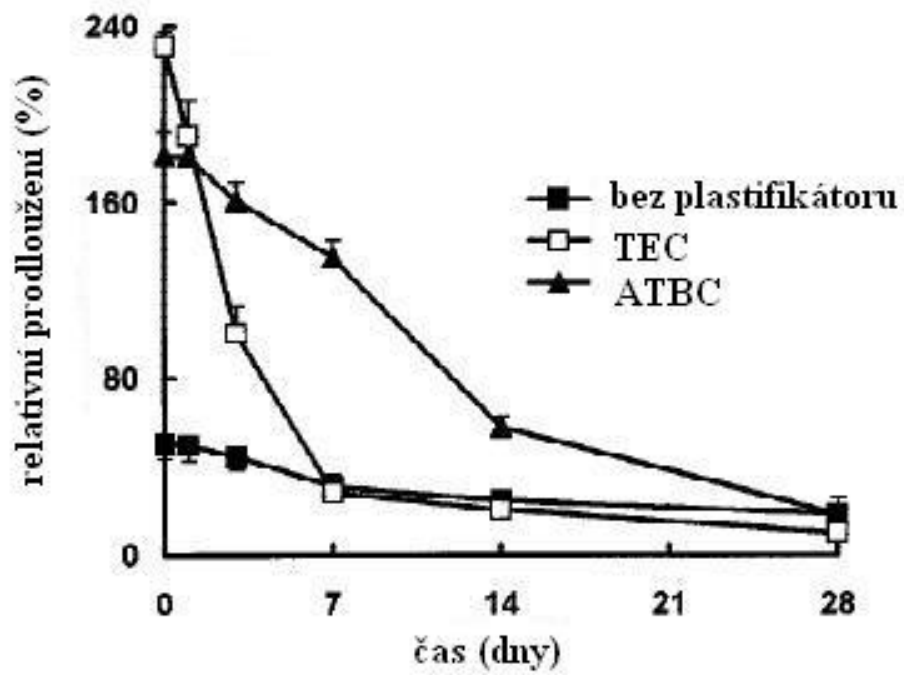
Pokud srovnáme vliv TEC a ATBC, TEC více snižuje T_g u PLA filmu, což vysvětluje větší relativní prodloužení a nižší destrukční sílu u PLA-TEC filmu.

Po ponoření matric do pufru o teplotě 37°C a pH 7,4 je T_g u PLA-free a PLA-ATBC filmu konstantní. Je to způsobeno stálým složením těchto filmů. ATBC je ve vodě nerozpustný plastifikátor, zůstává proto ve filmu. Naproti tomu ve vodě rozpustný TEC je z filmu vymýván. T_g PLA-TEC filmu stoupá s dobou setrvání v pufru a postupně se přibližuje T_g PLA-free filmu. (Obr.č.3) Vymýváním TEC lze vysvětlit i prudký pokles hodnoty relativního prodloužení. (Obr.č.1)

Ve studii se dále zkoumal vliv molekulové hmotnosti polymerů a různých plastifikátorů na rychlost degradace. Po ponoření matric do média dochází k hydrolytické degradaci. Ukázalo se, že rychlost degradace je u plastifikovaných filmů vyšší než u neplastifikovaných (Obr.č.4).

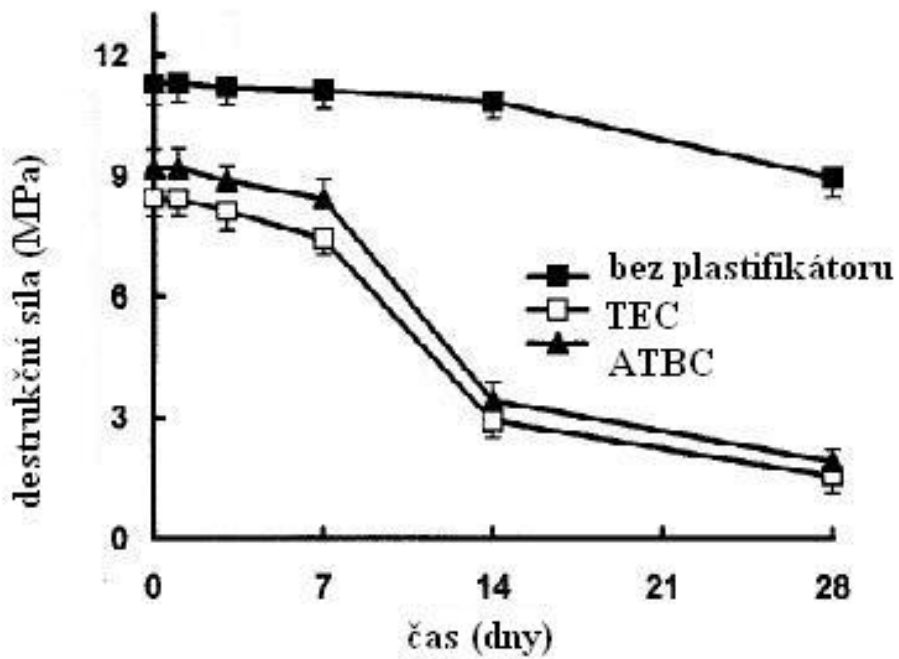
Koeficient difúze ve vodě rozpustných oligomerů výrazně vzrůstá, pokud je teplota média vyšší než T_g PLA filmu. Proto v médiu o teplotě 60°C (teplota vyšší než T_g PLA) dochází k rychlé degradaci matrice. Pokud je však teplota média pouze 37°C (teplota nižší než T_g PLA), degradace je pomalejší. U plastifikovaných filmů je díky příměsi plastifikátoru snížena hodnota T_g . Plastifikovaný film má proto po ponoření do média o teplotě 37°C vyšší koeficient difúze, tudíž je rychleji degradován. V případě PLA-ATBC filmu je degradace rychlejší než u PLA-TEC filmu. Tento fakt je možné vysvětlit vyplavováním TEC z matrice, což vede k zvýšení T_g PLA a snížení koeficientu difúze. Proto je PLA-TEC film degradován pomaleji. S rychlostí degradace souvisí i eroze matrice. (Obr.č.5)

Obr.č.1 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na relativní prodloužení PLA filmu (15)

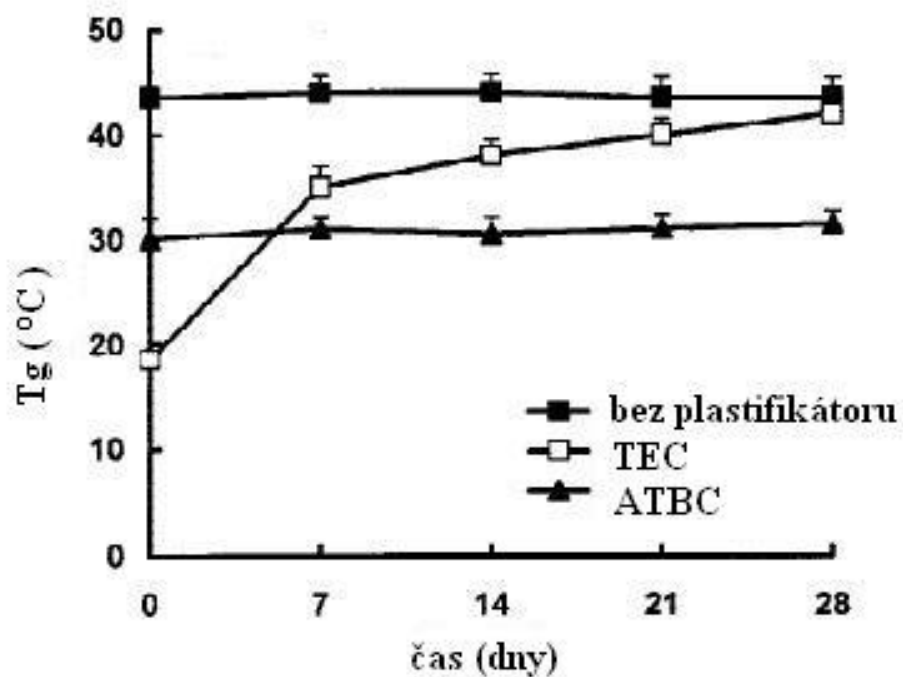


Obr.č. 2 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na hodnotu destrukční síly u PLA filmu

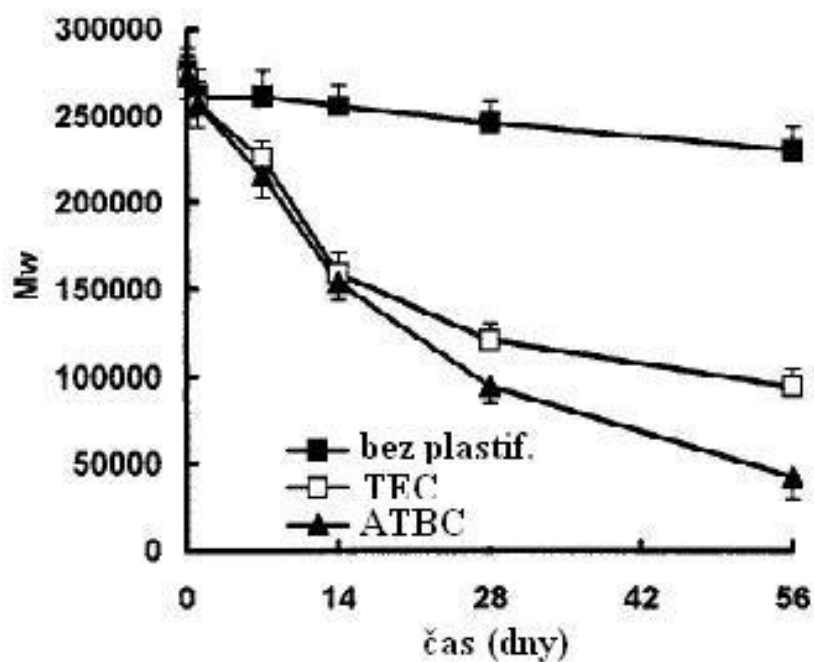
(15)



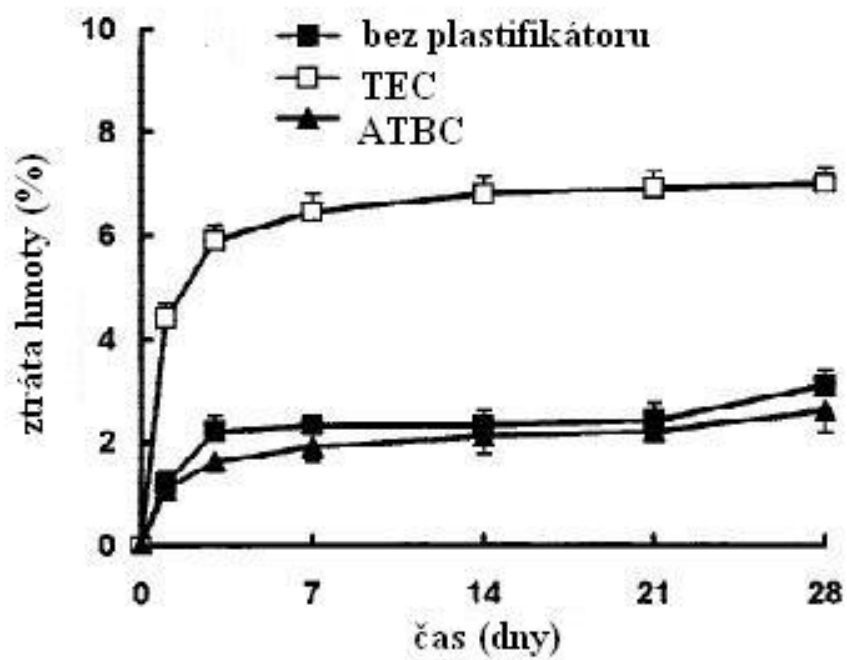
Obr.č. 3 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na T_g u PLA filmu (15)



Obr.č. 4 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na M_w PLA filmu (15)



Obr.č. 5 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na erozi PLA filmu (15)



4.3.2. Vlastnosti PLGA filmu

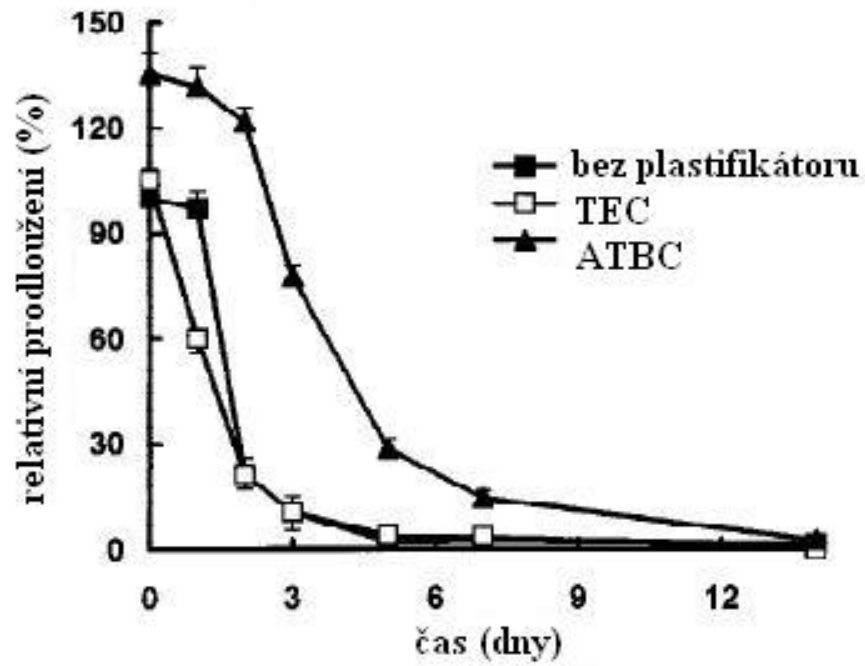
Ve studii byly dále použity matrice z hydrofilnějšího kopolymeru PLGA o M_w 56 500, které byly zkoumány za stejných podmínek jako matrice tvořené PLA .

Při studiu mechanických vlastností a T_g u jednotlivých matric tvořených z PLGA byly výsledky obdobné jako u PLA filmů. Zřetelný rozdíl byl však pozorován v rychlosti degradace a erose. V suchém stavu bylo u PLGA-free filmu změřeno větší relativní prodloužení a nižší destrukční síla než u PLA-free filmu.

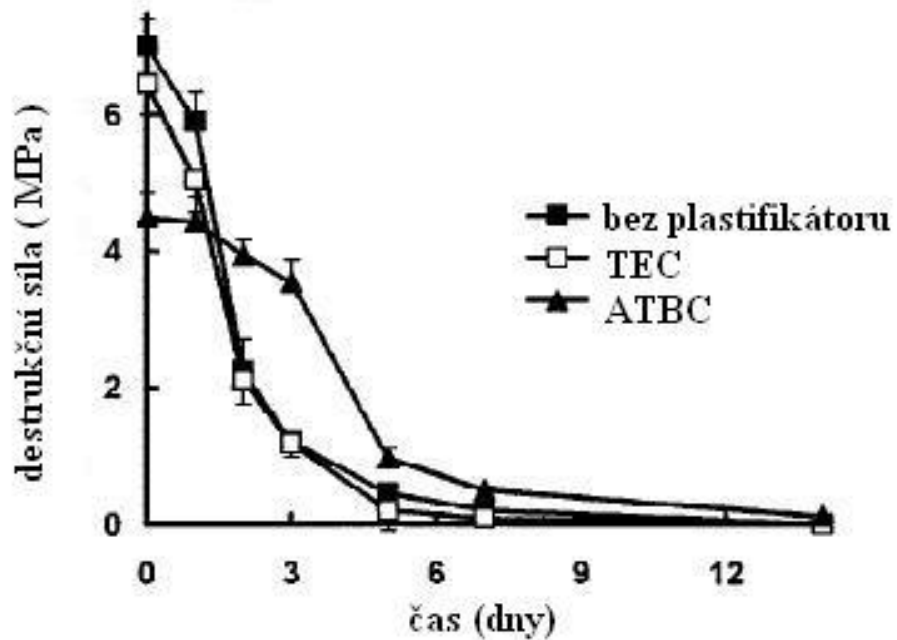
Vliv plastifikátorů na mechanické vlastnosti PLGA filmu jak v suchém tak i v zbobtnalém stavu byl méně zřetelný než u PLA filmů. Studie prokázala, že PLGA filmy ztrácejí mechanickou pevnost rychleji. Po 14 dnech v pufru o pH 7,4 a teplotě 37°C nelze již změřit mechanické vlastnosti ani u PLGA-free, ani u plastifikovaných filmů.(Obr.č.6,7) Menší vliv plastifikátorů na mechanické vlastnosti PLGA filmu ve srovnání s PLA filmy může být vysvětlen odlišnou T_g u obou polymerů. Hodnota T_g u PLA-free je 43,5°C, ale u PLGA-free je 34,0°C. Proto při 37°C je PLA-free film pod T_g , tedy ve sklovitém stavu, zatím co PLGA-free je nad svojí T_g , tedy v kaučukovitém stavu. Různá hodnota T_g u PLA-free a PLGA-free filmu je dána jejich odlišnou molekulovou hmotností a uspořádáním monomerů v polymeru. T_g obecně roste s rostoucí M_w a s obsahem laktátu v polymeru.(16),(17) Vliv plastifikátorů je u PLGA obdobný jako u PLA filmu. U PLGA-TEC filmu hodnota T_g po ponoření do pufru postupně roste a přibližuje se hodnotě T_g pro PLGA-free film. Tento efekt je způsoben vymýváním TEC . (Obr.č.8)

Molekulová hmotnost PLGA filmu během 28 dní v pufru rapidně klesá. (Obr.č.9) S úbytkem M_w souvisí i ztráta hmotnosti matrice. (Obr.č.10) Mezi PLGA-free a plastifikovanými filmy byly pozorovány jen malé rozdíly. PLGA-free film je však degradován rychleji než PLA-free film. Důvodem je menší M_w PLGA filmu a jen 50% obsah laktátu v polymeru.

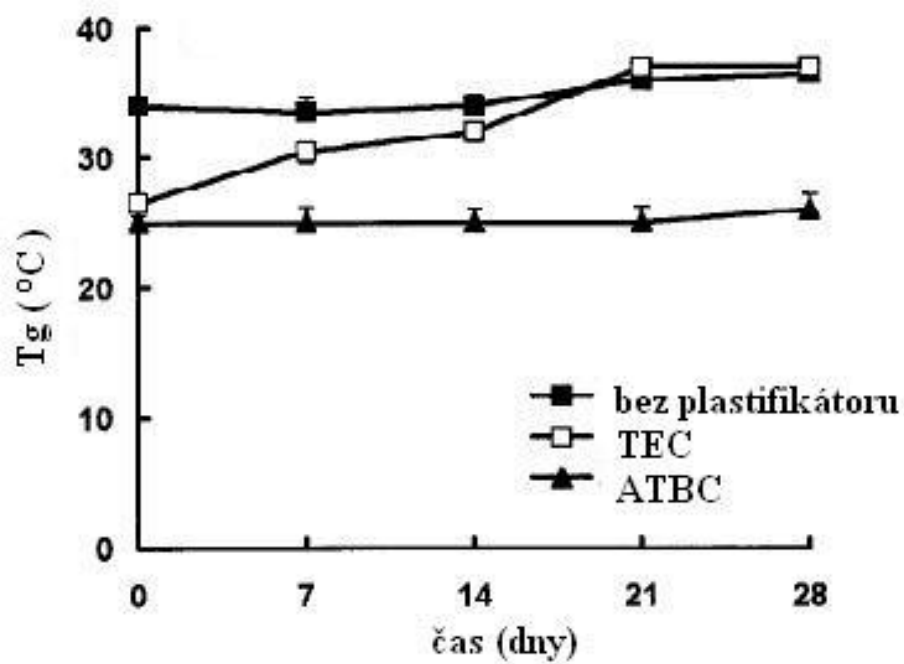
Obr.č.6 :Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na relativní prodloužení PLGA filmu (15)



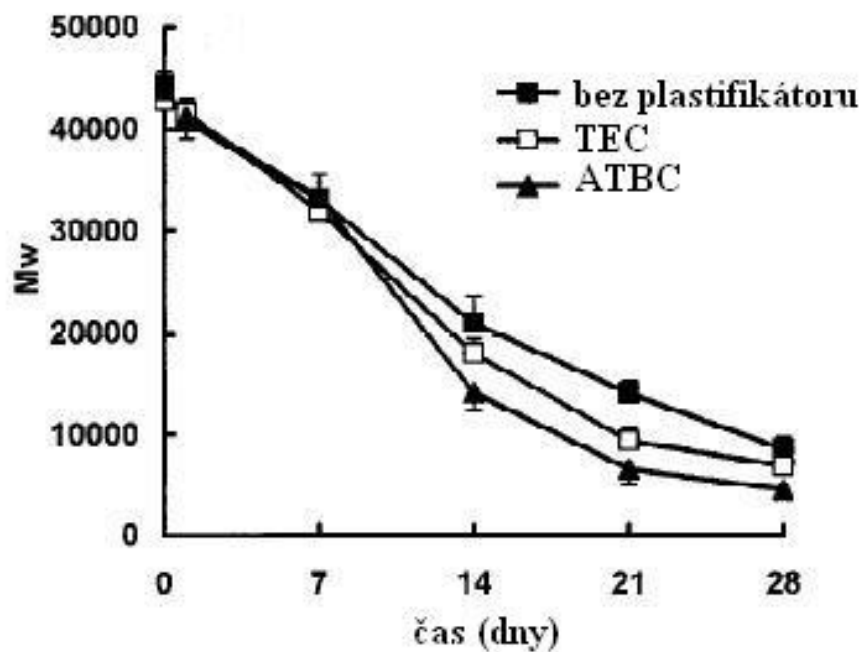
Obr.č.7 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na hodnotu destrukční síly u PLGA filmu (15)



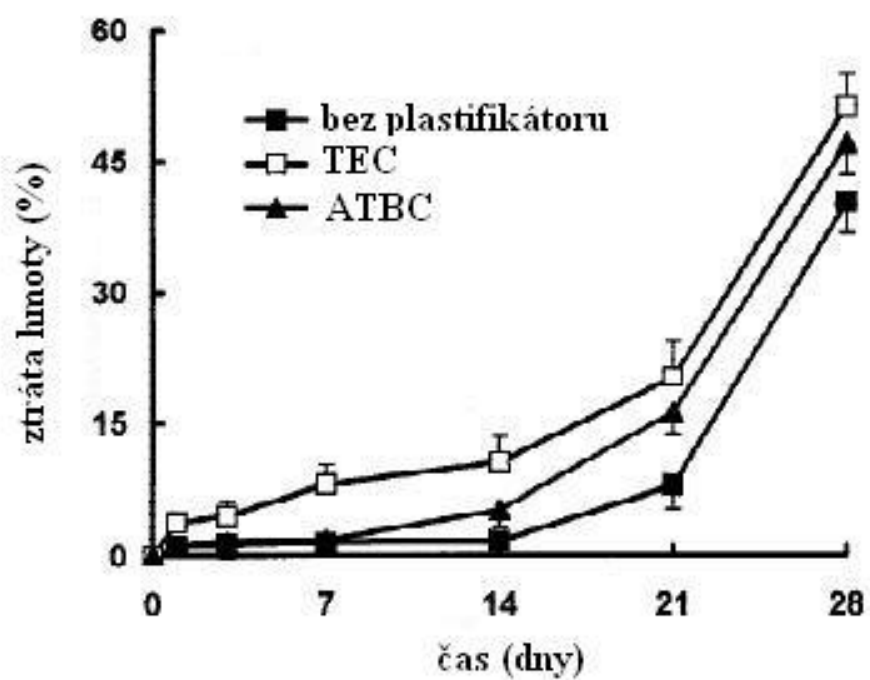
Obr.č. 8 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na T_g u PLGA filmu (15)



Obr.č. 9 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na M_w PLGA filmu (15)



Obr.č. 10 : Vliv 10% koncentrace plastifikátoru na erozi PLGA filmu (15)



4.4. Stereokomplexy polymerů

Stereokomplexy polymerů jsou definovány jako interakce mezi dvěma komplementárními stereoizomerními polymery, které do sebe zapadají a mohou tak vytvořit novou sloučeninu. Takto vzniklý nový polymer má jiné fyzikální vlastnosti než výchozí molekuly. Komplementární dvojice molekul mohou být např. dva opačné enantiomery, nebo dvojice isotaktických-syndiotaktických řetězců polymerů, nebo dvojice různých polymerů jako např. polyester-polyamid s opačnou stereoizomerií.(18)

Mezi řetězci makromolekul můžeme sledovat několik druhů interakcí. Vznik komplexu polykationt-DNA je podmíněn hlavně elektrostatickými silami.(19,20) Coulombovy síly spolu s vodíkovými můstky jsou hlavním důvodem konformace trojitě šroubovice kolagenu.(21) Polymery karboxylových kyselin tvoří komplexy s polyethery a dalšími sloučeninami, které přijímají vodík, za vzniku vodíkových můstků.(22) Do této kategorie patří i dobře známá dvojšroubovice DNA. Zde vodíkové můstky vznikají mezi páry komplementárních bazí. Některé komplexy vznikají díky působení hydrofóbních nebo van der Waalsových sil. Tyto síly se uplatňují např. u komplexu isotaktického a syndiotaktického polymethylmetakrylátu nebo u homostereokomplexů tvořených např. D a L – mléčnou kyselinou.(23) Mnoho stereokomplexů se skládá z enantiomerních polymerů. Ne všechny opticky aktivní řetězce jsou však schopny tyto stereokomplexy tvořit, mezi ně patří např. poly- β -hydroxybutyrát (PHB) nebo poly- β -hydroxyvalerát (PHV).(24) Stereokomplexy mají jiné fyzikálně-chemické vlastnosti než původní molekuly. Většina komplexů je nerozpustná v rozpouštědlech, ve kterých se rozpouští mateřské molekuly a mají vyšší teplotu tání.(25)

4.4.1. D- a L- PLA stereokomplexy

PLA homostereokomplex se skládá z poly-D-mléčné a poly-L-mléčné kyseliny v poměru 1:1. Teplota tání tohoto komplexu je 230°C, což je o 56°C více než u jednoduchého polymeru kyseliny mléčné. Je nerozpustný v rozpouštědlech, ve kterých se PLA běžně rozpouští. Komplex je možno připravit při laboratorní teplotě z roztoku obou enantiomerů v chloroformu. Nejprve vzniká gel, který se po 30 dnech mění v precipitát. Aby mohl vzniknout vysokomolekulární komplex polymléčné kyseliny, musíme nechat reakci běžet celý rok. Když se poměr L- a D-PLA přiblíží 1:1, jsou komplexy tvořeny rychleji a je dosaženo větší molekulové hmotnosti.(26) Další možností, jak získat stereokomplexy kyseliny polymléčné, je precipitace D- a L-PLA

v roztoku dichlormethanu, chloroformu nebo dioxinu pomocí srážedla jako je methanol nebo ether. Při použití roztoku polymeru o velké molekulové hmotnosti a o koncentraci větší než 1% však nedochází ke kompletní tvorbě komplexů.(27)

Pro tvorbu komplexů je také důležitá optická čistota a stereoselektivita výchozích polymerů. Z opticky čistších pak vznikají homostereokomplexy. S optickou čistotou souvisí i teplota tání a krystalinita. S rostoucí optickou čistotou rostou i tyto dvě veličiny.

4.4.2. Degradace stereokomplexů

Degradace stereokomplexů PLA probíhá ve dvou fázích. V první fázi dochází k hydrolýze amorfni části, v druhé k rozpadu krystalických segmentů. Degradace může být ovlivněna mnoha faktory, jako jsou např. molekulová hmotnost a konfigurace komplexu, chemické a fyzikální podmínky.(28) Při degradaci rozeznáváme dva typy eroze: povrchovou a objemovou. Povrchová eroze byla pozorována u L-PLA polymeru po jeho ponoření do zředěného roztoku alkálie o pH 12. Objemová eroze byla popsána např. u PLA stereokomplexů a L-PLA při hydrolýze po vložení polymeru do roztoku fosfátového pufru. Hydrolýza homostereokomplexů ve fosfátovém pufru pH 7,4 a při teplotě 37°C trvala 30 dní. Úbytek hmotnosti byl ve srovnání s hydrolýzou L- nebo D-PLA při stejných podmínkách pomalejší. (29)

4.5. Herpetické viry (30),(31)

Viry tohoto druhu způsobují infekce u mnoha živočišných druhů včetně člověka. Průběh onemocnění způsobený těmito viry je různý, od nekomplikovaných infekcí rtu vyvolaných virem herpes simplex, až po různé klinické stavy, které ve svém důsledku vedou k rozvoji závažného onemocnění nebo až smrti člověka.

4.5.1. Struktura viru

Herpetické viry patří ke strukturálně nejsložitějším virům. Jejich virion se skládá ze 4 částí. Genom je tvořen velkou molekulou dvojitou DNA, která se nachází uvnitř virionu v tzv. elektrodenzní dřeni. Ta je obklopena kapsidou, na jejímž povrchu nalezneme amorfni bílkovinou hmotu označovanou jako tegument. Celý virion je obklopený lipidovým obalem, ze kterého vyčnívají glykoproteinové výrůstky.

4.5.2. Přenos infekce

Herpetické infekce se šíří především vzdušnou cestou ve formě kapének, přímým kontaktem kůže nebo sliznic a také pohlavním stykem. Virus se nachází v různých tělních tekutinách např. ve slinách, v krvi nebo ve spermatu. K nákaze může proto také dojít i kontaminovanou krví nebo krevními produkty a při transplantaci orgánů.

4.5.3. Biologická klasifikace virů

Herpesviry členíme do 3 skupin : α , β a γ herpesviry.

Tabulka č.1: Klasifikace herpesvirů

α herpesviry	β herpesviry	γ herpesviry
HSV-1(herpes simplex)	CMV(cytomegalovirus)	EBV(Epstein-Barrové)
HSV-2	HHV-6(human herpes)	HHV-8
VZV (varicella zoster)	HHV-7	

Viry typu α se rychle množí a v neuronech je nacházíme i v latentní formě, β viry se replikují pomalu a u γ virů dochází k jejich množení i v lymfoblastoidních buňkách. Obecně jsou herpesviry relativně termolabilní a v tukových rozpouštědlech dochází k jejich inaktivaci.

4.6. Herpes simplex virus (30),(32)

Jak již vyplývá z předchozí tabulky, tento typ viru řadíme do skupiny α herpesvirů. Rozlišujeme dva druhy herpes simplex virů (HSV): HSV-1 a HSV-2. Kmeny HSV-1 způsobují infekce v ústech, oku a centrálním nervovém systému, zatímco HSV-2 se nejčastěji manifestuje v oblasti genitální. Průměrná inkubační doba u HSV-1 je zhruba 4 dny.

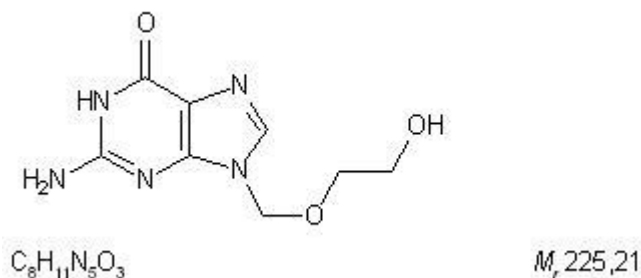
4.6.1. Primární infekce

Místem primárního poškození je sliznice úst, nosu, oka nebo genitálií. Dochází k tvorbě puchýřků a balonové degeneraci buněk v epitelu. Infekce vede k nekróze infikovaných buněk a k zánětlivé infiltraci postiženého místa. Na kůži tak vznikají puchýřky, které pak zasychají, tvoří se na nich strup a pak se zahojí. Na sliznici dochází k erozi a následně k vyhojení. Většina primárních infekcí vede k latentní persistenci virové DNA v sensorických gangliích, které inervují oblast primární infekce. Vir se množí v místě, kde pronikl do epitelu a během své replikace proniká do zakončení sensorických nervů a zřejmě jako nukleokapsida postupuje zpětným axonálním proudem podél axonu až do ganglia. Replikace viru v neuronu končí buď uhynutím buňky nebo se virus dostane do latentní fáze a buňka i s virovým genomem přežívá. Protilátky vzniklé při primární infekci nezabraňují vzniku nového onemocnění, pouze zmírňují jeho průběh. Jen výjimečně se primární infekce manifestuje v těžké formě např. jako život ohrožující encefalitida.

4.6.2. Latentní infekce a reaktivace

Při latentní fázi se DNA viru vyskytuje v gangliu jako volný kruhový epizom asi ve 20 kopiích na jednu buňku. V tomto stavu se nachází do doby než je reaktivována. Přesný proces reaktivace není dosud znám. Je pravděpodobné, že se DNA nějak opět dostává podél axonu k nervovému zakončení a zde pak dochází k infekci epitelových buněk. S největší pravděpodobností souvisí mechanismy reaktivace se vzestupem lokální hladiny prostaglandinů. Mezi podněty, které vyvolávají recidivu herpetické infekce, patří např. sluneční záření, horečka, stres, trauma, hormonální změny. Návrat infekce se klinicky projevuje místní bolestivostí, pálením, svěděním a pocitem tepla. Do 24 hodin se obvykle objeví exantém a pupeny, ze kterých dále vznikají puchýřky a ulcerace se strupem, které se za 8-12 hodin vyhojí.

4.7. Aciklovir



Obr. č.11 : Strukturní vzorec acikloviru (33)

Je prototypem specifického dobře snášeného virostatika. Patří mezi antimetabolity - nukleosidové analogy. Aciklovir je derivát guaninu, který má v molekule místo (deoxy)ribózy alifatický zbytek. Využívá se při léčbě infekcí, které jsou způsobené herpetickými viry herpes simplex nebo varicella-zoster. Proniká do všech buněk, avšak pouze v buňkách napadených virem je přeměněn na aktivní formu. Tato aktivace je možná pouze působením specifické thymidinkinázy, která je kódovaná herpetickým virem. Tento fakt je podstatou selektivity acikloviru. Thymidinkináza je nezbytná k připojení prvního fosfátového zbytku na aciklovir. Z acikloviru-monofosfátu pak v buňce dále vzniká působením buněčných kináz aciklovir-trifosfát. Jeho molekula je negativně nabitá, nemůže prostupovat buněčnou membránou ven, tudíž dochází ke kumulaci aciklovir-trifosfátu v buňce napadené herpetickým virem.(34)

Mechanismus účinku acikloviru spočívá v jeho interakci s virem kódovanou DNA-polymerázou. Dochází k její inhibici a po inkorporaci fosforylovaného acikloviru do virové DNA je syntéza přerušena. Syntéza dále nepokračuje, protože aciklovir neobsahuje 3'-OH skupinu (deoxy)ribózy, která je potřebná k napojení dalších nukleotidů.

Podávání acikloviru má velký terapeutický význam zvláště u těžkých infekcí, které jsou vyvolané viry herpes simplex (např. encefalitida, generalizovaná infekce) a viry varicella-zoster (např. těžký průběh pásového oparu). (35) V těchto případech se podává i.v. infúzí nebo injekčně 5-10 mg acikloviru na kg hmotnosti každých 8 hodin.(34)

Existují rovněž přípravky k perorálnímu podání. Ze střev se však aciklovir resorbuje neúplně, biologická dostupnost je 15-30 %. Aciklovir lze aplikovat i lokálně ve formě masti např. při léčbě oparu rtu.(3535)

Aciklovir je z 90 % vylučován ledvinami v nezměněném stavu. Poločas eliminace je přibližně 2,5 hodiny. Přestože je velice dobře snášen, mohou se u některých pacientů projevit nežádoucí účinky jako např. snížená funkce ledvin z důvodu tvorby krystalů acikloviru v ledvinových tubulech, poruchy nervového systému, alergické reakce, poškození tkání při paravenózním podání.(34) Stejně jako u většiny léčiv, dochází i u acikloviru k lékovým interakcím. Nejvýznamnější je interakce s aminofylinem a theofylinem. Dochází ke snížení jejich clearance, tudíž ke zvýšení jejich plazmatických koncentrací. S tím souvisí větší výskyt nežádoucích účinků. Přesný mechanismus této lékové interakce není znám.(36)

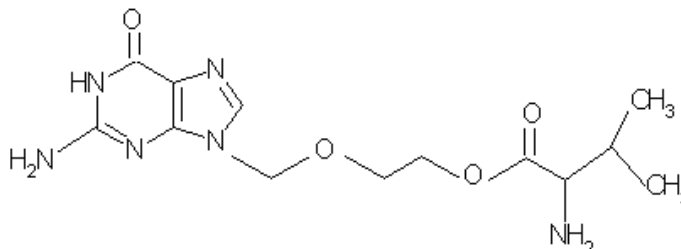
4.7.1. Rezistence

In vitro i in vivo byla pozorována rezistence virů herpes simplex a varicella-zoster na aciklovir. Příčinou je zřejmě mutace viru, kdy takto zmutovaný vir neobsahuje selektivní thymidinkinázu, která je nezbytná pro aktivaci molekuly. Dalším možným mechanismem rezistence je snížení selektivity virové DNA-polymerázy. Nedochozí už k přednostnímu zpracování aktivního acikloviru, a tak není bráněno množení virů. Třetí dosud známou možností je, že thymidinkináza je sice přítomná, ale má již jinou substrátovou specifitu. Vznik rezistence je velkým problémem zvláště u imunodeficitních pacientů s AIDS. Pokud dojde v důsledku mutace k nepřítomnosti thymidinkinázy, může docházet ke vzniku zkřížené rezistence. Vir je pak rezistentní nejen vůči acikloviru, ale také vůči dalším virostatikům jako jsou např. ganciklovir a idoxuridin.(37)

4.8. Další virostatika používaná k léčbě herpetických infekcí

Mezi léčiva, která působí na viry typu herpes simplex a varicella-zoster řadíme valaciklovir, famciklovir a penciklovir.(34),(35)

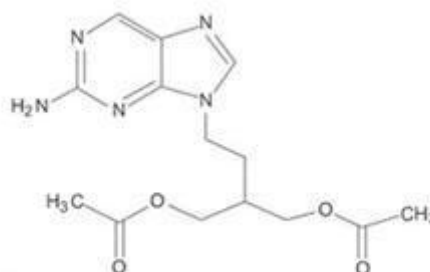
4.8.1. Valaciklovir



Obr.č. 12 : Strukturální vzorec valacikloviru (38)

Je to esterifikovaný aciklovir (L-valylester acikloviru). Po perorálním podání se ve srovnání s aciklovirem lépe vstřebává, jeho biologická dostupnost je až 50%. Při průchodu střevní stěnou a v játrech se z něj působením esteráz odštěpuje valinový zbytek a vzniká aciklovir.

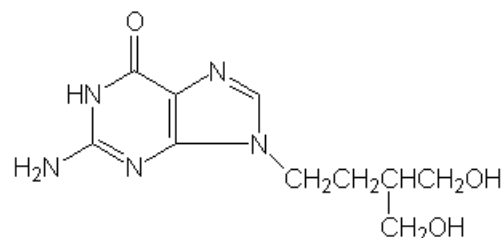
4.8.2. Famciklovir



Obr.č. 13 : Strukturální vzorec famcikloviru (39)

Je to prekurzor, který se při perorálním podání dobře resorbuje, jeho biologická dostupnost je až 80 %. V těle se přeměňuje na penciklovir, který sám o sobě není vhodný k perorálnímu podání, kdy je jeho biologická dostupnost jen 5%. Přeměna famcikloviru spočívá v odštěpení dvou acetátových zbytků z postranního řetězce a v oxidaci purinového kruhu na guanin.

4.8.3. Penciklovir



Obr.č. 14 : Strukturní vzorec pencikloviru (40)

Penciklovir se od acikloviru liší přítomností jiného postranního řetězce, farmakologicky ho však napodobuje. Aktivace i zde probíhá připojením první fosfátové skupiny působením specifické thymidinkinázy.

Tabulka č. 2: Virostatika používaná k léčbě herpetických infekcí (34)

Účinná látka	Chráněný název	Alternativy
ACIKLOVIR	ZOVIRAX®(R) tbl.,gtt.,ins.,ung.oph.	ACIKLOVIR®
		HERPESIN®
		HERPOTERN® (R) tbl.
		SUPRAVIRAN®(R)crm.,tbl.,inj.
		VIROLEX®(R)inj.sic.,crm.,ung.oph.
VALACIKLOVIR	VALTRESX® (R) tbl.	
FAMCIKLOVIR	FAMVIR® (R) tbl.	
PENCIKLOVIR	VECTAVIR® (R) crm.	

4.8.4. Léčení labiálního herpes homeopaticky

Určení homeopatického léku závisí na přesném popisu příznaků onemocnění. Proto pro léčbu labiálního oparu můžeme v závislosti na různém průběhu onemocnění použít i více druhů homeopatik.(41)

Rhus toxicodendron 9CH

Používá se v případě výskytu vezikulů s obsahem citrónově žluté průhledné tekutiny, které spočívají na velmi svědivé erytematózní spodině.

Mazereum 9CH

Je doporučován, pokud vezikuly opalescentního vzhledu obsahují hnis a později se začnou pokrývat krustami.

Apis mellifica 9CH

Doporučujeme u pacientů, kteří mají edém s pocitem pálení a bodání, který se lepší chladem. V případě recidivujícího herpesu je vhodné Vaccinotoxinum připravené z vakcíny proti neštovicím na základě principu podobnosti lézí. Podává se jedna dávka ve zředění 9CH na počátku výsevu herpetických vezikulů.

5. Experimentální část

5.1. Použité přístroje

Analytické digitální váhy AND HM – 202 (max.210g, d = 0,01 mg)

Biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha

Digitální potenciometr s pH metrem MV 870

Digitální váhy KERN 440 – 33 (max. 200g, d = 0,01g)

Digitální váhy KERN 440 – 47 (max. 1200g, d = 0,1g)

Digitální váhy KERN 440 – 53 (max. 6000g, d = 1g)

Horkovzdušná sušárna HS 61 A

Spektrofotometr HELIOS GAMA (UV/VIS), Unicam

5.2. Použité suroviny

Aciklovir, Pliva Lachema

Azid sodný, p.a. (Fluka)

Destilovaná voda (FaF UK Hradec Králové)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a. (Lachema Brno)

Ethylpyruvát, Fluka

Kyselina citrónová monohydrát, ČL 97 (Lachema Neratovice)

Oligoesterové nosiče (syntetizované na katedře farmaceutické technologie FaF UK)

Triethylcitrát, p.a. (Merk)

5.3. Charakteristika nosičů

Testované nosiče jsou kopolymery kyseliny mléčné a glykolové v poměru 1:1, které obsahují jako větvičí složku 3, 5 a 8 % mannitolu (3M, 5M, 8M) nebo dipentaerythriolu (3D, 5D, 8D).

Tabulkač.3: Charakteristika nosičů

OZNAČENÍ NOSIČE	SLOŽENÍ NOSIČE DLLA:GA:D(M)	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	M_w/M_n	T_g (°C)
3D	48,5 : 48,5 : 3	5300	3600	1,5	27,3
5D	47,5 : 47,5 : 5	2300	1900	1,2	16,3
8D	46,0 : 46,0 : 8	1700	1400	1,2	12,5
3M	48,5 : 48,5 : 3	3800	2600	1,5	23,5
5M	47,5 : 47,5 : 5	2200	1600	1,4	21,0
8M	46,0 : 46,0 : 8	1600	1400	1,1	19,2

M..... mannitol

D.....dipentaerythritol

DLLA.....racemická směs kyseliny mléčné

M_n číselný průměr molární hmotnosti

M_whmotnostní průměr molární hmotnosti

M_w/M_npolydisperzita

T_gteplota skelného přechodu

5.4. Pracovní postup

5.4.1. Příprava liberačního média

Jako liberační médium pro disoluci acikloviru z matric byl zvolen fosfát citrátový pufr o pH 6,0. Podle chemických tabulek (42) se 1000 ml pufru připraví smícháním x dílů roztoku A a $(100-x)$ dílů roztoku B. Pro dosažení pH 6,0 je potřeba 374 ml 0,1 M roztoku monohydrátu kyseliny citrónové a 626 ml 0,2 M dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného. Pro dosažení protimikrobní stability bylo do roztoku pufru přidáno 0,02% azidu sodného. Po důkladném rozpuštění všech složek byla hodnota pH zkontrolována digitálním pH metrem. Eventuální odchylky byly upraveny přidáním malého množství kyseliny citrónové či hydrogenfosforečnanu disodného.

5.4.2. Příprava matric

Byly připraveny matrice o hmotnosti 150,0 mg tvořené nosičem, aciklovirem (ACV) a plastifikované triethylcitrátem (TEC) nebo ethylpyruvátém (EP). Koncentrace ACV v matrici byla u všech vzorků 4%, což odpovídá hmotnosti 6 mg ACV v každé matrici. Všechny matrice byly plastifikovány 30% koncentrací TEC nebo 20% koncentrací EP. Matrice daného složení byly připraveny triplicitně.

Dále byly připraveny placebo matrice bez acikloviru, tvořené pouze nosičem plastifikovaným 20% EP. Placebo matrice byly připraveny duplicitně.

Do malé kádinky bylo naváženo asi 600 mg oligoesteru (dvojnásobné množství potřebné k přípravě 3 matric z důvodů ztrát) a roztaveno v horkovzdušné sušárně při teplotě do 80°C. Do roztaveného oligoesteru bylo přidáno vypočtené množství TEC nebo EP a důkladně z homogenizováno. Přidalo se léčivo a následovala opět důkladná homogenizace. Bylo odváženo 150,0 mg a umístěno do scintilační lahvičky.

5.4.3. Disoluční test

Matrice ve scintilačních lahvičkách byly zality 15,0 ml fosfát citrátového pufru pH 6,0 a vloženy do termostatu o teplotě 37°C. Ve stanovených časových intervalech byly odebírány vzorky disoluční tekutiny a měřena absorbance proti čistému pufru při 256 nm. Vzorky disoluční tekutiny byly odbírány v časových intervalech 3 hodiny, 6 hodin, 24 hodin, 48 hodin. Dále byly intervaly prodlouženy a vzorky byly odebírány každý třetí den, ke konci liberace se u některých vzorků intervaly ještě prodloužily. Disoluční test byl ukončen, pokud se z matric uvolnilo 100% acikloviru nebo ve dvou intervalech po sobě se množství uvolněného acikloviru nezvyšovalo.

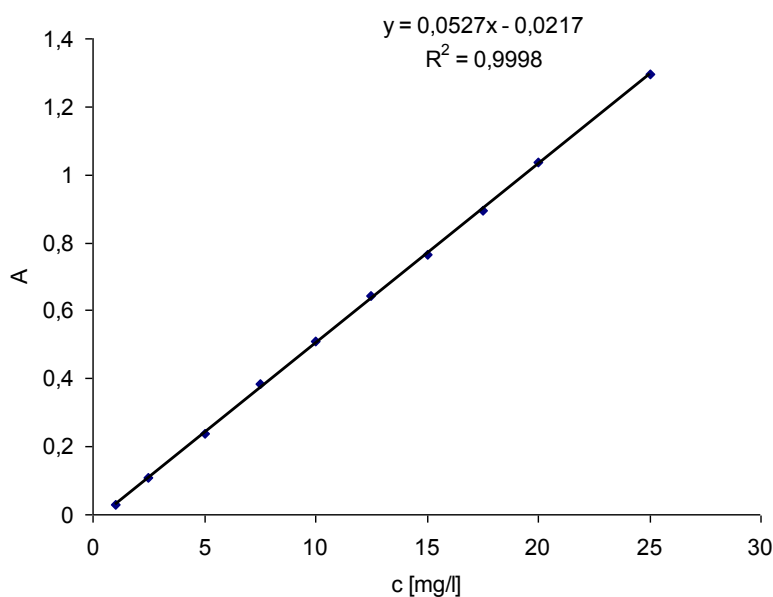
5.1.1. Kalibrační přímka

Pro sestavení kalibrační přímky bylo připraveno 10 roztoků o klesající koncentraci acikloviru (Tabulka.č.4). Absorbance byla měřena při 256 nm, což je absorpční maximum acikloviru ve fosfát citrátovém pufru o pH 6,0. Absorbance byla měřena proti čistému fosfát citrátovému pufru. Z naměřených hodnot absorbance byla sestavena kalibrační přímka, zjištěna její rovnice a hodnota korelačního koeficientu.

Tabulka č.4: Absorbance roztoků acikloviru o různé koncentraci

Koncentrace roztoků acikloviru (mg/l)	Absorbance A
25	1,296
20	1,036
17,5	0,893
15	0,766
12,5	0,642
10	0,509
7,5	0,383
5	0,237
2,5	0,109
1	0,028

Obr.č.15 : Kalibrační přímka



Rovnice kalibrační přímky: $y = a \cdot x + b$

- y.....absorbance
- x.....koncentrace acikloviru (mg/l)
- a.....směrnice kalibrační přímky
- b.....absolutní člen
- R.....korelační koeficient

5.1.2. Stanovení uvolněného acikloviru

Podle vzorce odvozeného z kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace uvolněného acikloviru v mg/l (x_1). Vypočtená koncentrace (x_1) byla poté převedena na koncentraci ACV v 15 ml disolučního média (x_2). Dále byl vypočten podíl uvolněného ACV v procentech ($x_{\%}$) z celkového množství ACV v matrici a z těchto hodnot byla v průběhu celé liberace počítána kumulativní procenta uvolněného ACV.

$$x_1 = \frac{y - 0,0217}{0,0527}$$

$$x_2 = x_1 \times 0,015 \times D$$

$$x_{\%} = \frac{100x_2}{z}$$

- x_1 množství uvolněného ACV (mg/l)
- x_2 množství uvolněného ACV (mg/15ml)
- $x_{\%}$ procentuální podíl uvolněného ACV
- y..... hodnota naměřené absorbance
- z..... množství ACV v matrici
- D..... ředění roztoku

6. Výsledky

6.1. Tabulky

Tabulka č.5 : Liberace acikloviru z nosičů 3M plastifikovaných 30% TEC

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,185	10	0,465	7,71	9,85	9,85
	0,364	10	0,974	16,13		
	0,144	10	0,348	5,72		
0,25	0,176	10	0,439	7,28	7,31	17,16
	0,272	10	0,712	11,79		
	0,083	10	0,174	2,87		
1	0,502	10	1,367	22,67	26,88	44,05
	0,558	10	1,526	25,27		
	0,720	10	1,987	32,71		
2	0,200	10	0,507	8,35	8,69	52,74
	0,214	10	0,547	9,00		
	0,208	10	0,530	8,72		
5	0,659	5	0,907	14,92	12,08	64,81
	0,469	5	0,636	10,47		
	0,484	5	0,658	10,83		
8	0,264	10	0,689	11,35	12,03	76,85
	0,286	10	0,752	12,38		
	0,286	10	0,752	12,38		
11	0,340	5	0,453	7,45	8,07	84,92
	0,335	5	0,446	7,34		
	0,424	5	0,572	9,42		
14	0,308	5	0,407	6,70	5,68	90,60
	0,196	5	0,248	4,08		
	0,289	5	0,380	6,26		
17	1,229	1	0,344	5,66	5,21	95,80
	0,951	1	0,264	4,35		
	1,219	1	0,341	5,61		
20	0,750	1	0,207	3,41	2,41	98,22
	0,352	1	0,094	1,55		
	0,508	1	0,138	2,28		

Tabulka č.6 : Liberace acikloviru z nosičů 5M plastifikovaných 30% TEC

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,287	10	0,755	12,49	9,85	9,85
	0,205	10	0,521	8,65		
	0,201	10	0,510	8,42		
0,25	0,394	10	1,059	17,53	16,02	25,87
	0,306	10	0,809	13,42		
	0,386	10	1,037	17,11		
1	0,875	10	2,428	40,18	45,49	71,36
	1,050	10	2,927	48,55		
	1,038	10	2,892	47,73		
2	0,241	10	0,624	10,30	10,56	81,92
	0,306	10	0,809	13,35		
	0,193	10	0,487	8,04		
5	0,280	5	0,367	6,06	5,62	87,54
	0,200	5	0,254	4,18		
	0,303	5	0,400	6,60		
8	0,295	1	0,078	1,28	1,23	88,76
	0,293	1	0,077	1,27		
	0,261	1	0,068	1,12		
11	0,631	1	0,173	2,86	1,33	90,09
	0,134	1	0,032	0,53		
	0,151	1	0,037	0,61		
14	0,291	1	0,077	1,26	0,93	91,02
	0,110	1	0,025	0,41		
	0,256	1	0,067	1,10		
17	0,125	1	0,029	0,48	0,39	91,41
	0,072	1	0,014	0,24		
	0,115	1	0,027	0,44		
20	0,010	1	-0,003	-0,06	0,05	91,46
	0,023	1	0,000	0,01		
	0,067	1	0,013	0,21		

Tabulka č.7 : Liberace acikloviru z nosičů 8M plastifikovaných 30% TEC

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,344	10	0,917	15,31	16,93	16,93
	0,496	10	1,350	22,21		
	0,304	10	0,803	13,27		
0,25	0,549	10	1,501	25,04	21,20	38,14
	0,344	10	0,917	15,09		
	0,521	10	1,421	23,48		
1	0,203	10	0,516	8,61	10,06	48,19
	0,227	10	0,584	9,61		
	0,276	10	0,724	11,96		
2	0,166	1	0,041	0,68	1,82	50,01
	0,529	1	0,144	2,39		
	0,530	1	0,145	2,39		
5	0,064	1	0,012	0,20	0,57	50,58
	0,313	1	0,083	1,37		
	0,052	1	0,009	0,14		
8	0,015	1	-0,002	-0,03	0,10	50,68
	0,109	1	0,025	0,41		
	0,003	1	-0,005	-0,09		
11	0,005	1	-0,005	-0,08	0,00	50,68
	0,059	1	0,011	0,17		
	0,001	1	-0,006	-0,10		
14	0,051	1	0,008	0,14	0,33	51,01
	0,172	1	0,043	0,71		
	0,056	1	0,010	0,16		
17	0,030	1	0,002	0,04	0,01	51,02
	0,028	1	0,002	0,03		
	0,012	1	-0,003	-0,05		
20	0,025	1	0,001	0,02	0,00	51,02
	0,022	1	0,000	0,00		
	0,017	1	-0,001	-0,02		

Tabulka č.8 : Liberace acikloviru z nosičů 3D plastifikovaných 30% TEC

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,177	1	0,044	0,74	0,90	0,90
	0,282	1	0,074	1,24		
	0,177	1	0,044	0,73		
0,25	0,715	1	0,197	3,30	3,57	4,47
	1,153	1	0,322	5,38		
	0,452	1	0,122	2,03		
1	0,278	20	1,458	24,42	27,29	31,76
	0,321	20	1,703	28,46		
	0,329	20	1,749	28,97		
2	0,280	10	0,735	12,18	12,29	44,05
	0,242	10	0,627	10,38		
	0,325	10	0,863	14,30		
5	0,242	10	0,627	10,38	8,89	52,94
	0,163	10	0,402	6,66		
	0,226	10	0,581	9,63		
8	0,237	10	0,613	10,15	7,85	60,79
	0,144	10	0,348	5,76		
	0,184	10	0,462	7,65		
11	0,433	10	1,170	19,39	11,33	72,12
	0,169	10	0,419	6,94		
	0,184	10	0,462	7,65		
14	0,311	5	0,412	6,82	7,53	79,64
	0,373	5	0,500	8,28		
	0,339	5	0,451	7,48		
19	0,414	5	0,558	9,25	9,85	89,49
	0,381	5	0,511	8,47		
	0,524	5	0,715	11,84		
24	0,084	5	0,089	1,47	12,02	100,61
	0,980	5	1,364	22,59		
	0,531	5	0,725	12,01		
29	0,007	1	-0,004	-0,07	2,28	103,79
	1,240	1	0,347	5,74		
	0,268	1	0,070	1,16		
36	0,024	1	0,001	0,01	0,62	104,42
	0,293	1	0,077	1,28		
	0,146	1	0,035	0,59		

Tabulka č.9 : Liberace acikloviru z nosičů 5D plastifikovaných 30% TEC

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,497	20	2,705	44,91	39,33	39,33
	0,374	20	2,005	33,33		
	0,442	20	2,392	39,76		
0,25	0,544	20	2,973	49,35	42,36	81,69
	0,393	20	2,113	35,12		
	0,472	20	2,563	42,60		
1	0,354	10	0,946	15,70	19,20	100,88
	0,578	10	1,583	26,32		
	0,351	10	0,937	15,58		
2	0,793	1	0,220	3,65	3,25	104,14
	1,022	1	0,285	4,73		
	0,313	1	0,083	1,38		
5	0,300	1	0,079	1,32	1,61	105,75
	0,561	1	0,153	2,55		
	0,226	1	0,058	0,97		
8	0,114	1	0,026	0,44	0,54	106,28
	0,227	1	0,058	0,97		
	0,064	1	0,012	0,20		
11	0,423	1	0,114	1,90	0,79	107,07
	0,107	1	0,024	0,40		
	0,035	1	0,004	0,06		

Tabulka č.10 : Liberace acikloviru z nosičů 8D plastifikovaných 30% TEC

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,552	20	3,018	50,27	54,70	54,70
	0,686	20	3,781	63,27		
	0,558	20	3,052	50,57		
0,25	0,385	20	2,068	34,44	34,57	89,27
	0,336	20	1,789	29,93		
	0,439	20	2,375	39,35		
1	-	-	0,000	0,00	7,46	96,73
	0,795	1	0,220	3,68		
	0,260	10	0,678	11,23		
2	-	-	0,000	0,00	0,44	97,17
	0,192	1	0,048	0,80		
	0,133	1	0,032	0,52		
5	-	-	0,000	0,00	0,22	97,40
	0,142	1	0,034	0,57		
	0,044	1	0,006	0,10		
8	-	-	0,000	0,00	0,07	97,47
	0,057	1	0,010	0,17		
	0,030	1	0,002	0,04		
11	-	-	0,000	0,00	0,00	97,47
	0,039	1	0,005	0,08		
	0,007	1	-0,004	-0,07		

Tabulka č.11 : Liberace acikloviru z nosičů 3M plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,785	1	0,217	3,59	1,95	1,95
	0,285	1	0,075	1,25		
	0,236	1	0,061	1,02		
0,25	0,159	1	0,039	0,65	0,79	2,74
	0,210	1	0,054	0,89		
	0,194	1	0,049	0,82		
1	0,387	5	0,520	8,59	12,26	15,00
	0,768	5	1,062	17,73		
	0,462	5	0,626	10,46		
2	0,508	5	0,692	11,55	16,81	31,81
	0,952	5	1,324	22,09		
	0,729	5	1,006	16,80		
5	0,735	10	2,030	33,88	32,37	64,19
	0,672	10	1,851	30,89		
	0,703	10	1,939	32,36		
8	0,601	10	1,649	27,51	26,09	90,27
	0,485	10	1,318	22,00		
	0,627	10	1,723	28,75		
11	0,498	10	1,355	22,62	21,18	111,45
	0,381	10	1,022	17,06		
	0,524	10	1,429	23,86		
14	0,484	5	0,658	10,98	10,11	121,56
	0,253	5	0,329	5,49		
	0,605	5	0,830	13,85		
20	1,216	1	0,340	5,67	3,28	124,84
	0,441	1	0,119	1,99		
	0,480	1	0,130	2,18		

Tabulka č.12 : Liberace acikloviru z nosičů 5M plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,445	1	0,120	2,01	3,47	3,47
	0,292	5	0,385	6,45		
	0,434	1	0,117	1,94		
0,25	0,862	1	0,239	3,99	3,74	7,20
	0,962	1	0,268	4,49		
	0,601	1	0,165	2,73		
1	0,860	10	2,386	39,84	35,09	42,30
	0,626	10	1,720	28,85		
	0,799	10	2,212	36,58		
2	0,552	5	0,755	12,48	17,17	59,47
	1,014	5	1,412	23,35		
	0,689	5	0,950	15,70		
5	0,750	10	2,073	34,27	30,99	90,46
	0,768	10	2,124	35,12		
	0,523	10	1,427	23,59		
8	0,405	10	1,091	18,03	14,52	104,98
	0,320	10	0,849	14,03		
	0,266	10	0,695	11,49		
11	1,138	1	0,318	5,25	7,63	112,61
	0,425	5	0,574	9,49		
	0,368	5	0,493	8,15		
14	0,545	1	0,149	2,46	3,21	115,82
	0,575	1	0,157	2,60		
	0,989	1	0,275	4,55		
20	0,337	1	0,090	1,48	1,38	117,20
	0,060	1	0,011	0,18		
	0,547	1	0,149	2,47		

Tabulka č.13 : Liberace acikloviru z nosičů 8M plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,71	10	1,959	32,63	38,64	38,64
	0,665	10	1,831	30,39		
	1,140	10	3,183	52,90		
0,25	0,822	10	2,278	37,93	36,58	75,22
	0,605	10	1,660	27,56		
	0,957	10	2,662	44,25		
1	1,183	10	3,305	55,05	47,06	122,28
	1,240	10	3,467	57,56		
	0,626	10	1,720	28,59		
2	0,574	5	0,786	13,06	12,00	134,28
	0,696	5	0,959	15,95		
	0,317	5	0,420	6,98		
5	0,331	1	0,088	1,46	1,75	136,03
	0,596	1	0,163	2,72		
	0,247	1	0,064	1,07		
8	0,069	1	0,013	0,22	0,21	136,24
	0,087	1	0,019	0,31		
	0,044	1	0,006	0,11		
11	0,019	1	-0,001	-0,01	0,00	136,24
	0,026	1	0,001	0,02		
	0,020	1	-0,001	-0,01		

Tabulka č.14 : Liberace acikloviru z nosičů 3D plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,107	1	0,024	0,40	2,11	2,11
	1,194	1	0,334	5,55		
	0,100	1	0,022	0,37		
0,25	0,082	1	0,017	0,29	0,70	2,80
	0,292	1	0,077	1,28		
	0,132	1	0,031	0,52		
1	0,249	5	0,323	5,40	7,13	9,93
	0,468	5	0,635	10,56		
	0,251	5	0,326	5,43		
2	0,391	10	1,051	17,50	15,12	25,05
	0,229	10	0,590	9,82		
	0,402	10	1,082	18,02		
5	0,694	10	1,913	31,87	26,04	51,08
	0,446	10	1,207	20,11		
	0,573	10	1,569	26,13		
8	0,421	10	1,136	18,92	22,04	73,12
	0,642	10	1,765	29,40		
	0,397	10	1,068	17,79		
11	0,389	10	1,045	17,41	18,40	91,52
	0,405	10	1,091	18,17		
	0,436	10	1,179	19,64		
14	0,815	2	0,452	7,52	10,22	101,75
	1,235	2	0,691	11,50		
	1,250	2	0,699	11,64		
20	1,099	1	0,307	5,11	5,69	107,43
	1,280	1	0,358	5,96		
	1,284	1	0,359	5,98		

Tabulka č.15 : Liberace acikloviru z nosičů 5D plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	0,937	10	2,605	43,16	46,35	46,35
	0,854	10	2,369	39,56		
	1,217	10	3,402	56,32		
0,25	0,897	10	2,491	41,27	44,44	90,79
	0,962	10	2,676	44,69		
	1,027	10	2,861	47,37		
1	0,756	10	2,090	34,62	29,36	120,15
	0,707	10	1,950	32,57		
	0,465	10	1,261	20,89		
2	1,006	1	0,280	4,64	5,44	125,59
	0,368	5	0,493	8,16		
	0,172	5	0,214	3,54		
5	0,884	1	0,245	4,06	2,09	127,68
	0,309	1	0,082	1,35		
	0,201	1	0,051	0,84		
8	0,143	1	0,034	0,57	0,25	127,93
	0,052	1	0,009	0,14		
	0,032	1	0,003	0,05		
11	0,015	1	-0,002	-0,03	0,01	127,95
	0,036	1	0,004	0,07		
	0,023	1	0,000	0,01		

Tabulka č.16 : Liberace acikloviru z nosičů 8D plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg]	[%]		
0,125	1,089	10	3,038	50,49	52,13	52,13
	1,242	10	3,473	57,54		
	1,037	10	2,890	48,35		
0,25	1,019	10	2,838	47,18	50,07	102,20
	1,156	10	3,228	53,48		
	1,062	10	2,961	49,54		
1	0,604	10	1,657	27,55	23,92	126,11
	0,431	10	1,165	19,30		
	0,621	10	1,706	28,54		
2	0,552	1	0,151	2,53	2,08	128,20
	0,340	1	0,091	1,52		
	0,486	1	0,132	2,21		
5	0,278	1	0,073	1,22	0,92	129,12
	0,039	1	0,005	0,08		
	0,328	1	0,087	1,46		
8	0,104	1	0,023	0,39	0,38	129,49
	0,037	1	0,004	0,07		
	0,161	1	0,040	0,66		
11	0,018	1	-0,001	-0,02	0,00	129,50
	0,013	1	-0,003	-0,04		
	0,035	1	0,004	0,06		

Tabulka č.17 : Měření absorbance u placebo matric 3M plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	EP	EP [%]	průměr	kumulativní %
			[mg]			
0,125	0,195	1	0,049	0,82	0,85	0,85
	0,211	1	0,054	0,89		
0,25	0,053	1	0,009	0,15	0,11	0,96
	0,037	1	0,004	0,07		
1	0,269	1	0,070	1,17	1,17	2,13
	0,27	1	0,071	1,17		
2	0,121	1	0,028	0,47	0,42	2,55
	0,102	1	0,023	0,38		
5	0,099	1	0,022	0,36	0,34	2,89
	0,088	1	0,019	0,31		
8	0,06	1	0,011	0,18	0,17	3,06
	0,056	1	0,010	0,16		
11	0,033	1	0,003	0,05	0,03	3,09
	0,023	1	0,000	0,01		
14	0,013	1	-0,003	-0,04	-0,04	3,06
	0,015	1	-0,002	-0,03		

Tabulka č.18 : Měření absorbance u placebo matric 5M plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	EP	EP [%]	průměr	kumulativní %
			[mg]			
0,125	0,179	1	0,045	0,74	0,82	0,82
	0,212	1	0,054	0,90		
0,25	0,048	1	0,007	0,12	0,11	0,93
	0,043	1	0,006	0,10		
1	0,292	1	0,077	1,27	1,18	2,11
	0,251	1	0,065	1,08		
2	0,138	1	0,033	0,55	0,56	2,67
	0,144	1	0,035	0,58		
5	0,122	1	0,029	0,47	0,46	3,13
	0,117	1	0,027	0,45		
8	0,047	1	0,007	0,12	0,14	3,27
	0,057	1	0,010	0,17		
11	0,034	1	0,003	0,06	0,03	3,30
	0,023	1	0,000	0,01		
14	0,007	1	-0,004	-0,07	-0,05	3,25
	0,014	1	-0,002	-0,04		

Tabulka č.19 : Měření absorbance u placebo matric 8M plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	EP	EP [%]	průměr	kumulativní %
			[mg]			
0,125	0,305	1	0,081	1,34	1,24	1,24
	0,266	1	0,070	1,15		
0,25	0,07	1	0,014	0,23	0,24	1,48
	0,076	1	0,015	0,26		
1	0,112	1	0,026	0,43	0,50	1,98
	0,142	1	0,034	0,57		
2	0,07	1	0,014	0,23	0,22	2,21
	0,069	1	0,013	0,22		
5	0,044	1	0,006	0,10	0,12	2,33
	0,052	1	0,009	0,14		
8	0,028	1	0,002	0,03	0,03	2,36
	0,029	1	0,002	0,03		
11	0,02	1	-0,001	-0,01	0,00	2,36
	0,022	1	0,000	0,00		
14	0,014	1	-0,002	-0,04	-0,05	2,31
	0,009	1	-0,004	-0,06		

Tabulka č.20 : Měření absorbance u placebo matric 3D plastifikovaných 20% EP

čas [dny]	A	ředění	EP	EP [%]	průměr	kumulativní %
			[mg]			
0,125	0,171	1	0,042	0,71	0,44	0,44
	0,057	1	0,010	0,17		
0,25	0,006	1	-0,004	-0,07	-0,08	0,35
	0,003	1	-0,005	-0,09		
1	0,134	1	0,032	0,53	0,58	0,93
	0,153	1	0,037	0,62		
2	0,102	1	0,023	0,38	0,67	1,60
	0,223	1	0,057	0,95		
5	0,18	1	0,045	0,75	0,78	2,38
	0,193	1	0,049	0,81		
8	0,165	1	0,041	0,68	0,52	2,90
	0,1	1	0,022	0,37		
11	0,065	1	0,012	0,20	0,19	3,09
	0,057	1	0,010	0,17		
14	0,02	1	-0,001	-0,01	-0,02	3,07
	0,015	1	-0,002	-0,03		

Tabulka č.21 : Měření absorbance u placebo matric 5D plastifikovaných 20% EP

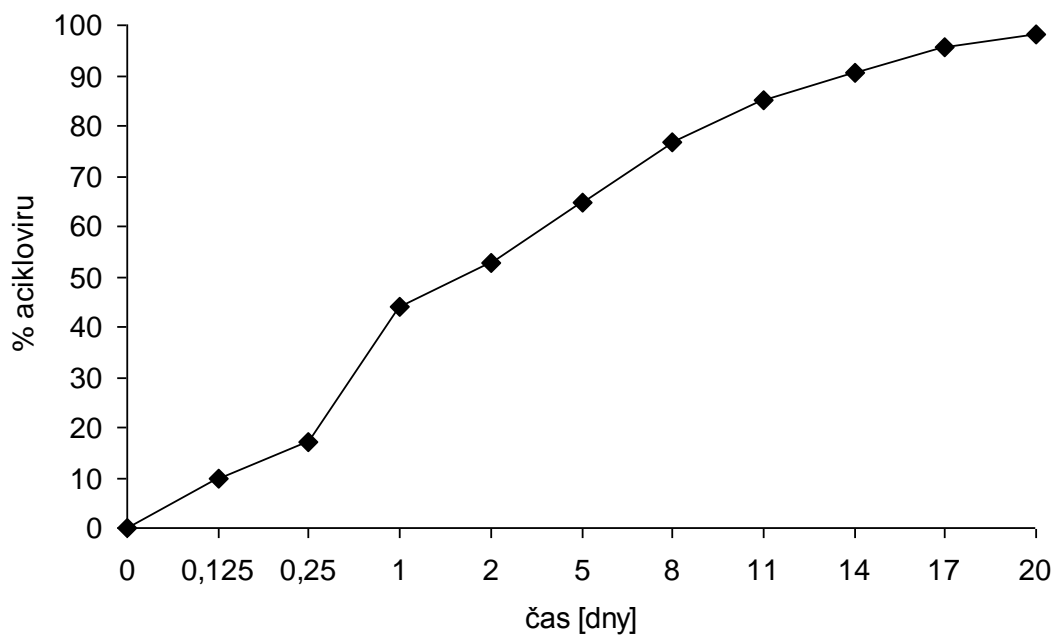
čas [dny]	A	ředění	EP	EP [%]	průměr	kumulativní %
			[mg]			
0,125	0,505	1	0,138	2,30	2,54	2,54
	0,605	1	0,166	2,77		
0,25	0,141	1	0,034	0,57	0,26	2,80
	0,0123	1	-0,003	-0,05		
1	0,085	1	0,018	0,30	0,29	3,09
	0,082	1	0,017	0,29		
2	0,041	1	0,005	0,09	0,08	3,17
	0,038	1	0,005	0,08		
5	0,041	1	0,005	0,09	0,05	3,23
	0,024	1	0,001	0,01		
8	0,027	1	0,001	0,02	0,02	3,25
	0,027	1	0,001	0,02		
11	0,017	1	-0,001	-0,02	0,00	3,25
	0,028	1	0,002	0,03		
14	0,016	1	-0,002	-0,03	-0,04	3,21
	0,009	1	-0,004	-0,06		

Tabulka č.22 : Měření absorbance u placebo matric 8D plastifikovaných 20% EP

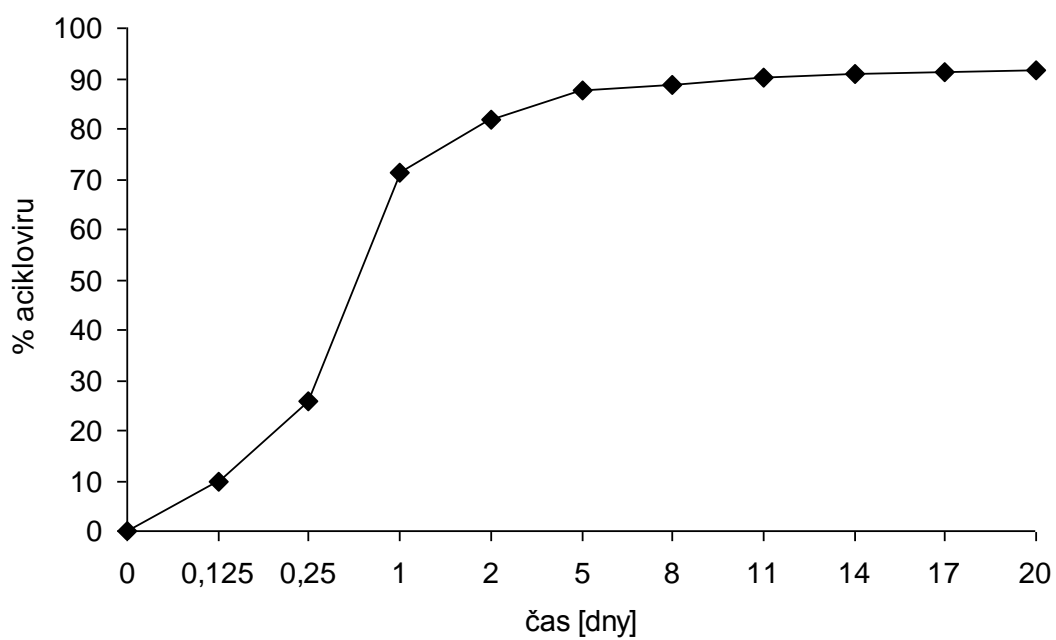
čas [dny]	A	ředění	EP	EP [%]	průměr	kumulativní %
			[mg]			
0,125	0,922	1	0,256	4,26	4,07	4,07
	0,844	1	0,234	3,89		
0,25	0,099	1	0,022	0,37	0,41	4,48
	0,118	1	0,027	0,46		
1	0,019	1	-0,001	-0,01	0,00	4,49
	0,025	1	0,001	0,02		
2	0,023	1	0,000	0,01	0,00	4,49
	0,022	1	0,000	0,00		
5	0,021	1	0,000	0,00	0,00	4,49
	0,021	1	0,000	0,00		
8	0,021	1	0,000	0,00	0,00	4,48
	0,022	1	0,000	0,00		
11	0,018	1	-0,001	-0,02	-0,03	4,46
	0,015	1	-0,002	-0,03		
14	0,009	1	-0,004	-0,06	-0,06	4,40
	0,008	1	-0,004	-0,07		

6.2. Grafy

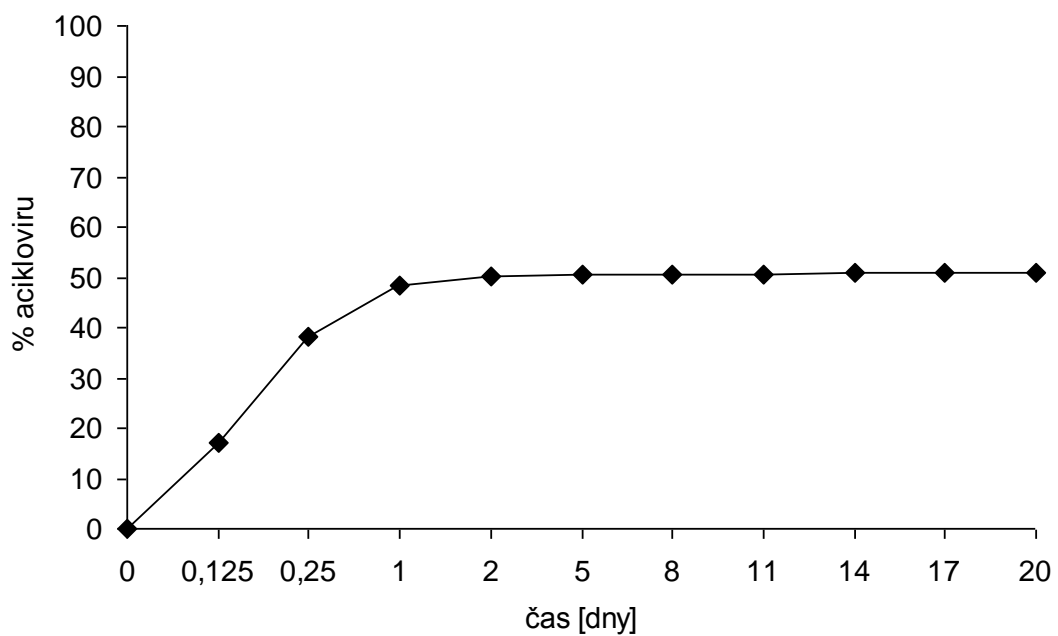
Obr. č.16 : Liberace acikloviru z nosiče 3M plastifikovaného 30% TEC



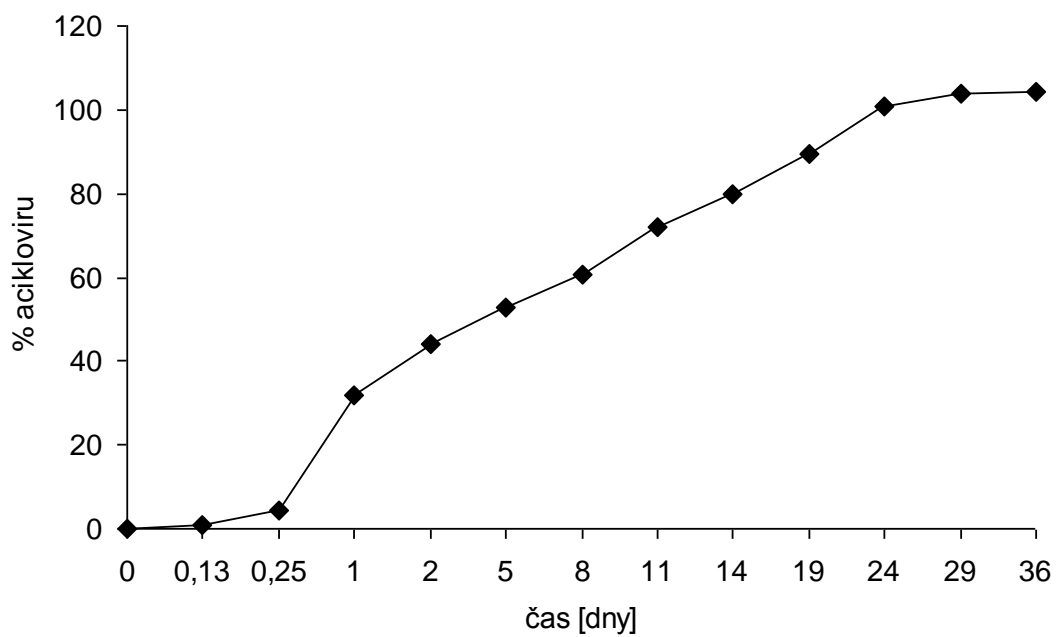
Obr. č.17 : Liberace acikloviru z nosiče 5M plastifikovaného 30% TEC



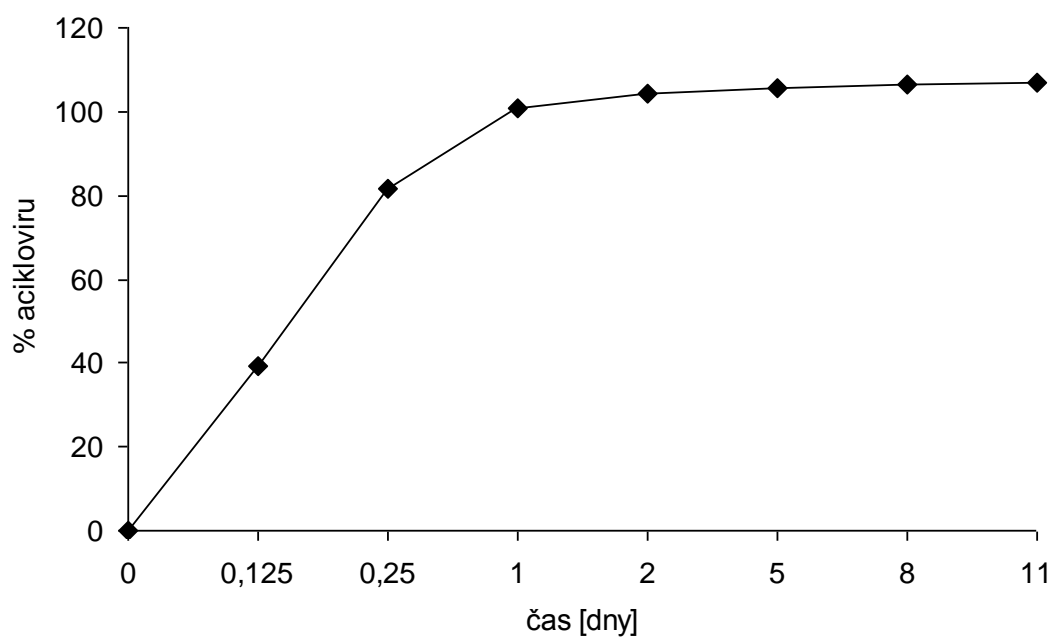
Obr. č.18 : Liberace acikloviru z nosiče 8M plastifikovaného 30% TEC



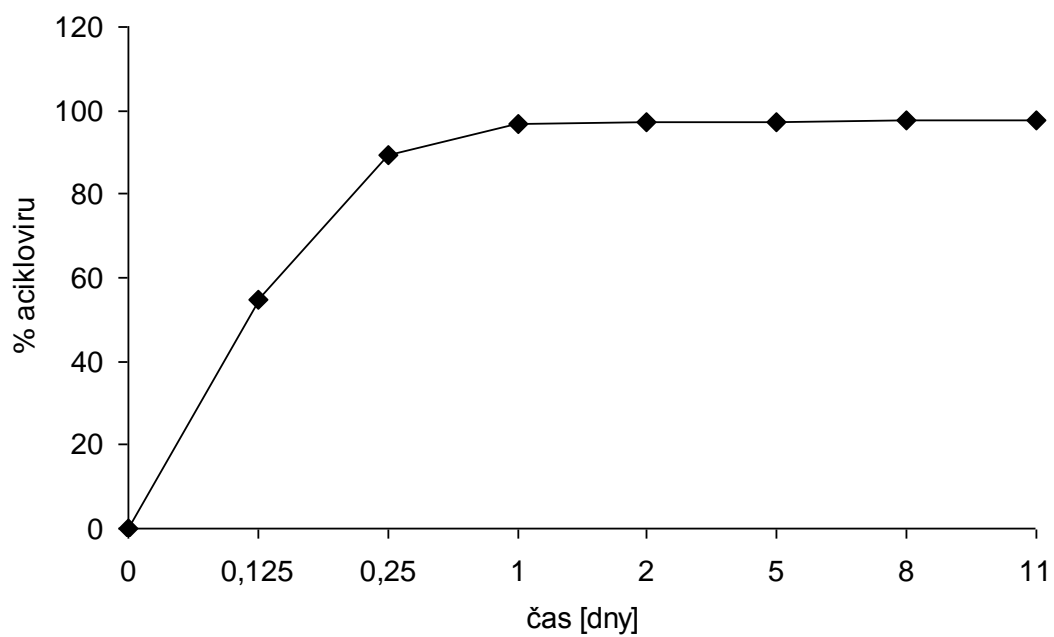
Obr. č.19 : Liberace acikloviru z nosiče 3D plastifikovaného 30% TEC



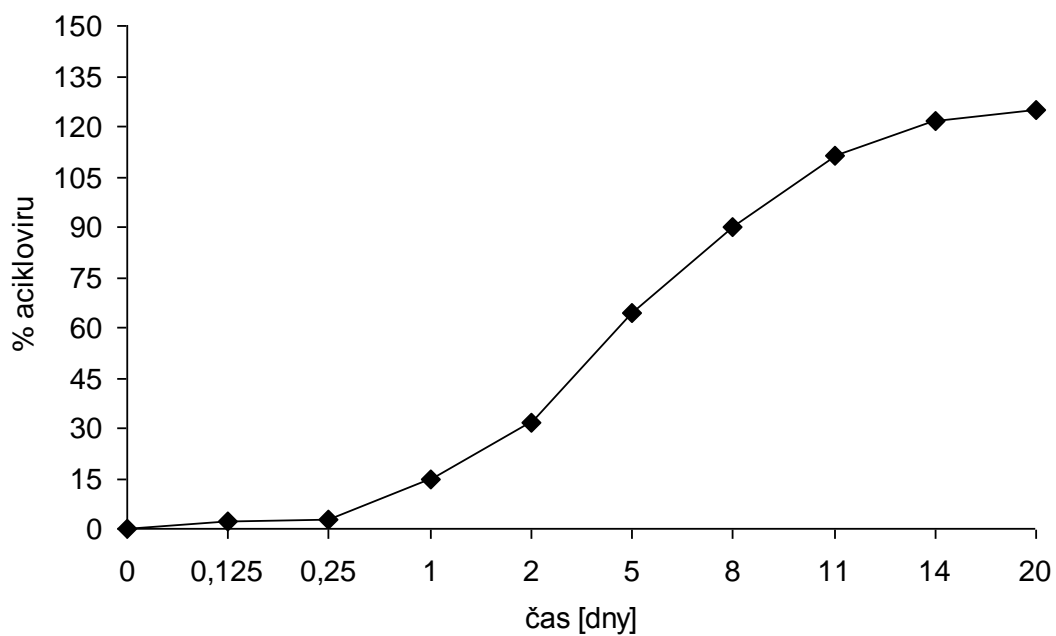
Obr. č.20 : Liberace acikloviru z nosiče 5D plastifikovaného 30% TEC



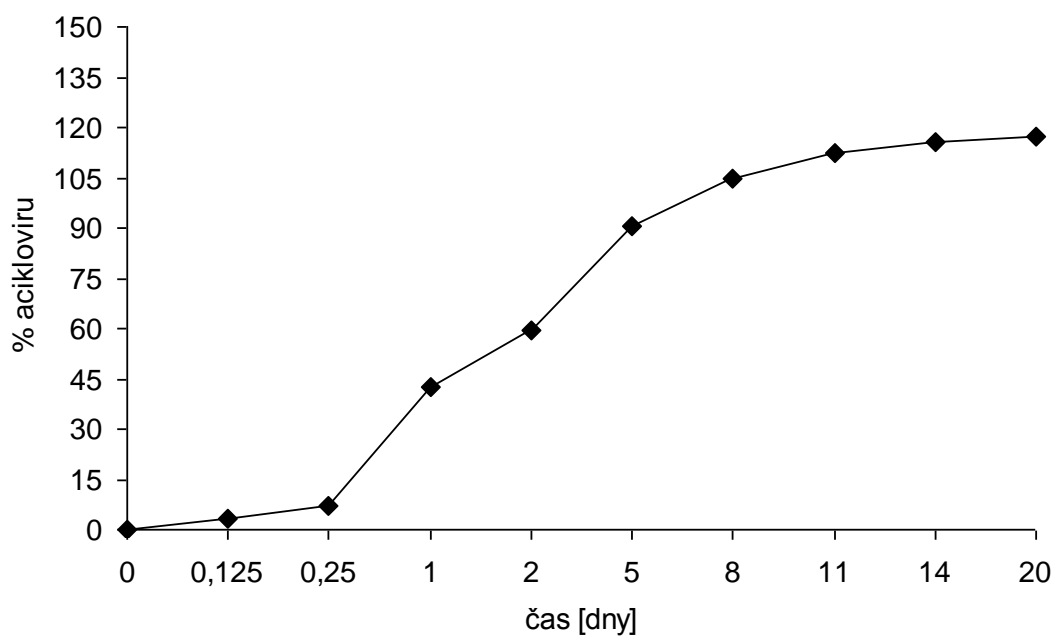
Obr. č.21 : Liberace acikloviru z nosiče 8D plastifikovaného 30% TEC



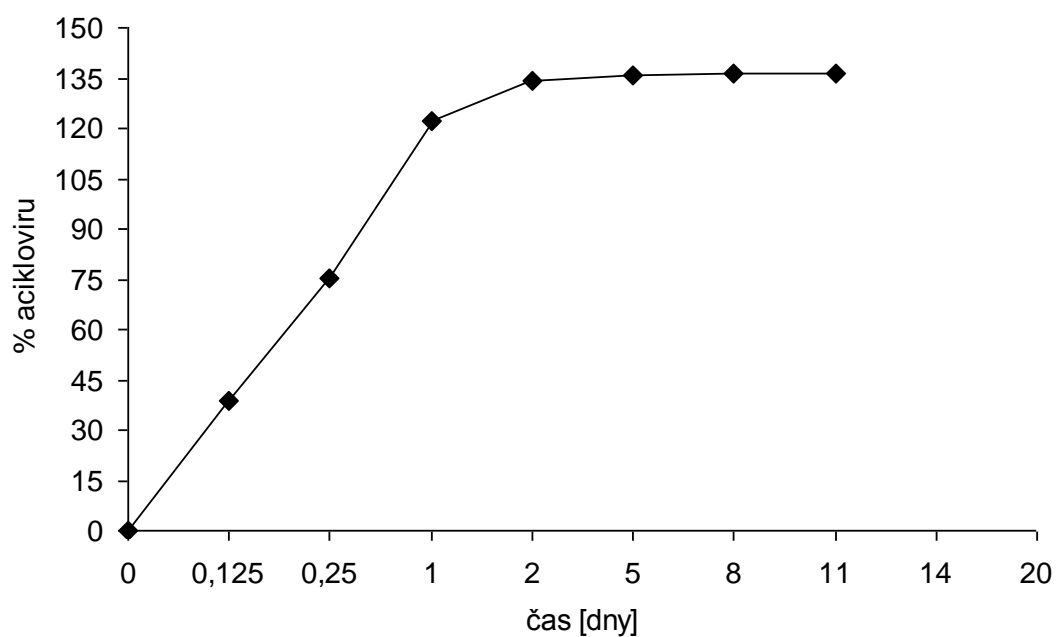
Obr. č.22 : Liberace acikloviru z nosiče 3M plastifikovaného 20% EP



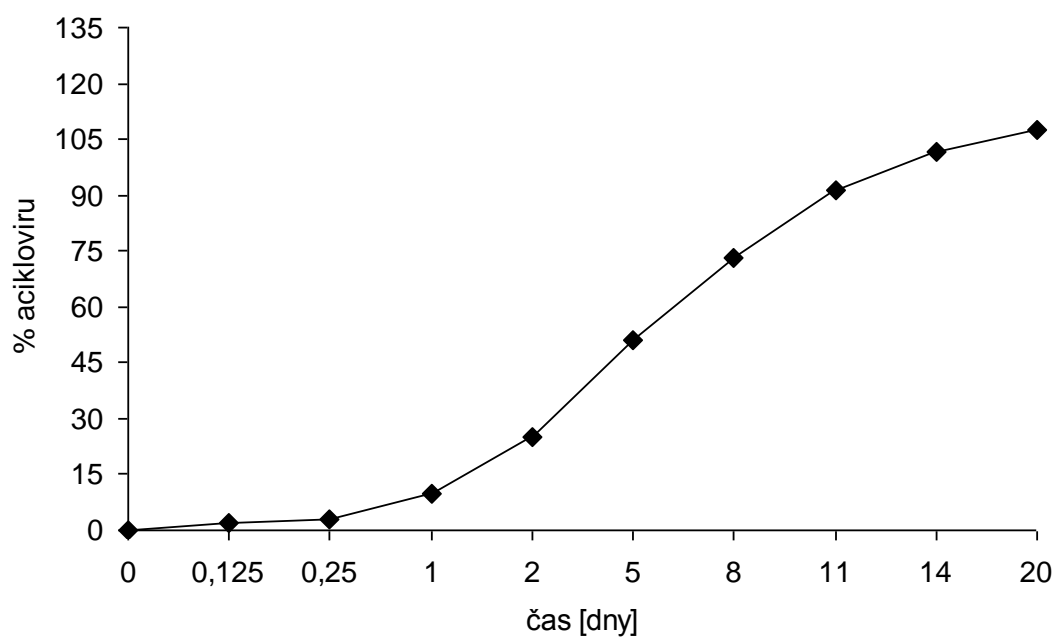
Obr. č.23 : Liberace acikloviru z nosiče 5M plastifikovaného 20% EP



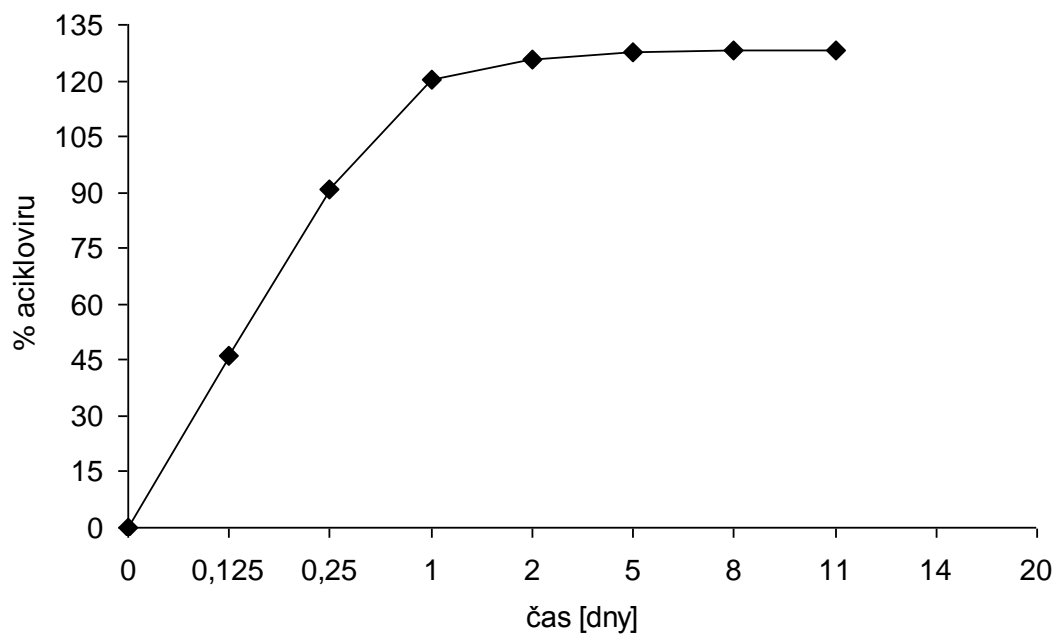
Obr. č.24 : Liberace acikloviru z nosiče 8M plastifikovaného 20% EP



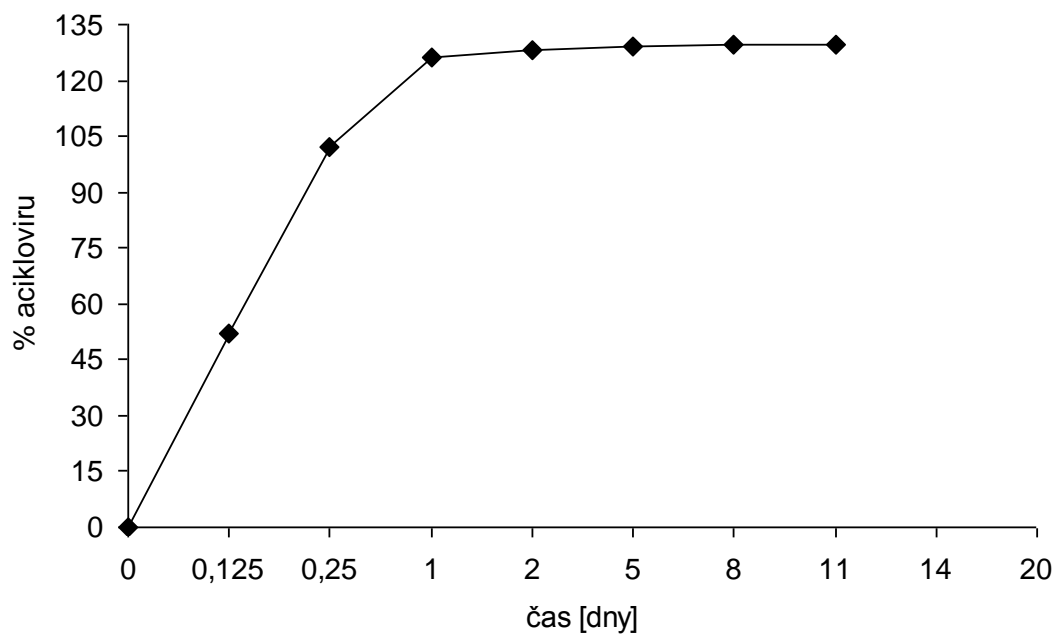
Obr. č.25 : Liberace acikloviru z nosiče 3D plastifikovaného 20% EP



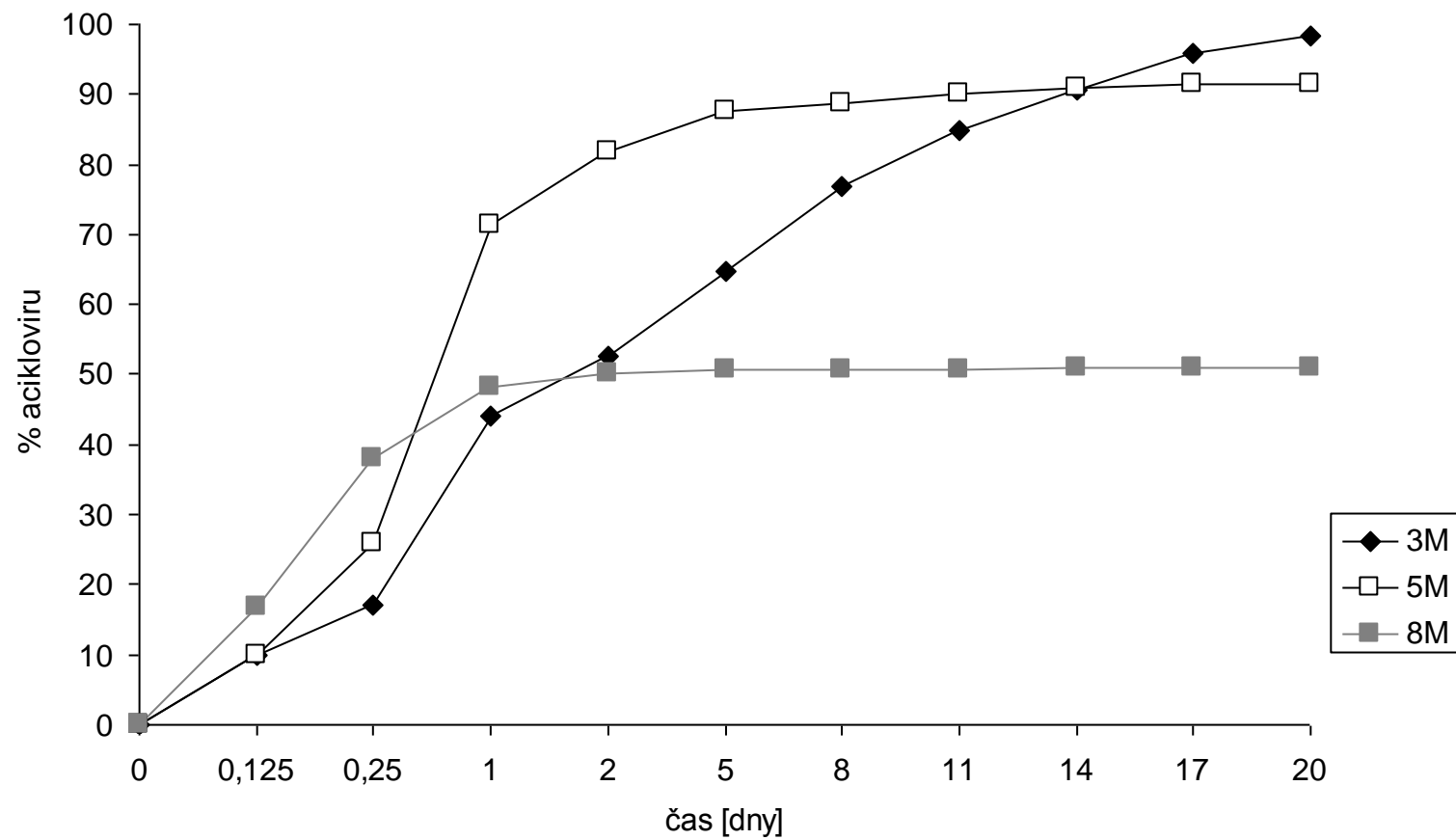
Obr. č.26 : Liberace acikloviru z nosiče 5D plastifikovaného 20% EP



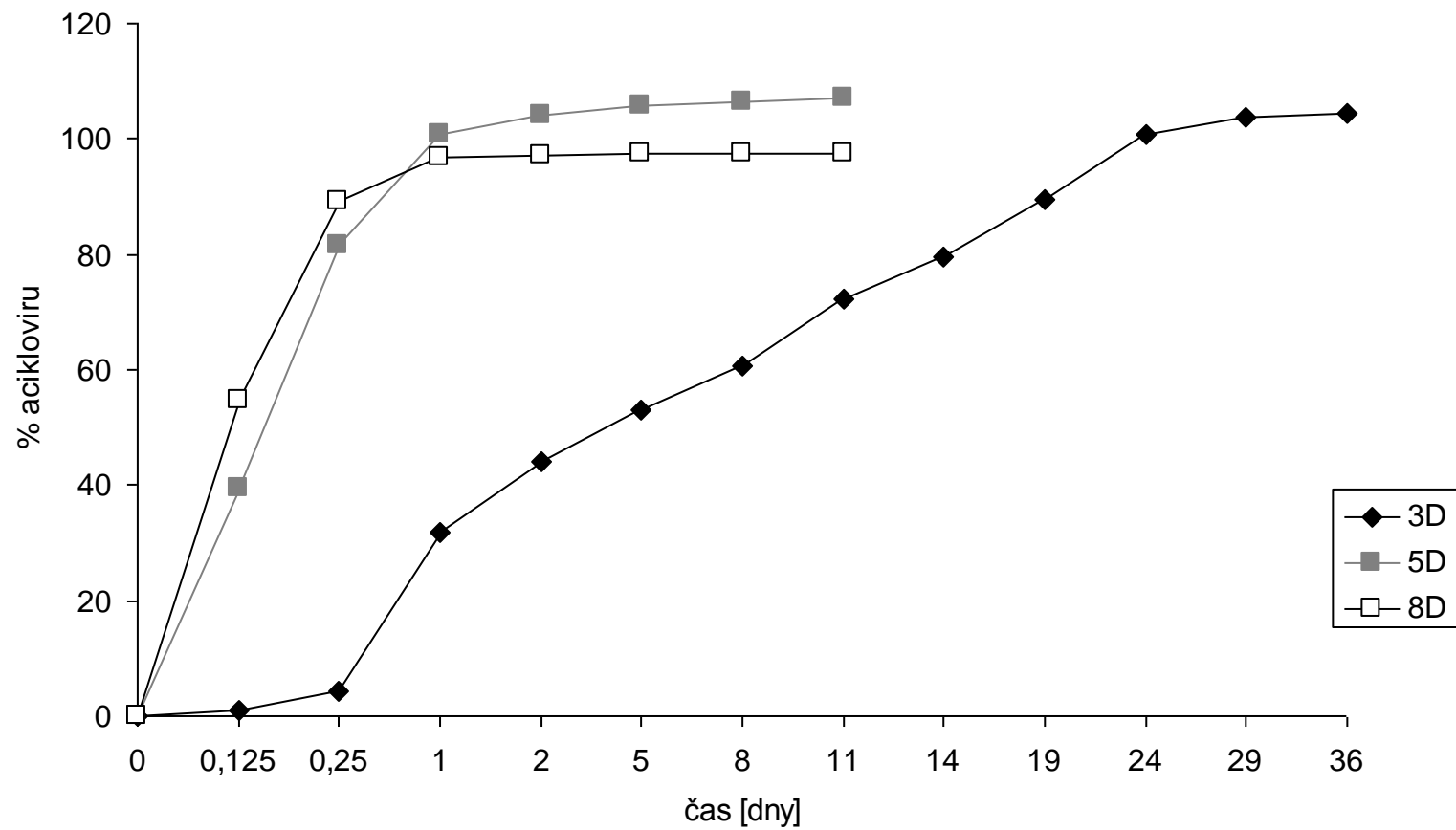
Obr. č.27 : Liberace acikloviru z nosiče 8D plastifikovaného 20% EP



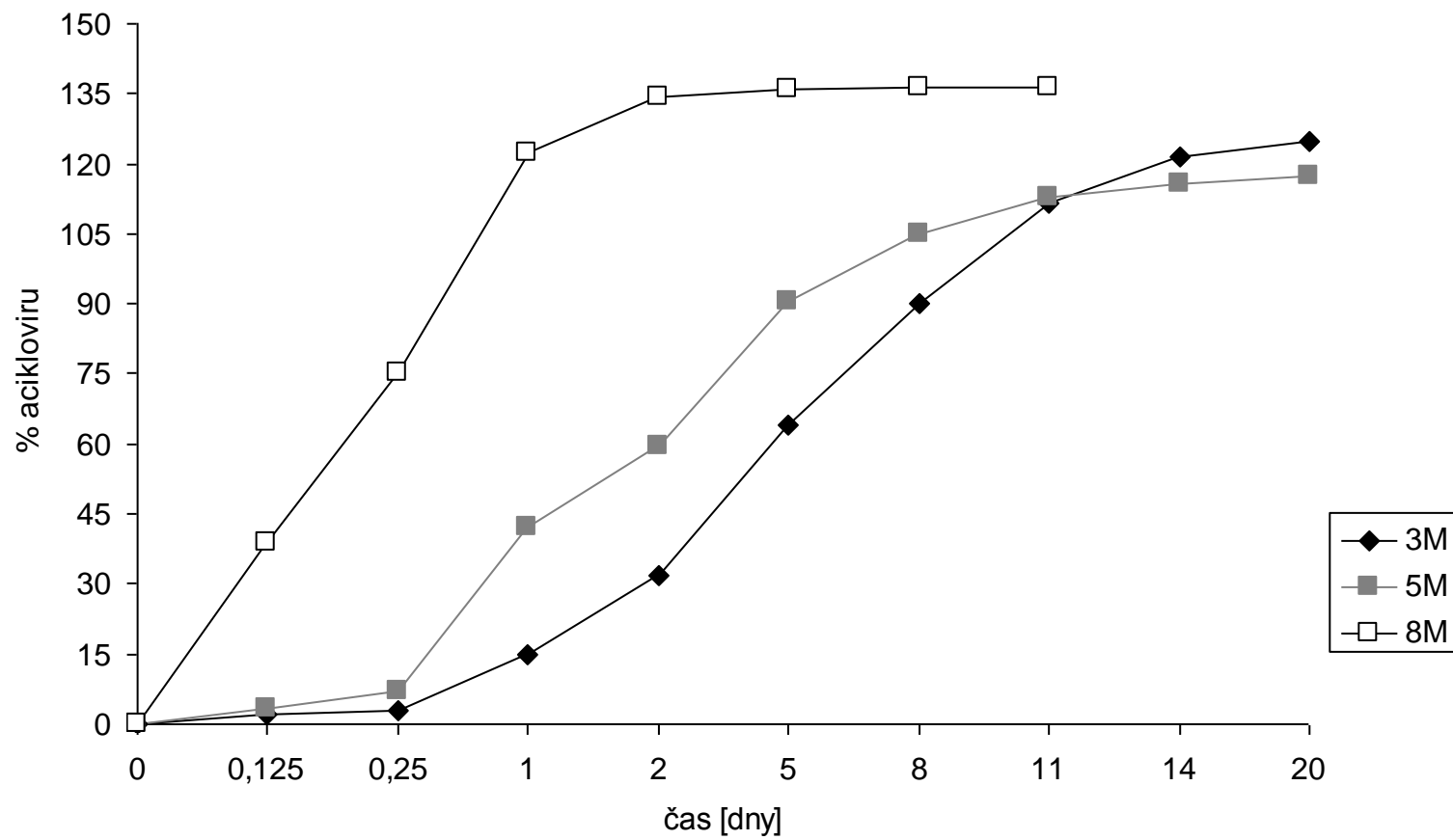
Obr. č.28 : Liberace ACV z matric plastifikovaných 30% TEC větvených různou koncentrací mannitolu



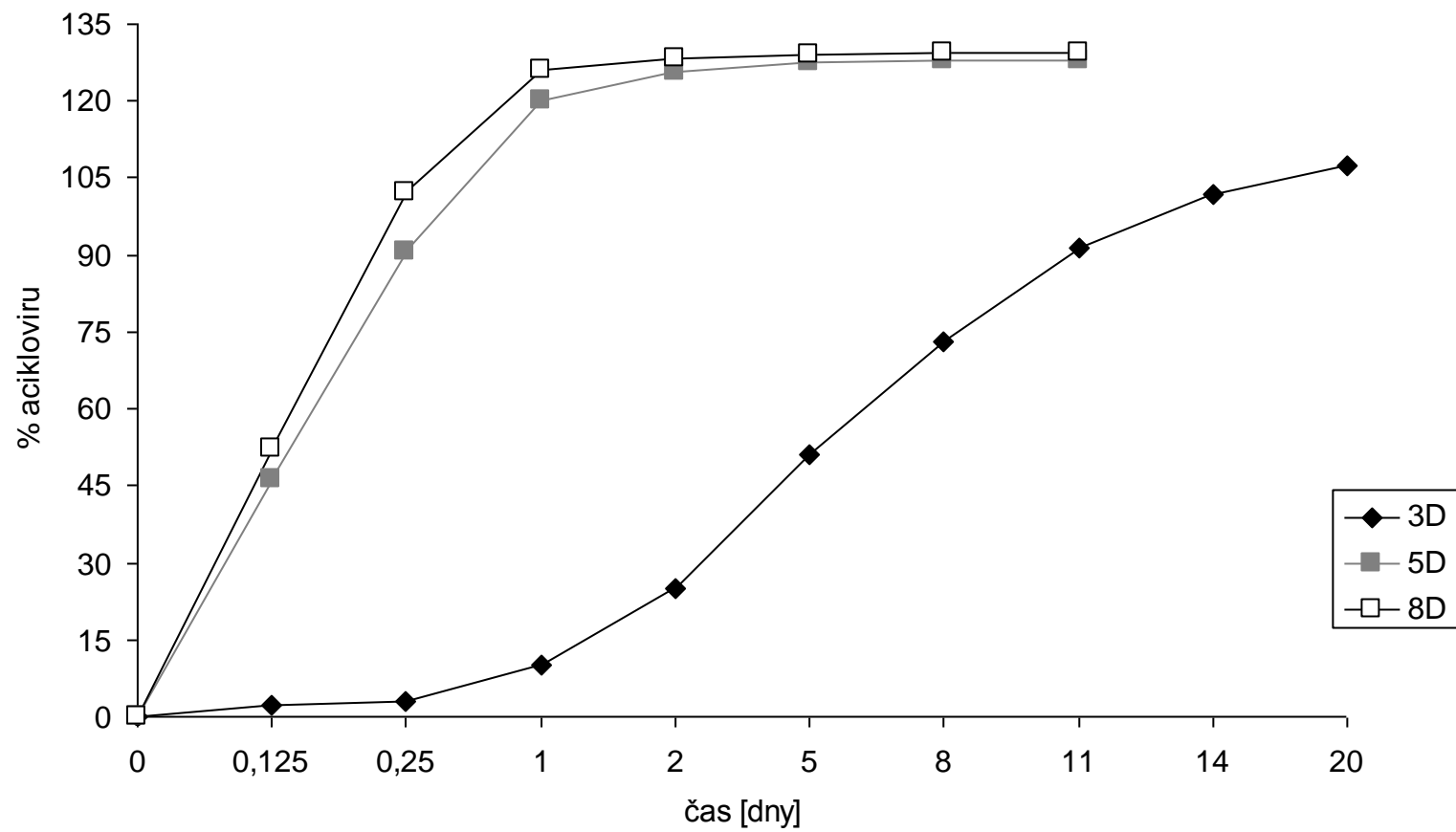
Obr. č.29 : Liberace ACV z matric plastifikovaných 30% TEC větvených různou koncentrací dipentaerythritolu



Obr. č.30 : Liberace ACV z matric plastifikovaných 20% EP větvených různou koncentrací mannitolu



Obr. č.31 : Liberace ACV z matric plastifikovaných 20% EP větvených různou koncentrací dipentaerythritolu



7. Diskuze

Předložená diplomová práce tematicky navazuje na problematiku řešenou v několika předešlých diplomových a rigorózních prací, obhajovaných na katedře farmaceutické technologie.(43), (44), (45) Modelovou léčivou látkou byl zvolen aciklovir, který byl inkorporován do polymerních nosičů s pracovním označením 3M, 5M, 8M, 3D, 5D, a 8D. Jejich základní charakteristiku uvádí tabulka č.3, str. 31.

Polymery byly syntetizovány polykondenzační reakcí na katedře farmaceutické technologie. Jedná se o plasticky deformovatelné soustavy s kontinuální degradací bez fragmentace. Systém si zachovává svoji integritu díky nízkému stupni bobtnání. Rychlá degradace biodegradabilních polymerů je způsobena vysokým podílem kyseliny glykolové. V molekule je zabudován mannitol nebo dipentaerythritol ve funkci centrální molekuly, která vytváří předpoklad pro vznik větvených struktur. V důsledku různé koncentrace větvící složky mají jednotlivé polymery různý stupeň větvení molekul, různou molární hmotnost a tedy odlišnou hydrofilitu, stupeň bobtnání a eroze.

Volba nosiče vycházela z požadavku na vhodný průběh uvolňování modelového léčiva. Hlavním kritériem určujícím vhodnost zvoleného polymeru je přiměřený burst efekt, který by zajistil iniciační dávku acikloviru, a doba liberace v rozmezí 1- 2 dny v případě topické aplikace a několik týdnů v případě implantátů in situ.

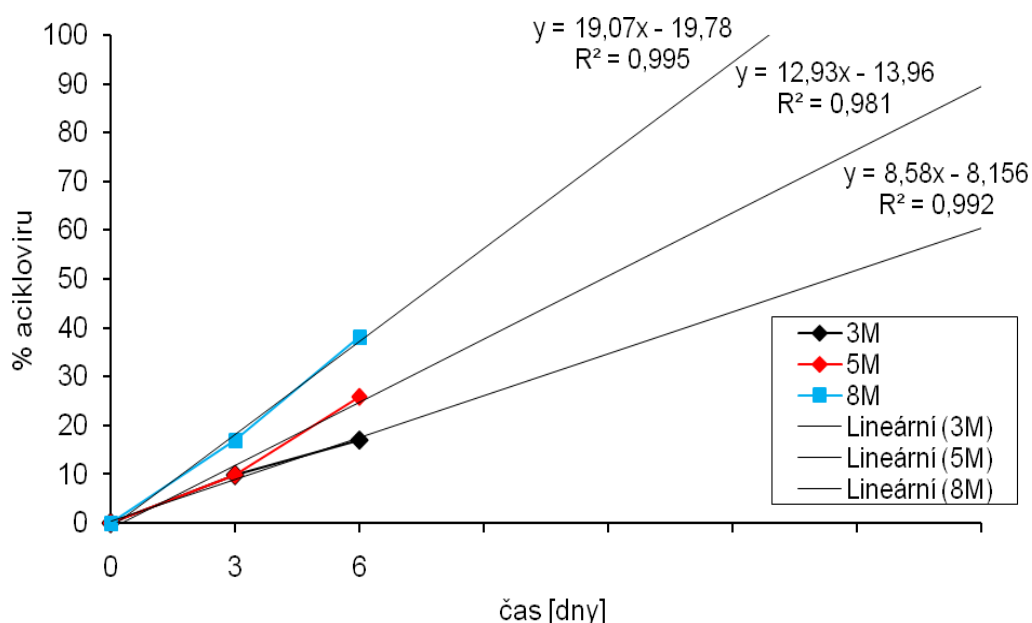
Matrice byly připraveny již dříve vyzkoušenou metodou tavení nosičů s plastifikátorem v horkovzdušné sušárně HS 61 A při teplotě do 80°C. Matrice o hmotnosti asi 150,0 mg byly studovány jako tvarově shodné tenké disky na dně scintilačních lahvíček. Shodný povrch všech matric byl zajištěn nahřátím dna scintilační lahvičky. Disolučním médiem byl fosfát citrátový pufr pH 6,0.

Průběh liberace acikloviru je ovlivněn charakterem zvoleného oligoesterového nosiče a typem a koncentrací použitého plastifikátoru. Zmíněné parametry ovlivňují počátek, průběh i celkové uvolněné množství léčivé látky. Počátek liberace lze charakterizovat burst efektem. Burst efekt byl u jednotlivých vzorků určen jako koncentrace acikloviru uvolněného za 24 hodin.

7.1. Vliv typu nosiče na liberaci acikloviru

Liberace ACV z nosičů větvených mannitolem a plastifikovaných TEC probíhala od počátku liberace do časového intervalu 6 hodin lineárně (Obr.č.32). Z nosiče 3M se v této fázi liberace uvolnilo 17%, z nosiče 5M 26% a z nosiče 8M 38% inkorporovaného ACV. V intervalu od 6. hodiny liberace do 24. hodiny došlo u nosičů 3M a 5M k akceleraci liberace, u nosiče 8M naopak ke zpomalení liberace. Jednodenní burst (tj. množství ACV uvolněné za 24 hodin) byl u nosiče 3M 44%, u nosiče 5M 71% a u nosiče 8M 48%. Neoptimálnější průběh liberace ACV byl pozorován u nosiče 3M, ze kterého se ACV uvolňoval přibližně lineárně i v časovém intervalu od 1. dne liberace do 20. dne liberace, kdy bylo uvolněno veškeré množství inkorporovaného léčiva. V porovnání s tím byla liberace ACV z nosiče 5M rychlejší. Jednodenní burst byl 71% a za 11 dnů se uvolnilo 90% ACV, i když celková doba liberace byla rovněž 20 dnů. Zcela neočekávaný byl průběh liberace z nosiče 8M. Za 24 hodin se uvolnilo 48% ACV, ale dále liberace neprobíhala. Přitom má nosič 8M nejnižší molární hmotnost a nejnižší stupeň větvení, takže by se dala předpokládat relativně krátká doba degradace a tedy rychlý průběh liberace léčiva. Důvodem nesplnění tohoto předpokladu by snad mohla být nedokonalá homogenizace plastifikátoru s nosičem. Liberační testy bude třeba zopakovat.

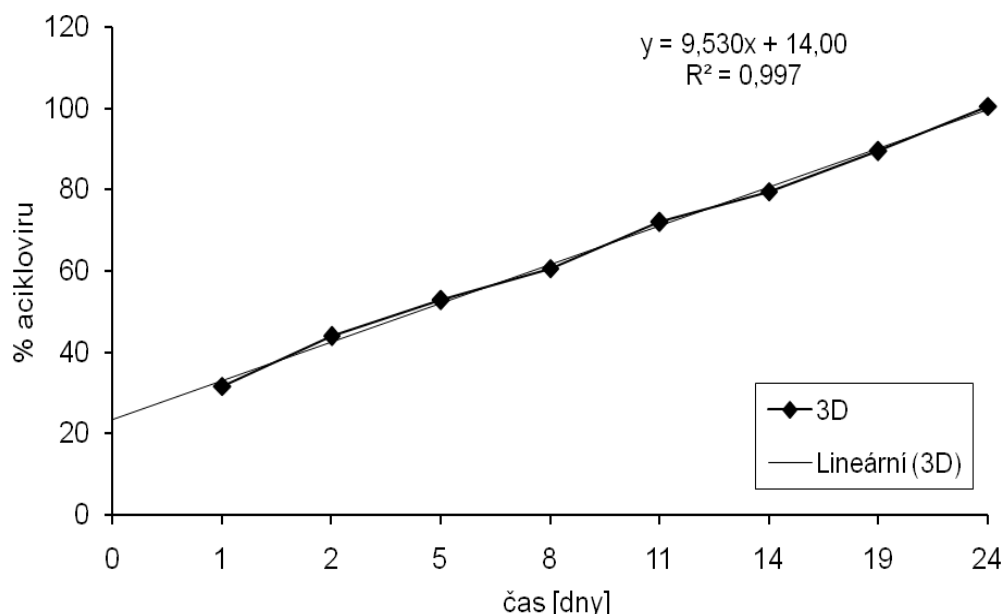
Obr.č.32: Linearizace počátku liberace ACV z nosičů větvených mannitolem a plastifikovaných 30% TEC



Liberace ACV z matric větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných TEC byla ovlivněna zejména molární hmotností nosiče. Nejpomaleji se uvolňoval ACV z nosiče 3D, který má nejvyšší M_w . V počátku liberace byl patrný lag time, kdy se za dobu 6 hodin uvolnilo pouze necelých 5% ACV. V časovém intervalu 1 den až 24 dnů probíhala liberace kinetikou 0. řádu (Obr.č.33) a uvolnilo se veškeré množství ACV inkorporovaného do matrice. Oproti tomu liberace léčiva z nosičů 3D a 5D byla rychlá, za 24 hodin se uvolnil všechny ACV.

Při porovnání liberačních křivek na obr. č. 29 a 31 je vidět, že průběh liberace ACV z nosičů větvených dipentaerythritolem je podobný i při plastifikaci ethylpyruvátém.

Obr.č. 33: Linearizace liberace ACV z nosiče 3D s 30% TEC



Liberace ACV z nosičů větvených mannitolem a plastifikovaných 20% EP byla ovlivněna molární hmotností a stupněm větvení nosiče. Nejrychleji probíhala u nosiče 8M, který má nejnižší M_w i nejnižší stupeň větvení. Kinetikou 0. řádu se za 24 hodin uvolnilo veškeré množství inkorporovaného léčiva. Na křivkách liberace ACV z nosičů 3M a 5M je patrný šestihodinový lag time. Poté následuje přibližně lineární průběh liberace až do časového intervalu 11 dnů, kdy bylo uvolněno veškeré množství inkorporovaného léčiva.

7.2. Vliv plastifikátoru na liberaci acikloviru

Terpolymery kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu, používané jako nosiče různých léčiv, obvykle nelze použít bez jejich plastifikace. Přídavkem plastifikátoru dojde ke zlepšení zpracovatelnosti především tím, že se významně sníží viskozita polymerní soustavy. Kromě toho se plastifikací sníží křehkost polymeru, zvýší mechanická odolnost, difuzivita a umožní aplikace polymerního systému s inkorporovaným léčivem.

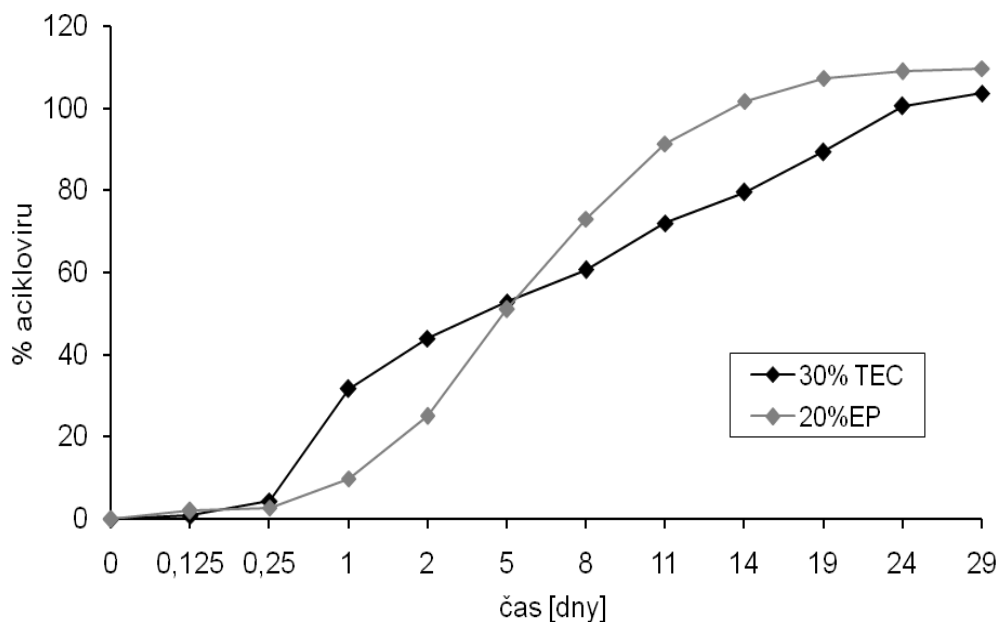
Triethylcitrát (TEC) je běžně používaný plastifikátor polymerů, jehož výhodou je neškodnost prověřená dlouhodobým používáním a vysoká účinnost při snižování teploty skelného přechodu alifatických oligoesterů. TEC je mísitelný s většinou oligoesterových nosičů a může být použit téměř bez omezení. Obvyklá koncentrace TEC v matricích je 20% nebo 30%. Kromě těchto koncentrací byly testovány i méně běžné koncentrace, např. 10% nebo 50% a 60% TEC. Plastifikace 10% TEC je u některých nosičů nedostatečná pro významné zlepšení zpracovatelnosti, avšak dostatečná pro významnou akceleraci liberace inkorporovaného léčiva. Naopak extrémně vysoké koncentrace (50%, 60%), které významně sníží viskozitu polymerního systému, způsobí příliš vysoký burst v liberaci inkorporovaného léčiva.

Plastifikátor, jako složka polymerního systému, není jednoznačně definován. Ve funkci plastifikátoru jsou používána např. tekutá léčiva nebo kapaliny s potenciálním farmakodynamickým účinkem.⁽⁴⁶⁾ Takovou látkou je i ethylpyruvát (EP) použitý v koncentraci 20% jako plastifikátor i v této diplomové práci. Liberace ACV z matric plastifikovaných TEC je odlišná od liberace ACV z matric plastifikovaných EP.

U některých vzorků s EP byla naměřena absorbance odpovídající množství acikloviru, které významně převyšuje 100%. Jedná se zejména o matrice 8M, u kterých 11. den liberace bylo stanoveno 136 % uvolněného acikloviru. Proto byly připraveny placebo matrice tvořené pouze nosičem a plastifikované 20% ethylpyruvátu. S těmito matricemi byl proveden stejný disoluční test jako a matricemi s léčivem. Byla měřena absorbance při 256 nm, která byla přepočtena na množství uvolněného ACV v procentech (Tabulka č.17-22). Naměřené hodnoty představují rušivý vliv nosiče a plastifikátoru na stanovení liberace acikloviru. Pomocí získaných hodnot je možno provést korekci množství uvolněného acikloviru. Bohužel tato korekce není postačující.

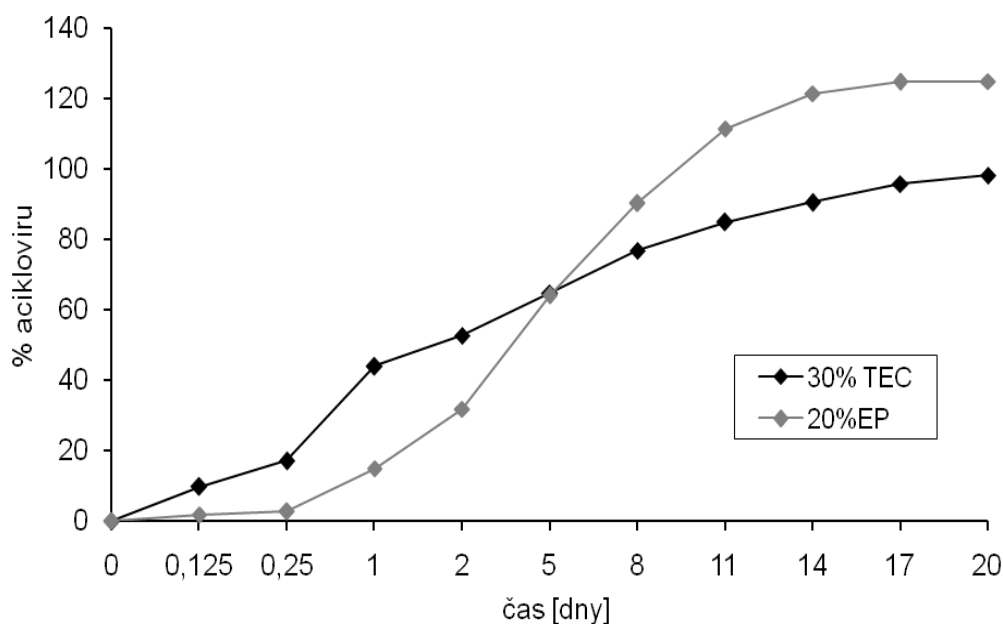
Liberačními testy bylo zjištěno, že u nosičů větvených dipentaerythritolem je průběh liberace ACV téměř stejný jak při plastifikaci triethylcitrátem, tak při plastifikaci ethylpyruvátém (Obr.č. 29 a 31). Pouze u nosiče 3D bylo při použití ethylpyruvátu pozorováno zpomalení liberace ACV v počáteční fázi (v časovém úseku od 6. hodiny do 5. dne). Zatímco z matrice 3D plastifikované triethylcitrátem se za 24 hodin uvolnilo přibližně 30% ACV, z matrice 3D plastifikované ethylpyruvátém se uvolnilo necelých 10% ACV (Obr.č. 34).

Obr.č. 34: Vliv typu plastifikátoru na liberaci ACV z nosiče 3D

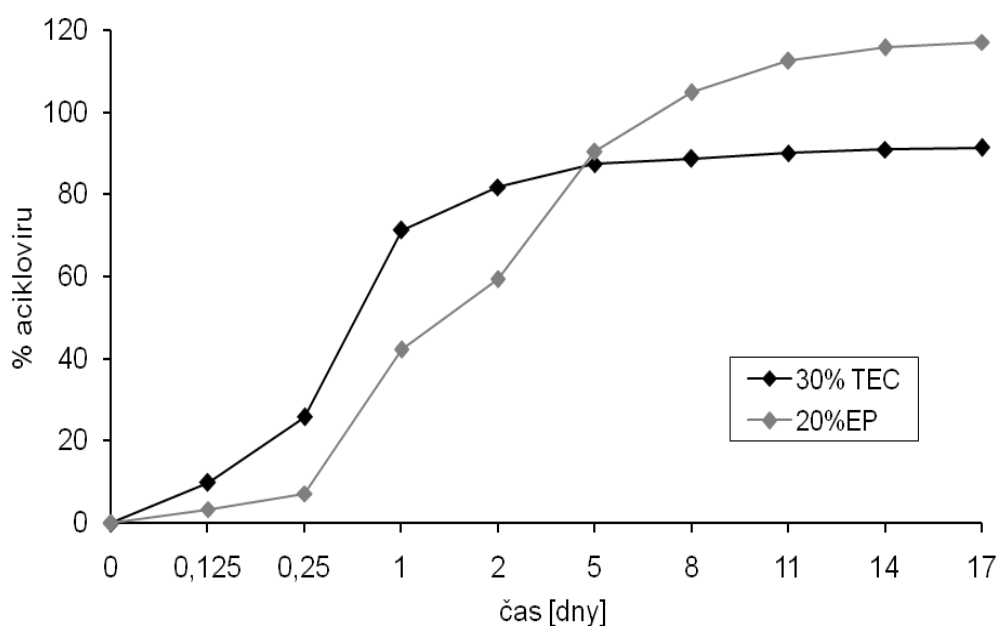


Výraznější vliv plastifikátoru na průběh liberace ACV byl zjištěn u matric větvených mannitem. U nosičů 3M a 5M při použití EP bylo zjištěno významné zpomalení liberace do 5. dne. Dokonce lze hovořit o šestihodinovém lag time (Obr.č. 35 a 36).

Obr.č. 35: Vliv typu plastifikátoru na liberaci ACV z nosiče 3M

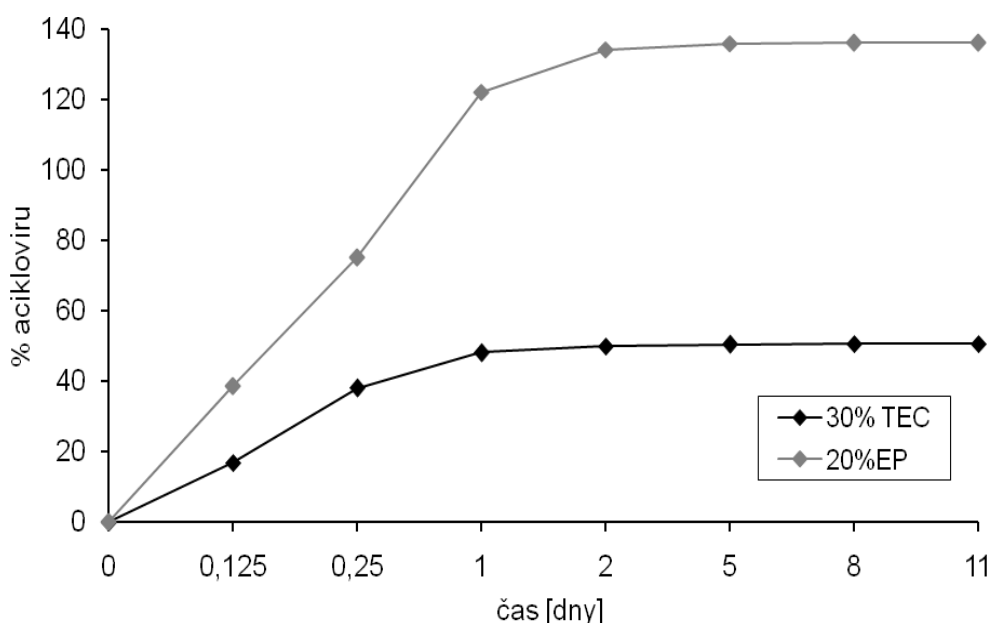


Obr.č. 36: Vliv typu plastifikátoru na liberaci ACV z nosiče 5M



Zajímavý je vliv typu plastifikátoru na liberaci ACV nosiče 8M. Zatímco při použití TEC se za 5 dnů uvolní asi 50% ACV a liberace dále neprobíhá, při použití EP se ACV inkorporovaný do matrice uvolnil za 24 hodin (Obr.č.37). Nosič 8M má v plastifikovaném stavu v porovnání s nosiči 3M a 5M několikařádově nižší viskozitu, což bylo zjištěno v diplomových a rigorózních pracích souběžně prováděných a touto prací. Rovněž má tento nosič nejmenší molární hmotnost M_w i M_n (Tabulka č.3, str. 31). Z těchto důvodů se předpokládá rychlá degradace a současně liberace inkorporovaného léčiva. Tento předpoklad se potvrdil při plastifikaci ethylpyruvátém. Jak již bylo uvedeno výše, důvodem je patrně špatná homogenizace nosiče s plastifikátorem při přípravě matric a matrice tvořené nosičem 8M a plastifikované TEC bude třeba znovu podrobit disolučním testům.

Obr.č. 37: Vliv typu plastifikátoru na liberaci ACV z nosiče 8M



8. Závěry

Z výsledků předložené diplomové práce lze vyvodit následující závěry týkající se liberace acikloviru (ACV) z matric tvořených oligoesterovými nosiči 3M, 5M, 8M, 3D, 5D nebo 8D, které byly plastifikovány 30% triethylcitrátu (TEC) nebo 20% ethylpyruvátu (EP):

1. Neoptimálnější průběh liberace byl zjištěn u nosiče 3M plastifikovaného 30% triethylcitrátu, ze kterého se aciklovir uvolňoval přibližně lineárně po dobu 20 dnů s významnou akcelerací v časovém intervalu 6 hodin až 1 den.
2. Neočekávaný byl průběh liberace z nosiče 8M, který byl plastifikován 30% TEC. Za 24 hodin se uvolnilo 48% acikloviru, ale liberace dál neprobíhala. Důvodem by snad mohla být nedokonalá homogenizace plastifikátoru s nosičem.
3. Liberace acikloviru z nosičů větvených mannitolem byla ovlivněna typem plastifikátoru. Při použití 20% ethylpyruvátu došlo k významnému zpomalení liberace v počáteční fázi v porovnání s matricemi plastifikovaným triethylcitrátem.
4. Průběh liberace acikloviru z nosičů větvených dipentaerytritolem byl přibližně stejný při použití triethylcitrátu i ethylpyruvátu ve funkci plastifikátoru.

9. Souhrn

Cílem práce bylo zjistit průběh liberace acikloviru z větvených oligoesterových nosičů plastifikovaných 30% TEC nebo 20% EP.

Teoretická část diplomové práce byla věnována fyzikálně-chemickým vlastnostem polyesterů kyseliny mléčné a glykolové, jejich biodegradací a tvorbou stereokomplexů. Dále je zaměřena na herpetické viry, charakteristiku acikloviru a dalších virostatik.

V experimentální část byly zhotoveny matrice o hmotnosti 150 mg tvořené nosičem, 4% ACV a plastifikované 30% TEC nebo 20% EP. Byl proveden statický disoluční test ve fosfát citrátovém pufru pH 6,0 při teplotě 37°C. Ve stanovených časových intervalech byly odebírány vzorky disoluční tekutiny a měřena absorbance proti čistému pufru při 256 nm. Disoluční test byl ukončen, pokud se z matrice uvolnilo 100% ACV nebo ve dvou intervalech po sobě se množství uvolněného ACV nezvyšovalo.

Nejoptimálnější průběh liberace byl zjištěn u nosiče 3M plastifikovaného 30% TEC, ze kterého se ACV uvolňoval po dobu 20 dnů přibližně lineárně s významnou akcelerací v časovém intervalu 6 hodin až 1 den. Průběh liberace ACV z nosičů větvených dipentaerytritolem byl při použití 30% TEC a 20% EP přibližně stejný. V případě nosičů větvených mannitolem plastifikace 20% EP vedla k výraznému zpomalení liberace v počáteční fázi ve srovnání s matricemi plastifikovanými 30% TEC. Nečekáný byl průběh liberace z nosiče 8M s 30% TEC. Zde se za 24 hodin uvolnilo 48% ACV a dále liberace neprobíhala. Důvodem může být nedokonalá homogenizace plastifikátoru s nosičem.

10. Literatura

1. Wu, X.S.: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering (D. L. Weie et al., eds.), Marcel Dekker, Inc., New York. 1995, s. 1015-1054.
2. Jalil, R., Nixon, J.R.: Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties, *J. Microencapsulation*, 7, 1990, s. 297-325.
3. Holland, S.J., Tighe, B.J., Gould, P.L.: Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems, *J. Controlled Release*, 1986, 4, s. 155-180.
4. Schindler, A., Jeffcoat, R., Kimmel, G.L., Pitt, C.G., Wall, M.E., Zweidenger, R.: Contemporary Topics in Polymer Science volume 2, Plenum Press, New York, 1997, s. 251-289.
5. Glogolewski, S., Pennings, A.J.: Resorbable materials of poly(L-lactide). II. Fibers spun from solutions of poly(L-lactide) in good solvents, *J. Appl. Polym. Sci.*, 28, 1983, s. 1045-1061.
6. Ginde, R.M., Gupta, R.K.: In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers, *J. Appl. Polym. Sci.*, 33, 1987, s. 2411-2429.
7. Lewis, D.H.: Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (M.Chanis and R.Langer, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1990, s. 1-41.
8. Jamshidi, K., Hyon, S.H., Ikada, Y.: Thermal characterization of polylactides, *Polymer*, 29, 1988, s. 2229-2234.
9. Albertsson, A.C., Karlsson, S.: Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers, Blackie, Glasgow, 1994, hap.2, s. 48.
10. Göpferlich, A.: Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17, 1996, s. 103-114.
11. Kronenthal, R.L.: Polymers in Medicine and Surgery, Plenum Publishing, New York, 1975, s. 119-137.
12. Tsuji, H., Nakahara, K.: Poly(l-lactide). IX. Hydrolysis in acid media, *Appl. Polym. Sci.*, 86, 2002, s. 186-194.
13. Cohen, S., Alfonso, M.J., Langer, R.: Assessment in Health Care, *Int. J. Technik*, 10(1), 1990, s. 121-130.

-
14. Raghuvanshi, R.S., Singh, M., Talwar, G.P.: Biodegradable delivery system for single step immunization with tetanus toxoid, *Int. J. Pharm.*, 93, 1993, R1-R5.
 15. Kranz, H., Ubrich, N., Maincent, P., Bodmeier, R.: Physicomechanical Properties of Biodegradable Poly(D,L-lactide) and Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Films in the Dry and Wet States, *J.Pharm. Sci.*, 89, 12, 2000, s. 1558-1566.
 16. Omelczuk, M.O, McGinity, J.W.: The influence of polymer glass transition temperature and molecular weight on drug release from tablets containing poly(D,L-lactic acid). *Pharm. Res.*, 9, 1992, s.26-32.
 17. Engelberg, I., Kohn, J.: Physico-mechanic properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study, *Biomaterials* 12, 1991, s.292–304.
 18. Jiang, Z.Z, Boyer, M.T, Sen, A.: Chiral and steric recognition in optically-active, isotactic, alternating alpha-olefin–karbon monoxide copolymers-effect on physical-properties and chemical-reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1995, s. 7037–7038.
 19. Chesnoy, S., Huang, L.: DNA condensed by polycations and lipids for gene transfer, *Stp Pharma Sci.* 9, 1999, s. 5–12.
 20. Azzam, T., Eliyahu, H., Shapira, L., Linial, M., Barenholz, Y., Domb, A.J.: Polysaccharide-oligoamine based conjugates for gene delivery, *J. Med. Chem.* 45, 2002, s.1817–1824.
 21. Berisio, R., Vitagliano, L., Mazzarella, L., Zagari, A.: Recent copolymers progress on collagen triple helix structure, stability and assembly, *Protein Pept. Lett.* 9, 2002, s.107–116.
 22. Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I., Sepulchre, M., Spassky, N.: Preparation, properties and complex-formation ability of poly(ether–ester)s of poly(ethylene glycol)s and 2,6-pyridinedicarboxylic acid, *Macromol. Chem. Phys.* 196, 1995, s.2695–2708.
 23. Fox, T.G., Garrett, B.S., Goode, W.E., Gratch, S., Kincaid, J.F., Spell, A., Stroupe, J.D.: Crystalline polymers of methyl methacrylate, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1958, s.1768–1769.

-
24. Singfield, K.L., Brown, G.R.: Optically-active polyethers. 1. Studies of the crystallization in blends of the enantiomers and the stereoblock form of poly(epichlorohydrin), *Macromolecules* 28, 1995, s.1290–1297.
 25. Grenier, D., Prud'homme, R. E.: Komplex formation between enantiomeric polyesters, *J. Polymer Sci. Polym. Phys.*, 22, 1984, s. 577 – 587.
 26. Tsuji, H., Horii, F., Hyon, S.H., Ikada, Y.: Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid)s. 2. Stereocomplex formation in concentrated-solutions, *Macromolecules* 24, 1991, s. 2719–2724.
 27. Tsuji, H., Hyon, S.H., Ikada, Y.: Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid)s. 4. Differential scanning calorimetric studies on precipitates from mixed solutions of poly(D-lactic acid) and poly(L-lactic acid), *Macromolecules* 24, 1991, s.5657–5662.
 28. Domb, A.J., Zehavi, Z.: Stereocomplex Polymeric Carriers For Drug Delivery, *Efrat Biopolymers*, US Patent 6365173, 2002.
 29. Tsuji, H., Miyauchi, S.: Enzymatic hydrolysis of poly(lactide)s: effects of molecular weight, L-lactide content, and enantiomeric and diastereoisomeric polymer blending, *Biomacromolecules* 2, 2001, s.597–604.
 30. Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F. a kolektiv : Lékařská mikrobiologie- Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie, Grada publishing, spol. s r. o., Praha 1999, s. 409-413.
 31. Krejsek, J., Kopecký, O.: *Klinická imunologie*, Nucleus HK[®], Pardubice 2004, s. 435-436.
 32. Slettler, G., Usadel, K.H., Deppermann, D., Friedmann, B. et al.: *Repetitorium praktického lékaře*, Galén, spol. s r. o., Praha 1995, s. 861.
 33. *Český lékopis 2002*, Grada Publishing, Praha 2002, s. 1172.
 34. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*, vydání 1, Grada Publishing s.r.o., Praha, 2002, s.526-537.
 35. Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Bieger, D.: *Barevný atlas farmakologie*, vydání 2, Grada Publishing s.r.o., Praha, 2001, s.284-286.
 36. Suchopár, J. a kolektiv : *Kompendium lékových interakcí* Infopharm[®] 2005, Infopharm a.s., Cover Photo MIB s.r.o., 2004, s. 1349.

-
37. Sweetman, S.C., Blake, P.S., McGlashan, J.M., Pardone, A.V.: Martindale, 33 edition, Pharmaceutical Press, 2002, s. 614.
 38. www.teyerpharm.com/images/products2_c_clip_image001.gif, 20.2.2008
 39. www.matrixlabsindia.com/inside/images/products/Famciclovir.gif, 20.2.2008
 40. www.lakemedelsverket.se/upload/H%c3%a4lso-%20och%20sjukv%c3%a5rd/monografier/bilder/vectavir_penciklovir.gif, 20.2.2008
 41. Boiron, M., Payre-Ficot, A.: Homeopatie- rady pro každý den, Boiron, 1998, s.73.
 42. Merk, Tablet for the laboratory, [B. r.], s.57-59.
 43. Žižka, R.: Biodegradabilní polymery s aciklovirem. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, 2003, 69 s.
 44. Žižka, R.: Studium liberace acikloviru z biodegradabilních systémů. Rigorózní práce, Farmaceutická fakulta UK, 2003, 72 s.
 45. Trčková, K.: Studium biodegradabilních systémů s aciklovirem II. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, 2005, 69 s.
 46. Wu, Ch., McGinity, J. W.: Non-traditional plastification of polymeric films. Int. J. Pharm., 1999; 117, s.15-27.