



**FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**
Univerzita Karlova

Katedra Farmaceutická technologie

Dávkování veterinárních očních kapek 1.
Dosing of veterinary eye drops 1.

Diplomová práce

Hradec Králové, 2022

Jana Marková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně ocitovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Ráda bych ze srdce na prvním místě poděkovala paní docentce Šklubalové za její odbornou pomoc, skvělé vedení a také za její trpělivost.

Poděkování dále patří manželovi a rodině za lásku, trpělivost, psychickou podporu a pomoc s péčí o syna.

Obsah

1	Abstrakt	4
2	Abstract	5
3	Seznam zkratek	6
4	Zadání	7
5	Úvod	8
6	Teoretická část	9
6.1	Anatomie lidského oka	9
6.2	Anatomie drůbežího oka.....	12
6.3	Infekční laryngotracheitida drůbeže	15
6.3.1	Ochranná funkce imunitního systému	17
6.3.2	Prevence.....	19
6.3.3	Slizniční vakcinace	20
6.4	Faktory ovlivňující velikost očních kapek.....	21
6.4.1	Technologické faktory	21
6.4.2	Dispenzační faktory	22
7	Experimentální část	23
7.1	Použité suroviny	23
7.2	Použité přístroje.....	23
7.3	Použité metody	23
7.3.1	Měření hustoty	23
7.3.2	Měření povrchového napětí	24
7.3.3	Měření viskozity	25
7.3.4	Měření hmotnosti kapek	25
7.3.5	Vyhodnocení výsledků	28
8	Výsledky a diskuse	29
8.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti vakcíny	29
8.2	Dispenzace kapek manuálním kapáním	30
8.2.1	CRD	31
8.2.2	FRD	36
8.2.3	CPD	43
8.2.4	Vliv použitého dispenzačního režimu při manuální dispenzaci	51
8.3	Dispenzace kapek pomocí prototypu.....	53
8.3.1	CRDA	53
8.3.2	FRDA	54
8.4	Vlastnosti dispenzačních systémů	56
8.4.1	Manuální dispenzace	56
8.4.2	Dispenzace pomocí prototypu	58
8.4.3	Porovnání dispenzačních systémů	59
9	Závěr	61
10	Použitá literatura	63

1 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická technologie

Školitel: doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Posluchač: Jana Marková

Název diplomové práce: Dávkování veterinárních očních kapek 1.

Cílem této diplomové práce bylo hodnocení vlivu rychlosti kapání, úhlu kapání (90°, 65°, 45°) a objemu náplně lahvičky (30 ml, 15 ml, 5 ml) na hmotnost komerčních očních kapek určených k vakcinaci drůbeže. Kapky byly dispensovány manuálně z konvenčního dávkovacího systému (plastová 30 ml lahvička a kapátko) nebo pomocí prototypu poloautomatického dávkovacího zařízení. S vyšší dispenzační rychlostí se hmotnost kapek zvyšovala ve všech experimentálních kombinacích sledovaných v práci. Pro konvenční systém se při snížení dispenzačního úhlu hmotnost kapky snižovala pouze při konstantní rychlosti kapání, v ostatních situacích zejména při redukci objemu náplně na 15 ml a 5 ml se zvyšovala díky smáčení zaobleného kapátka. V důsledku toho rostla i variabilita dávky. Vliv objemu na výslednou hmotnost kapky byl při použití prototypu podle doporučení výrobcem nevýznamný. U studovaných suspenzních kapek však byla zaznamenána zvýšená variabilita dávky.

2 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical technology
Consultant: doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.
Student: Jana Marková
Title of Thesis: Dosing of veterinary eye drops 1.

The main purpose of this thesis was to find out, whether and to what extent the rate of dispensing, the dispensing angle (90°, 65°, 45°) and the volume of preparation (30 ml, 15 ml, 5 ml) had effected the mass of commercial eye drops for poultry vaccination. Drops were produced manually by using conventional dispensing system (plastic 30 ml dropper bottle and dropper tip) and by using a new prototype of semi-automatic device. The drop mass increased with increasing the rate of drop formation in every examined combination of factors. With decreasing of the dispensing angle, the drop mass decreased only in a case of constant rate dropping. In all other cases, especially with volume reduction to 15 ml and 5 ml, the drop size often increased due to the wetting of hemispherical dropper tip. As a result, higher variability of drop masses had occurred. With using the semi-automated prototype, the preparation volume had no impact on the final drop mass. On the other hand, higher variability of doses was noted for studied suspension eye drops.

3 Seznam zkratek

Zkratka	Význam	Jednotky
EM	Migrující erytém	-
PCR	Polymerázová řetězová reakce	-
TK	Tkáňová kultura	-
VNT	Virus neutralizační test	-
SPC	Souhrn údajů o léčivém přípravku	-
ELISA	Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech	-
AGID	Agar-gel imunodifuzní detekce	-
MALT	Celotělový systém slizniční imunity	-
IgA	Imunoglobulin A	-
CALT	Lymfatická tkáň v oblasti spojivky	-
gG	Glykoprotein G	-
NK	Přirození zabíječi (<i>natural killers</i>)	-
IL	Interleukin	-
INF	Interferon	-
DA	Dispenzační úhel	° (stupně)
CRD	Standardní dispenzace	-
FRD	Rychlá dispenzace	-
CPD	Dispenzace za konstantního tlaku	-
CRDA	Standardní dispenzace za použití poloautomatického prototypu	-
FRDA	Rychlá dispenzace za použití poloautomatického prototypu	-
SD	Směrodatná odchylka	-
ILT	Infekční laryngotracheitida	-

4 Zadání

Teoretická část této diplomové práce bude zaměřena na biofarmaceutické aspekty oční aplikace. Protože předmětem práce je přípravek užívaný pro vakcinaci kuřat, bude pozornost věnována anatomii oka a specifikaci základních rozdílů mezi okem člověka a drůbeže a základním informacím o vakcíně a onemocnění, proti kterému je vakcína určena. Ve stručnosti budou prezentovány faktory, ovlivňující dávkování očních kapek.

V experimentální části budou charakterizovány fyzikálně chemické vlastnosti vakcinačního přípravku Poulvac ILT a hodnocena hmotnost kapky při manuálním kapání pomocí konvenčního dispenzačního obalu: plastové lahvičky a kapátka. Bude studován vliv rychlosti kapání (konstantní, rychlé, kontinuální), vliv dispenzačního úhlu (90° , 65° , 45°) a vliv objemu (30 ml, 15 ml, 5 ml) na hmotnost kapky. Výsledky budou porovnány s hmotností kapky dispensované pomocí prototypu poloautomatického dávkovacího přístroje.

5 Úvod

Oční kapky představují mnohdy jediný způsob léčby nemocí očí jako jsou např. suché oko, bakteriální zánět, či nemoci víčka a spojivky. Oční sliznice představuje také vhodné aplikační místo pro vakcíny. Oční kapky je možné využít k vytvoření nejen specifické imunitní odpovědi, jako k tomu dochází po parenterální aplikaci, ale také k vytvoření slizniční imunitní odpovědi.¹

Samotné přípravky pro aplikaci do oka podléhají přísným kritériím. Především je důležitá sterilita přípravku, pro co nejefektivnější aplikaci jsou velmi důležité jeho fyzikálně-chemické vlastnosti jako viskozita či povrchové napětí. V neposlední řadě hraje velkou roli i samotný kapací systém, tj. lahvička a kapátko, které jsou regulovány především ve vztahu k použitelnosti materiálů. Tvar kapátka a průměr kapací kapiláry může ovlivňovat velikost kapky aplikované do oka a tím i případnou nežádoucí systémovou absorpci přípravku.² Proto je při výrobě kapacích systémů cíleno na to, aby se vyprodukovaná kapka pohybovala v doporučeném rozmezí mezi 5 a 15 μl .³ Takové kapky je ovšem obtížné odkápnout a v oku identifikovat, proto kapací nástavce obvykle produkují větší kapky.

V této práci jsem se věnovala hodnocení dispenzačních systémů pro aplikaci očních kapek pro vakcinaci drůbeže proti laryngotracheitidě a sledovala jsem faktory, které mají vliv na hmotnost kapek.

6 Teoretická část

Oko je jeden z nejdůležitějších a také nejsložitějších smyslových orgánů. Vyznačuje se schopností okamžitě zachytit a následně zpracovat obrovské množství informací přenášených světlem. Pomocí oka člověk získá až 90% informací z vnějšího prostředí a procesu přenosu světelného podnětu.⁴ Vidění však není pouhé vnímání určité části elektromagnetického záření, ale proces přenosu podnětu do mozku, který nám umožňuje i identifikaci a zařazení pozorovaného předmětu do vědomí a do paměti pro další použití.⁵ Je proto logické, že prevence a terapie očních chorob byla odedávna předmětem zájmu lidí a oční přípravky patřily vždy k základním aplikačním formám.⁶

6.1 Anatomie lidského oka

Oko je uloženo v orbitu, neboli dutině očníkové. Je to prostor, který je kostěný a vyplněný tukovým vazivem, slznou žlázou, slzovodem, očníkovými svaly, cévami a nervy. Oční koule má tři vrstvy – *tunica fibrosa bulbi*, *tunica vasculosa bulbi* a *tunica nervosa bulbi*. Součástí oční koule jsou také refrakční struktury oka.⁷

Tunica fibrosa bulbi

Tato zevní vrstva chrání vnitřní struktury oka a je tvořena z většiny bělimou (*sclera*) a z malé části rohovkou (*cornea*). Rohovka je tlustší než bělima, je transparentní, což zajišťuje pravidelné uspořádání kolageních fibril, a skládá se z pěti vrstev. Epitely jsou schopny transportovat ionty přes buněčnou membránu.⁷

Tunica vasculosa bulbi

Jde o střední cévnatou vrstvu, vysoce vaskularizovanou, která oko vyživuje a spolu se svaly se podílí na akomodaci a regulaci přísunu světla do oka. V této vrstvě se nachází cévnatka (*choroidea*), řasnaté tělíčko (*corpus ciliare*) a duhovka (*iris*) s otvorem zorničky (*pupilla*). Cévnatka se podílí na zásobení oka krví. Duhovka je kruhovitý blanitý výběžek, pokračování řasnatého tělíška. Její přední část obsahuje melanofory a zadní hladké svalstvo je zodpovědné za mydriasi nebo miosu.⁷

Tunica nervosa bulbi

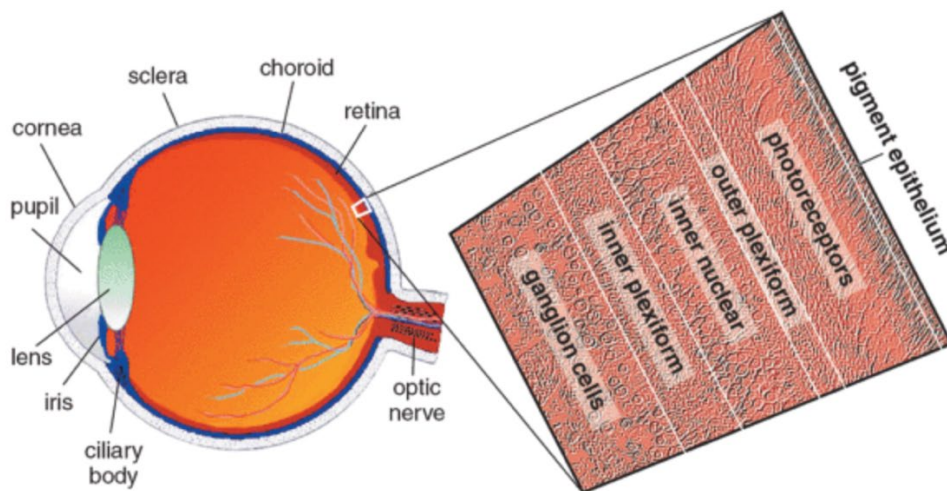
Tato poslední vrstva je tvořena sítnicí (*retina*), jejíž receptory vnímají světelné podněty a přítomné neurony jsou nutné pro převod nervových dějů optickým nervem do mozku.⁷

Sítnice představuje vnitřní vrstvu oční koule a topograficky se člení na dva oddíly – světločivý (*pars optica retinae*) a slepý (*pars caeca retinae*).

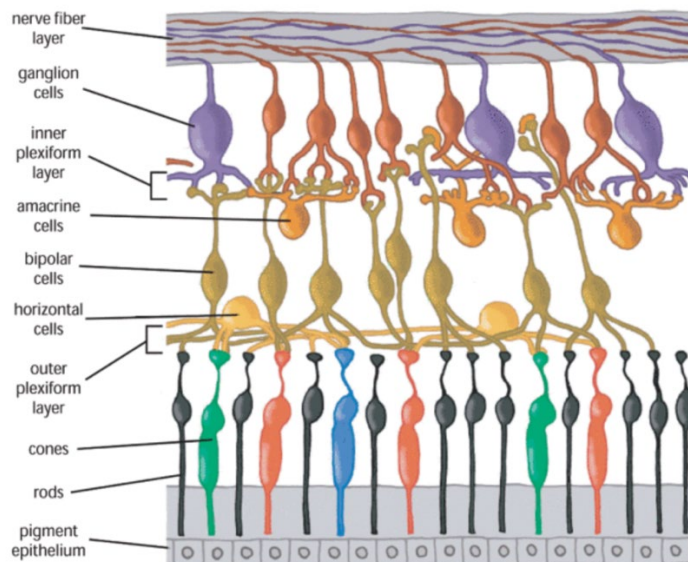
Světločivý oddíl představuje tenká, sklovitě průhledná blanka tvořená třemi vrstvami za sebou řazených neuronů. Součástí této průhledné blanky je místo s jednou vrstvou cylindrických buněk obsahující zrna černohnědého pigmentu ze skupiny melaninu – *stratum pigmenti retinae*.

Histologicky se sítnice dělí na deset vrstev (viz obr. 2). Patří sem vrstva tyčinek a čípků, vnitřní jádrová vrstva, která obsahuje těla a jádra bipolárních, amakrinních a horizontálních buněk a jádra Mullerových buněk. Tyčinky a čípky jsou zrakové buňky sítnice, které představují první neuron zrakové dráhy.⁸ Ty mají schopnost reagovat na dopad světla – tyčinky i na slabé světlo, čípky zajišťují barevný obraz a ostrost obrazu, ale potřebují dostatečné osvětlení. Čípky obsahují fotonpigmenty s různými absorpčními maximy, tudíž je rozlišujeme na 3 druhy dle jejich citlivosti k vlnové délce.⁹ V další vrstvě najdeme pigmentové buňky, které zabraňují zpětnému odrazu světla, které bylo již zaznamenáno tyčinkami a čípky mechanismem pohlcení světla. Dále je součástí vrstva zevní jádrová, nervových vláken, čivých výběžků, zevní a vnitřní ohraničující membrána, vrstva gangliových buněk a vnitřní plexiformní vrstva.⁷

Gangliové buňky sbírají informace, které dále posílají do mozku. Jejich axony pak tvoří zrakový nerv. V místě na sítnici, ze kterého zrakový nerv vystupuje najdeme tzv. slepou skvrnu, bez přítomnosti tyčinek. Slepá skvrna proto, že pokud sem dopadnou světelné paprsky, člověk vnímaný předmět nevidí. Naopak místo na sítnici obsahující nejvyšší hustotu čípků, zajišťující nejostřejší vidění je žlutá skvrna (*fovea centralis*).⁷



Obr. 1 – Lidské oko s popisem vrstev sítnice¹⁰



Obr. 2 – Schematické zobrazení vrstev sítnice¹⁰

Refrakční struktury oka mají za úkol lámat světlo za účelem jeho zaměření na sítnici. Skládají se z čočky (*lens crystallina*), komorové tekutiny (*humor aquaeus*) a sklivce (*corpus vitreum*).

Oko se skládá ze dvou struktur – z výše popsané oční koule a poté z akcesorních struktur oka. Mezi akcesorní struktury oka patří spojivka (*conjunctiva*), horní a dolní víčko, slzný aparát a okohybné svaly.⁷

6.2 Anatomie drůbežního oka

Zrak patří mezi nejdůležitější smysly i u ptáků obecně a to společně se sluchem. Chuť a čich jsou u těchto zvířat vyvinuty pouze slabě. Mají však vyvinuta i jiná smyslová tělíska, kterými jsou schopni zaznamenat tlak, vibrace, bolest nebo teplotu. Jednotlivé smysly jsou ovšem u různých ptáků vyvinuty na různých úrovních, tudíž o jejich smyslech nejde hovořit pouze obecně.¹¹

Informace o anatomii oka drůbeže byly čerpány především z článku z časopisu *Progress in Retinal and Eye Research*, který navíc přehledně srovnal jednotlivé anatomické části oka drůbeže s lidským.¹²

Oko kura domácího se často používá ke studiu očních vad a nemocí s nimi spojených. Mezi jeho značné výhody patří nízké ekonomické náklady, velikost a snadnost zacházení v porovnání s jinými modelovými zvířaty. Přesto stále představuje nedostatečně využitý zvířecí model.¹²

Stejně jako u člověka, je oko uloženo v orbitu. Rozdíl představuje rozloha, kterou oko v lebečním prostoru zaujímá. U člověka zabírá zhruba 5%, kdežto u drůbeže až 50%.

Sclera je velice podobná té lidské, pouze s výjimkou přítomnosti sklerálních kůstek. Jsou tvořené vrstvou hyalinní chrupavky a dodávají oku určitou podporu a ochranu a slouží jako místo připojení ciliárního svalu uvnitř oka, který pak napomáhá akomodaci čočky.

Cornea je stejně jako lidská složena z pěti vrstev. V porovnání s ostatními zvířaty jsou jejich rohovky tenčí, ovšem s lidskou rohovkou jsou srovnatelné. Rozdíl je tedy jen v její funkci, kdy rohovka kuřete napomáhá v akomodaci oka, kdežto lidská nikoli.¹²

Choroidea se skládá z několika vrstev, je to pigmentovaná a skvěle cévně zásobená tkáň. Na přední straně přechází v duhovku, zadní vrstvy obsahují kapilární lamínu cévnatky, která dodává sítnici živiny a kyslík. Zajímavostí cévnatky u kuřat je, že může sloužit jako oční chladicí zařízení. Rozptyluje teplo generované jak ze světla, tak z metabolických procesů probíhajících v oku.

Corpus ciliare hraje u člověka roli v procesu akomodace čočky pomocí ciliárních svalů, ale v případě kuřete ještě tato schopnost potvrzena nebyla. Stejně jako u člověka i u kuřat hraje řasnaté tělísko roli v tvorbě a odtoku komorové vody (*humor aquaeus*). Má tvar mezikruží, do jehož vnitřního okraje je na vláknech závěsného aparátu připevněna oční čočka. Komorová voda vyplňuje prostor mezi čočkou a rohovkou a jejím úkolem je

zachovat nitrooční tlak, vyživit okolní tkáň oka, odvádět odpadní produkty metabolismu a transportovat vitamín C do rohovky, kde je působí jako antioxidant. Odtéká přes zadní komoru trabekulární trámčinou.¹²

Iris představuje první farmakologicky rozdílnou tkáň mezi okem kuřete a okem člověka. Nachází se za rohovkou a na rozdíl od lidského oka je složena především z příčně pruhovaného svalstva, ve kterém se nachází receptory muskarinové i nikotinové. Dilatátor pak obsahuje receptory adrenergní. Lidské oko je složeno ze svaloviny hladké a dilatátor obsahuje alfa-1 adrenergní receptory. Svěrač duhovky pak obsahuje receptory muskarinové, nikoli muskarinové a nikotinové. K tomu jsou ještě jinak citlivé na různé chemické látky, než jsou ty u kuřat, což je při vývoji očních přípravků složité zkoordinovat a navodit miózu případně mydriázu s ekvivalentním účinkem.

Retina kuřete se od savčí anatomicky příliš neliší. Najdeme zde vnitřní a vnější jádrovou vrstvu a vrstvu gangliových buněk lišící se svou tloušťkou od lidských vrstev. Anatomický rozdíl představuje absence žluté skvrny. Naopak ale kuřata mají nejvíce vyvinutou schopnost barevného vidění, protože právě v místě fovey mají přibližně milion čípků na 1 mm² (150 tisíc u lidí).¹²

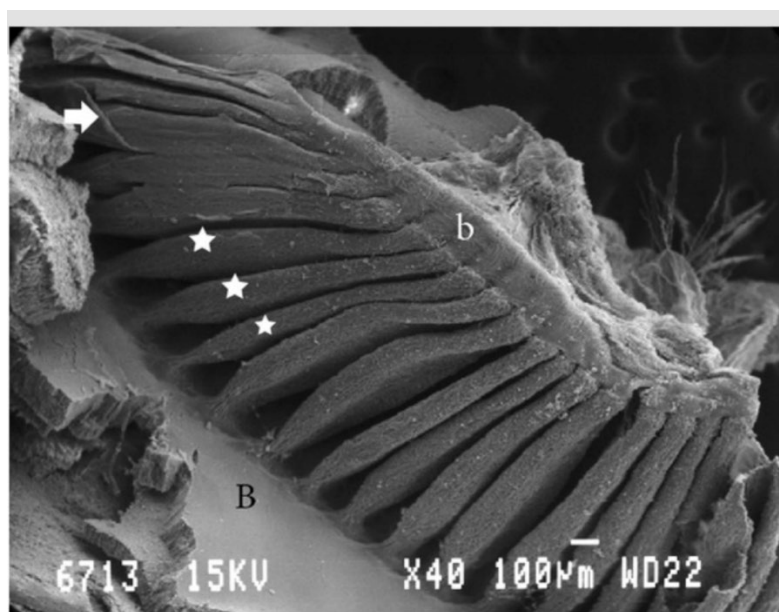
Ptáci mají obecně posunutou senzitivitu k ultrafialovému spektru, vnímají tudíž barvy jinak než my a jejich obraz je zřetelnější a jednodušeji rozlišitelný. Lepší rozlišovací schopnost zajišťují fotoreceptory, které mají ve svém vnitřku barevné olejové kapky tvořící filtr, kterým světlo projde dříve než zrakovým pigmentem. Významně působí na konečný průběh míchání barev v receptorech, mohou intenzitu barev zvýraznit nebo ji naopak zeslabit.¹³ Tato schopnost u lidí chybí.¹²

Dosud bylo rozlišeno šest typů fotoreceptorů u kuřat dle genové exprese a absorpce olejovými kapkami. Olejové kapky mohou nabývat různých barev – červená, oranžovo-žlutá, žluto-zelená a to díky karotenoidovým pigmentům. Můžou však být i bezbarvé.¹³ Müllerovy buňky, specializovaný typ gliových buněk, které jsou součástí sítnice zajišťují výživu nervových elementů sítnice a udržují jejich homeostázu. Ve struktuře lidské sítnice jsou řazeny mezi tzv. neuroglie (podpurné buňky neuronů), kam jsou řazeny i astrocyty a buňky mikroglíí, avšak u kuřat astrocyty chybí. Astrocyty, hvězdčovitě struktury s dlouhými výběžky, které zajišťují výživu neuronu, obvykle přiléhají na stěnu kapiláry jedním výběžkem a druhým se dotýkají povrchu neuronu.¹⁴ Místo astrocytů

ovšem mají svůj vlastní typ neuroglií, které jsou označovány termínem „NIRG“ (*non-astrocytic inner retinal glia-like*) sídlící na hlavě optického nervu.¹²

Rozdíl také představuje poměr čípků k tyčinkám, kdy kuře má poměr 3:2 a člověk 1:20. *Pecten oculi* je jedinečná struktura v ptačím oku, kterou u člověka nenajdeme. Pod elektronovým mikroskopem vypadá spíše jako harmonika ve tvaru lichoběžníku (viz obr.3). Je to vysoce vaskularizovaná tkáň, která začíná v místě, kde oční nerv vstupuje do oční koule; konec pak vyčnívá do sklivce. Od sklivce je oddělený povrchovou membránou, která je složena ze dvou vrstev. Bazální lamina obklopuje každou přítomnou cévu a obsahuje velké množství jemných retikulárních mikrovláken. Druhá vrstva je amorfní struktury. Bylo zjištěno, že *pecten* obsahuje mimo husté sítě cév také buňky podobné fagocytům a hyalocyty.¹⁵ Hyalocyty jsou u člověka součástí sklivce a jsou zodpovědné za syntézu kolagenních fibril a glykosaminoglykanů.¹⁶ Tato struktura vykazuje chování podobné hematoencefalické bariéře, proto slouží při výzkumu jako *in vivo* model.¹⁷

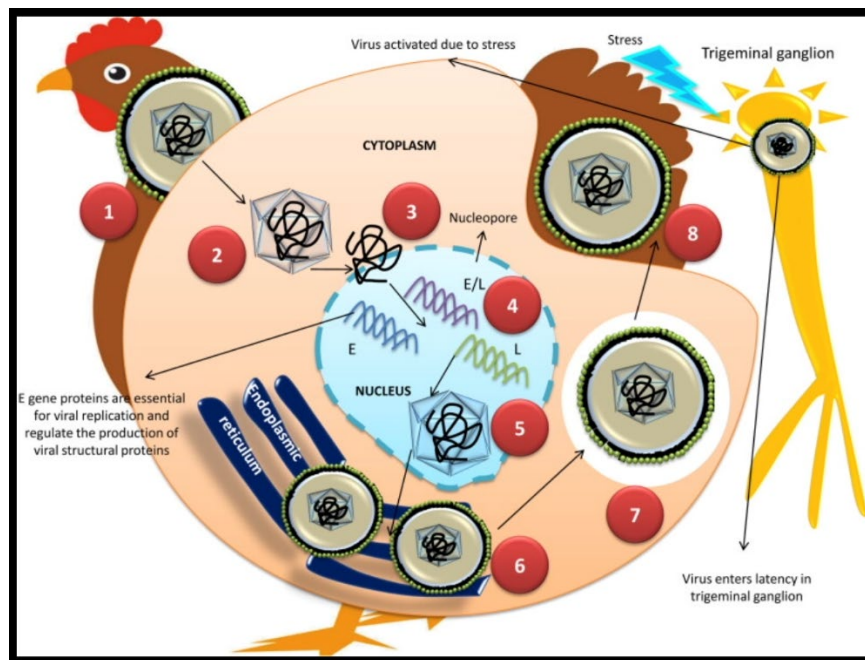
Pecten oculi je bohatý na melanin – pigment, který je schopen absorbovat infračervené, viditelné a UV světlo. Je pravděpodobné, že díky přítomnosti vysoké hladiny katalázy, karboanhydrázy a alkalické fosfatázy je melanin zapojený do vytváření metabolické energie z absorbovaného světla, což u ptáků pravděpodobně hraje roli v doplňování energie zejména když chybí zdroje potravy nebo při dlouhých migračních letech.¹⁵



Obr. 3 - *pecten oculi* zobrazen elektronovým mikroskopem¹⁵

6.3 Infekční laryngotracheitida drůbeže

Jedná se o infekční onemocnění drůbeže způsobené alfaherpesvirem, konkrétně Gallid herpesvirem 1 (GaHV-1), objevující se u mladé a pohlavně dospělé drůbeže zejména v prvním roce věku. Virus způsobuje nebezpečnou nákazu respiračního traktu a do těla může vstoupit přes respirační trakt, konjunktivální cestou nebo orálně. Má kapacitu vybudovat celoživotní asymptomatickou latentní infekci. Onemocnění se přenáší horizontálně, tj. přímo kapénkovou infekcí nebo nepřímo přes krmivo, podestýlku, ošetřovatele, technické zázemí nebo pomůcky. Vertikální přenos neboli přenos z rodiče na potomky nebyl prokázán. K replikaci viru dochází v prvním týdnu infekce, ve spojivkové a tracheální sliznici, kde tento proces vede k zánětu, slizničnímu výtoku a dýchacím obtížím.¹⁸ Inkubační doba je 6-15 dnů, ale infekce může přetrvávat až po dobu jednoho roku, což představuje potenciální zdroj pro rekurentní infekce, tudíž největší zdroj nebezpečí představují rekonvalescentní ptáci.¹⁹ Virus se rozmnožuje lytickým cyklem v epitelu trachey, a horních cest dýchacích a zakládá latentní infekci v gangliu trojklanného nervu a trachey. K jeho reaktivace dochází při stresových podmínkách organismu.²⁰



Obr. 4 - Replikace ILT viru¹⁸

Stěžejní roli hrají první interakce viru s buňkami vystýlající nosní sliznici, se sliznicí spojivky a Harderiánskou žlázou, kde se virus začíná rozmnožovat a také predikují průběh celé infekce.¹⁸ Průběh infekce může mít tři formy: perakutní, subakutní nebo chronický. Perakutní a subakutní forma jsou charakteristické rychlým šířením, vysokou morbiditou a perakutní i vysokou mortalitou, která často překračuje i 50%. Pro perakutní formu je typické namáhavé dýchání s nataženým krkem, chrčení, kašel a krevní sraženiny po celé délce průdušnice (viz obr. 5), na stěnách stáje a na technologii.¹⁹



Obr. 5 – Hemoragická průdušnice¹⁹

Subakutní formu také postihují respirační příznaky, avšak zde je hlavním vodícím znakem pokles snášky až o 60% a žlutavé kaseózní difterické membrány (viz obr. 6). Po předchozích prodělaných formách nemoci se většinou u přežilé drůbeže může objevit chronická forma, která postihuje v hejnu pouze 1-2%, doprovázená nepravidelnými úhyny. Mezi hlavní příznaky patří křečovitý kašel a lapání po dechu, rhinitis a zakrslost.¹⁹ Diagnostika onemocnění spočívá v identifikaci typických znaků (hemoragická průdušnice a krevní sraženiny na stěnách, žlutavé kaseózní difterické membrány), histologické vyšetření, laboratorní identifikace (EM, PCR, kultivace na TK) a v neposlední řadě také serologické vyšetření (VNT, ELISA, AGID).¹⁹



Obr. 6 – Žlutavá kaseózní difterická membrána¹⁹

Při projevu onemocnění se neprovádí symptomatická léčba, protože dosud není známa, avšak do terapie je zapotřebí zahrnout kontrolu sekundárních bakteriálních infekcí pomocí antibiotik. U infekce je nejdůležitější prevence, především zoohygiena, což je komplexní věda, která se zabývá faktory prostředí, které působí na zvířata a ovlivňují jejich welfare, zdraví a užitkovost. Při velké koncentraci zvířat na omezeném prostoru může i menší chyba v prostředí mít plošné a závažné důsledky na welfare chovaných zvířat, jejich užitkovost a tudíž i rentabilitu chovu.²¹

6.3.1 Ochranná funkce imunitního systému

Před invazí cizích mikrobů do těla člověka chrání bariéry, které se rozdělují do tří skupin – anatomické, mechanické a chemické. Funkční sliznice se se svými produkty řadí mezi anatomické bariéry spolu s neporušenou kůží a jejími funkčními produkty. Plocha funkční sliznice tvoří přibližně 400 m² a svou velikostí tudíž představuje možnost vstupu pro mnohé patogeny jako jsou např. viry, bakterie nebo kvasinky.²²

Často se stává, že jsou všechny slizniční bariéry překonány a patogen pronikne hlouběji do těla. V takovém případě má tělo připraveno podslizniční imunitní mechanismy – volné buňky se svými produkty a podslizniční lymfoidní tkáň. Tato imunita je součástí přirozené imunity a humorálního komplementového systému a prostřednictvím svých buněk, protilátek a cytokinů jsou spolu všechny sliznice v neustálém kontaktu. Celotělový systém slizniční imunity se nazývá MALT (*mucosa-associated-lymphoid*

tissue). Ten můžeme dále rozdělit dle místa v těle na: slizniční imunitní systém trávicího traktu (GALT), dýchacího traktu (BALT), nasální (NALT), močopohlavní, oční, orální (působením slin), a systém středního ucha. Buňky, které jsou aktivované např. ve střevní sliznici a způsobí vzestup protilátek IgA migrují tělem prostřednictvím lymfy a krve a způsobí vzestup IgA i v bronchiálním sekretu nebo močovém traktu. Každý regionální imunitní systém má vlastní anatomii a sekundární lymfoidní tkáň, speciální typy buněk a molekuly specifické pro dané místo a především své imunoregulační mechanismy.¹

Důležitý orgán k zachycení antigenu, který následně brání jeho rozptýlení po těle jsou lymfatické uzliny, které u kuřat chybí. Ptáci mají vyvinuty lymfatické noduly, shluky MALT tkáň, která zastupuje funkci lymfatických uzlin a s tím spojenou produkci naivních lymfocytů, tj. lymfocytů, které se ještě nesetkaly s antigenem. Sekundární lymfatické tkáň mají spíše difúzní charakter. V případě ptáků mezi součásti MALT řadíme: slizniční imunitní systém spojený s hlavou (HALT), spojivkou (CALT), nasální (NALT) a Harderiánské žlázy. Harderiánské žlázy se dále dělí na paraokulární a paranasální a jsou s dalšími orgány jako je slezina, kostní dřev a lymfatické tkáň v oblasti spojivky (CALT), průdušek (BALT) a střeva (GALT) řazeny mezi sekundární lymfatické orgány.¹

V kontextu této diplomové práce je důležité zmínit imunoglobuliny (Ig), což jsou molekuly, které jsou schopny vázat antigeny. Takové imunoglobuliny, které vážou antigeny pak nazýváme protilátky. Ig je označení strukturní a dělíme je do pěti tříd lišící se stavbou konstantních domén těžkých řetězců a tím i svými vlastnostmi – IgA, IgD, IgE, IgG, a IgM.¹⁹

Imunoglobulin, který cirkuluje v krvi a je tvořen plazmatickými buňkami, představuje významný faktor protiinfekční rezistence slizničních povrchů. IgA má schopnost vázat se na mikroby, shlukovat je a bránit v jejich adhezi na sliznici. IgA se váže pod povrchem sliznice na sekreční komponentu – speciální bílkovinu tvořenou epiteliálními buňkami, spolu pak transcytózou prochází na povrch sliznice a uvolňují se do sekretu. Sekreční komponenta hraje úlohu v ochraně IgA před poškozením proteolytickými enzymy.¹

6.3.2 Prevence

Důležitá forma prevence mortality je vakcinace, která může být prováděna buď intrakonjuktiválně, sprejově nebo může být podána v pitné vodě. Jedná se o živé apatogenní atenuované vakcíny, které jsou běžně dostupné. Na trhu se také objevily vakcíny geneticky upravené a vektorové, které brání především vzniku latentní neboli skryté infekce.¹⁹

Mnoho dokladů poukazuje na resistenci proti ILT zprostředkovanou primárně buněčnou imunitou, avšak jak přesně buňky imunitního systému na sliznicích pracují je již předmětem výzkumu málokdy. Je známo, že klíčovou roli hrají lymfocyty (CD4, CD8 IgM a IgA), interleukin (IL)-12, interferon gama a Granzym A v CALT. Studie také zjistily, že IgA protilátky nemají na replikaci viru až tak zásadní vliv, protože primárně osidlují povrchy sliznic a blokují vstup patogenu, avšak z Harderiánské žlázy jsou schopny putovat do jiných sliznic a vyvolat humorální odpověď.¹⁹

Imunogenicita viru spočívá v jeho glykoproteinech, které prezentuje na své obálce. Glykoproteiny jsou schopny stimulovat jak humorální, tak i buněčnou imunitní odpověď. Celá řada glykoproteinů hraje v cyklu ILT viru stěžejní roli, avšak glykoprotein G (gG) byl specificky identifikován jako zprostředkovatel vstupu viru do buňky, mezibuněčného šíření a funguje také jako širokospektrální virový protein vázající chemokiny. Glykoprotein G se váže na určité chemokiny a znemožňuje jejich interakce s receptory a navázání glykosaminoglykanů, které jsou nezbytné pro aktivitu chemokinů.¹⁸ Nedochozí pak tudíž k migraci buněk do míst potřebných např. k iniciaci zánětlivé odpovědi.²³ Bylo zjištěno, že gG má v oblibě povolávat B-lymfocyty namísto T-lymfocytů do sliznice trachey. To má za následek intenzivnější humorální odpověď s více cirkulujícími protilátkami proti viru ILT. Tato reakce má ale za následek pouze větší poškození sliznice tracheálního epitelu a navíc napomáhá persistenci viru. K eradikaci viru ze sliznice spojivky se však ukázaly jako účinnější cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky, v případě Harderiánské žlázy hraje roli širší spektrum imunitních reakcí – generace IgA, zvýšení počtu CD4 buněk a produkce Granzymu A CD8 buňkami.¹⁹

Reakce imunitního systému na vakcinaci oproti běžné nákaze spočívá ve vyvolané zánětlivé odpovědi způsobené IL-12 a IFN-gama v CALT, která však nezpůsobuje

eradikaci viru, nýbrž má negativní vliv na sliznici. Po vakcinaci je tato odpověď o poznání menší a nedochází k destrukci a nekróze sliznic.¹⁸

6.3.3 Slizniční vakcinace

Oční sliznice představuje možnou cestu vstupu antigenů a patogenů z vnějšího prostředí, které často osidlují okolí očí. Část oční sliznice, kterou představuje spojivka, má imunologické vlastnosti srovnatelné s dalšími slizničními povrchy – srovnatelné množství epiteliální CD8⁺, CD4⁺ T- lymfocytů, B-lymfocytů a žírných buněk jako Langerhansovy buňky kůže nebo lamina propria. Slizniční vakcinace má výhodu produkce sekreční IgA ve sliznicích a IgG v séru, oproti parenterální cestě aplikace, která indukuje pouze produkci IgG protilátek v séru. IgA ve sliznici tak navíc představuje první linii obrany proti patogenům.¹ Vakcína aplikovaná na oční sliznici dokáže spustit imunitní odpověď posílením slizniční imunity a tak je efektivní cestou, jak zastavit patogen, aby k infekce nemuselo dojít. Experimentální studií bylo dokázáno, že aplikací vakcíny pomocí očních kapek došlo k vyvolání specifické imunitní odpovědi a účinné ochraně organismu před cholera toxinem, virem influenzy a rekombinantním kmenem Salmonely. Oční sliznice tak představuje dobrého kandidáta pro aplikaci vakcín a tím i teoreticky bezpečnou alternativní cestu podání.¹

Vakcína Poulvac ILT byla poprvé registrována v roce 2005 anglickou společností Zoetis UK Limited a to pod ATCvet kódem QI01AD08. Je to vakcína atenuovaná, skládá se z živého lyofilizovaného infekčního alfaherpesviru, který je původcem nemoci zvané infekční laryngotracheitida. Princip této vakcíny spočívá v nákaze drůbeže ovšem bez vypuknutí nemoci. Nutnou součástí doprovázející tento lyofilizát je voda pro injekce, zajišťující tvorbu suspenze, která je následně použita jako vakcína k aplikaci do oka. Vakcína je určena pro drůbež jako je kur domácí, bažant, krůta, koroptev nebo perlička. Je indikována k prevenci mortality a klinických příznaků způsobené infekční laryngotracheitidou. Dle SPC je uváděna čtrnáctidenní imunita proti této infekci, ale používáním vakcíny v praxi bylo zjištěno, že imunita v drůbeži přetrvává celé období snášky, tj. 12 měsíců. Vakcínu je možné podat drůbeži od čtyř měsíců věku, neměla by být aplikována již nemocné drůbeži a měla by být aplikována celému chovu najednou, aby se předešlo šíření kmenu, kterým se očkuje z očkovaných kuřat na ty zatím

nenaočkované. Mezi nežádoucí účinky patří otok spojivky a její zarudnutí, které ale samo vymizí do tří dnů při dodržování čistého hygienických prostředí.²⁴

6.4 Faktory ovlivňující velikost očních kapek

Před samotnou aplikací očních přípravků je doporučeno si umýt ruce, po odšroubování uzávěru zajistit, aby nedošlo k jeho kontaminaci. Pro správnou aplikaci očních kapek je doporučeno umístit lahvičku do svislé polohy (90°), mírně zaklonit hlavu, odtáhnout dolní víčko a přizpůsobit vzdálenost kapátka od oka tak, aby se nedostalo do kontaktu s okem či jeho okolím. Po aplikaci dávky je vhodné oči na pár minut zavřít a zakroužit očními bulby. V případě potřeby aplikace další kapky je vhodné počkat alespoň 6 minut.²⁵ Dávkování očních kapek je ovlivněno mnoha faktory. Kapka musí mít především správnou koncentraci léčiva potřebnou pro žádaný efekt a správný objem, aby léčivá látka působila pouze lokálně a nezpůsobila systémovou absorpci. Obecně bylo zjištěno, že objem jednotlivé kapky by měl být přibližně 20 μl , aby léčivá látka dosáhla optimálního účinku. Ve skutečnosti je objem značně variabilní s průměrnou hodnotou cca 39 μl .²⁶ Dávkování očních kapek je ovlivněno mnoha faktory, které se člení primárně do dvou skupin a to na faktory technologické a faktory dispenzační.²⁵

6.4.1 Technologické faktory

Složení přípravku je primárně určeno výrobcem, v souladu s lékopisnými požadavky na vlastnosti očních kapek a stabilitu konkrétního léčiva.²⁵ Český lékopis povoluje obsah pomocných látek např. k úpravě viskozity, pH, osmotického tlaku, ke zvýšení rozpustnosti léčivých látek nebo ke stabilizaci přípravku. Tyto pomocné látky ovšem nesmí nepříznivě ovlivňovat léčebný účinek přípravku a nesmí místně dráždit. Oční kapky ve vícedávkových obalech by měly obsahovat vhodné protimikrobní látky, které chrání přípravek před mikrobiální kontaminací po celou dobu použitelnosti, avšak po otevření vícedávkového obalu nesmí být doba použití delší než 4 týdny. Lékopis uvádí u očních kapek pouze jednu zkoušku, kterou je velikost částic.²⁷ Nespecifikuje tudíž požadavky na stejnoměrnost dávkových jednotek z vícedávkového obalu.

Dávkování očních kapek je ovlivněno fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčivého přípravku **a vlastnostmi dávkovacího zařízení**, které je představováno kapátkem a kapací lahvičkou.

Teoretickou hmotnost kapky snadno určíme pomocí rozměru kapacího ústí a povrchového napětí přípravku – tyto dva faktory hrají hlavní roli při tvorbě kapky. Čím nižší je povrchové napětí, tím menší kapky se tvoří.²⁸ Menší roli na hmotnost kapky mají ostatní zbylé fyzikálně-chemické vlastnosti jako je teplota, která více či méně ovlivňuje hustotu, viskozitu, povrchové napětí i elasticitu lahvičky. Viskozitní přísady se přidávají pro lubrikační efekt, optimální viskozita je v rozmezí 15 – 25 mPa.s.²⁵

Kapátka mohou mít obvod vymezen hranou či vyhloubením nebo mohou být oblá. Oblá kapátka jsou náchylná ke smáčení, které zvyšuje hmotnost kapky zvětšením efektivního obvodu kapátka a to především při snížení dispenzačního úhlu.²⁸

6.4.2 Dispenzační faktory

Mezi dispenzačními faktory hraje důležitou roli sám pacient a jeho technika kapání, tj. při jakém dispenzačním úhlu a s jakou rychlostí kapky kape (rychlost tvorby kapky). Oba faktory ovlivňují velikost (hmotnost, objem) odkápnuté kapky.

Obecně je doporučeno, aby kapky byly odkapávány ze svislé polohy lahvičky (dispenzační úhel 90°).²⁵ Čím se dispenzační úhel snižuje, tím se zmenšuje i velikost kapky, protože se zmenšuje efektivní obvod kapátka, kde se kapka tvoří.²⁹ Opačný efekt byl pozorován v případě oblého kapátka. Oblé zakončení má při snížení dispenzačního úhlu z vertikální polohy tendenci ke smáčení, tj. ke zvětšování svého efektivního obvodu. Vzniklá kapka je pak větší a současně stoupá i variabilita hmotností jednotlivých kapek.³⁰ Na velikost výsledné kapky má dále vliv rychlost, s jakou je lahvička dispenzačního systému stlačena. Zde vstupuje faktor rigidity lahvičky – pokud je lahvička měkká a lehce stlačitelná, pacient je schopný aplikovat dávku rychleji, než v případě tvrdého a hůře stlačitelného materiálu. Rychleji tvořené kapky (snáze stlačené dávkovací zařízení) má tendenci k tvorbě větších kapek.^{28, 29}

7 Experimentální část

7.1 Použité suroviny

registrovaný přípravek:

Vakcína Poulvac ILT (ATC vet. kód: QI01AD08) (Zoetis, Španělsko)

Voda na injekci v plastových lahvičkách 30 ml (Zoetis, Španělsko)

Voda čištěná (Farmaceutická fakulta)

7.2 Použité přístroje

Tensiometr (výrobce - Krüss, model - K100, Německo)

Traubeho stalagmometr

Hustoměr (výrobce - Anton Paar, model – DMA 4100 M, Rakousko)

Viskozimetr Ubbelohde (výrobce – Sklářny Kavalier, Česká republika)

Analytické váhy (výrobce – Kern, model – ABJ 120-4M, d = 0,1 mg, Německo)

Prototyp přístroje na automatické kapání (Elanco, Španělsko)

7.3 Použité metody

7.3.1 Měření hustoty

Hustotu jsem měřila hustoměrem Anton Paar. Přístroj jsem zapnula a nechala 15 minut stabilizovat. Zkontrolovala jsem nastavení hustoměru vzduch/voda pomocí ultračisté vody a porovнала správnost naměřené hodnoty. Dále jsem nastavila požadovanou teplotu (20 °C nebo 25 °C). Naplnila jsem vzorek do stříkačky a zasunula do bočního vstupu. Následně jsem promyla měřící celu vzorkem. Celu jsem poté vzorkem plnila dokud se na výstupní hadičce neobjevil souvislý sloupec kapaliny. Ujistila jsem se, že byl vzorek bez bublin. Nakonec jsem stlačila tlačítko start.

Hustotu jsem změřila vždy pětkrát (g/ml) při požadované teplotě. Naměřené hodnoty jsem zprůměrovala.

7.3.2 Měření povrchového napětí

Pro měření povrchového napětí jsem použila tensiometr Krüss K100 s platinovou destičkou nebo kroužkem. Měřila jsem povrchové napětí jak rekonstituované vakcíny, tak samotného vehikula při teplotách $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Vzorek jsem naplnila do měřicí nádoby a vytemperovala za pomoci tensiometru na požadovanou teplotu, kterou jsem kontrolovala digitálním teploměrem. Dle návodu jsem tensiometr spustila a měřila jsem sílu potřebnou k odtržení destičky, příp. kroužku od hladiny kapaliny. Po změření vzorku jsem destičku/kroužek opláchla čistou vodou, vyžihala nad kahanem a měření jsem opakovala. Kroužek i destička byly velmi citlivé na dotek, proto jsem je držela za jejich prodlouženou část, kterou se uchytovaly na tensiometr. Opatrně jsem je vždy ponořila do destilované vody a poté vyžihala nad kahanem, abych je zbavila všech případných nečistot, které by mohly ovlivnit hodnoty měření.

Každý vzorek jsem měřila třikrát při obou teplotách, kde program zaznamenal vždy deset hodnot povrchového napětí (mN/m). Vypočítala jsem průměr a směrodatnou odchylku, výsledky jsem zaznamenala do tabulky 1.

Kromě tensiometru jsem povrchové napětí měřila i stalagmometrem, metodou počítání kapek. Stalagmometr jsem nejdříve zkalibrovala pomocí čisté vody. Měření probíhalo za teploty $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

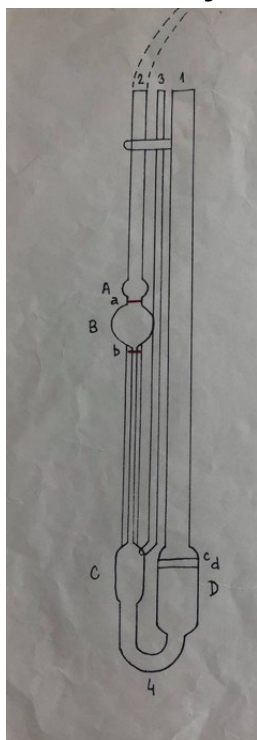
Balonkem jsem nasála kapalinu nad horní rysku, balonek jsem poté sundala a nechala kapalinu samovolně vykapávat do kádinky. Počítala jsem kapky, které se odtrhnou od zabroušeného ústí kapiláry při průchodu kapalinou mezi horní a dolní ryskou.

Zaznamenala jsem počet kapek a vypočítala povrchové napětí dle následující rovnice.³¹

$$\gamma_T = \frac{P_V \cdot \rho_T}{P_T \cdot \rho_V} \cdot \gamma_V \quad (1)$$

Povrchové napětí (γ_T) vzorku, počet kapek vody (P_V), počet kapek zkoumaného vzorku (P_T), hustota vody (ρ_V), hustota vzorku (ρ_T), povrchové napětí vody (γ_V).

7.3.3 Měření viskozity



Obr. 7 – viskozimetr Ubbelohde

Měřila jsem čas průtoku celkem pětkrát a vypočítala jsem průměr. Poté jsem vypočítala kinematickou viskozitu ν (mm^2/s) podle rovnice:

$$\nu = A * t - \left(\frac{2,8}{t}\right) \quad (2)$$

kde A je konstanta viskozimetru ($0,002998 \text{ }^\circ\text{C}/\text{s}$), t je čas (s)

Z kinematické viskozity jsem po dosažení hustoty vypočítala dynamickou viskozitu.

$$\eta = \nu \cdot \rho \quad (3)$$

dynamická viskozita η ($\text{mPa}\cdot\text{s}$), kinematická viskozita (ν), hustota (ρ). Hodnoty kinematické i dynamické viskozity jsou uvedeny v tabulce 1.

7.3.4 Měření hmotnosti kapek

Před experimentální prací bylo nutné nejprve rekonstituovat vakcínu Poulvac ILT smísením lyofilizátu ve skleněné lahvičce s vehikulem, které představovala voda pro injekci v plastové lahvičce. Pomocí plastového nástavce, který jsem nasadila na lahvičku

s lyofilizátem a zároveň na lahvičku s vodou pro injekci, jsem byla schopná důkladně a bez ztráty kapaliny promísit a rozpustit lyofilizát. Po promísení vznikla suspenze krémové barvy, kterou jsem ponechala v plastové lahvičce po vehikulu, na kterou jsem nakonec nasadila plastové kapátko.

Sledovala jsem vliv úhlu kapání DA ($^{\circ}$) 90° , 65° a 45° , objemu roztoku v lahvičce 30 ml, 15 ml, a 5 ml a rychlosti kapání na hmotnost kapky. Hmotnost kapek jsem vážila na analytických vahách s přesností na 0,1 mg.

Kapala jsem manuálně, tj. manuálním stiskem konvenční kapací lahvičky, nebo s použitím poloautomatického kapacího prototypu.

Manuální kapání

Vliv rychlosti kapání na hmotnost kapek jsem pro manuální kapání sledovala třemi způsoby dispenzace kapek – CRD, FRD, CPD, které jsou popsány níže. Těmito způsoby se kapalo při třech dispenzačních úhlech a se všemi třemi objemy.

Konstantní rychlost kapání (CRD, Constant rate dropping)

Při konstantní rychlosti kapání jsem do lahvičky naplnila požadovaný objem přípravku (30 ml, 15 ml nebo 5 ml), připevnila kapátko a při zvoleném dispenzačním úhlu (90° , 60° nebo 45°) jsem pomalým stiskem lahvičky odkápla kapku do předem vytárované kádinky. Kontrolovanou rychlostí jsem eliminovala vliv rychlosti kapání. Hmotnosti deseti jednotlivých kapek jsem zaznamenala do tabulky. Po dvou sériích (20 kapek) jsem lahvičku znovu naplnila počátečním objemem. V průběhu experimentu jsem také každé dvě série obměnila kapátko k zachycení variability vlastností kapátek. Měření jsem opakovala desetkrát; získala jsem tak vždy 100 hodnot při každém úhlu a objemu.

Výsledky pro danou kombinaci faktorů jsem zpracovala do tabulky v MS Excel, z každých deseti zaznamenaných hmotností vypočítala průměr a směrodatnou odchylku (SD), tyto hodnoty jsou shrnuty v tab. 2.

Rychlé kapání (FRD, Fast rate dropping)

Při rychlém kapání jsem do vytárované kádinky co nejrychleji nakapala deset jednotlivých kapek za sebou, přitom změřila čas na stopkách. Celkovou hmotnost jsem

zaznamenala, vyjádřila jsem průměrné hmotnosti jedné kapky a SD a vypočítala čas potřebný pro dispenzaci jedné kapky. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 9, 10 a 11.

Kontinuální kapání (CPD, Continuous pressure dropping)

Při kontinuálním kapání jsem se spuštěním stopek stlačila lahvičku a bez přerušení, tudíž i bez vyrovnání tlaku, jsem do vytárované kádinky nakapala deset kapek. Opět jsem zaznamenala konečnou hmotnost všech deseti kapek, vyjádřila průměrnou hmotnost jedné kapky, SD a čas potřebný pro dispenzaci jedné kapky. Hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 18, 19, 20.

Kromě vlivu úhlu, objemu a rychlosti kapání na hmotnost kapky jsem sledovala děje spojené s chováním kapacího systému, tj. tuhost (flexibilitu) lahvičky a celkové chování přípravku při aplikaci kapek (tvorbu bublinek, smáčení při náklonu, samovolné kapání, apod.).

Automatické kapání

Automatické kapání probíhalo za použití prototypu pouze dvěma způsoby, označenými v souladu s manuálním kapáním jako CRDA a FRDA. Zařízení má lahvičku s přípravkem připevněnou v poloze dnem vzhůru a umožňuje kapat pouze při dispenzačním úhlu 45°. Hmotnost kapek jsem sledovala se všemi třemi objemy (30 ml, 15 ml a 5 ml).

Před vlastním testováním jsem k zařízení upevnila lahvičku s požadovaným objemem vakcíny. Z přístroje jsem odstranila vzduchové bubliny a určeným postupem jsem provedla kalibraci, která byla detailně popsána v návodu. Kalibrace jsem opakovala vždy po výměně náplně lahvičky.

Konstantní kapání (CRDA, Constant rate dropping – automatic)

Metoda CRDA spočívala v tom, že stiskem tlačítka jsem produkovala jednotlivé kapky v souladu s doporučením výrobce prototypu, v sérii po deseti kapkách, a jejich hmotnost jsem zaznamenala. Vypočítala jsem průměr a směrodatnou odchylku SD. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 27.

Rychlé kapání (FRDA, Fast rate dropping – automatic)

U této metody jsem nakapala deset kapek co nejrychleji (v možnostech automatického zařízení) za sebou a hmotnost všech deseti kapek a potřebný čas zaznamenala. Vypočítala jsem průměrnou hmotnost jedné kapky, čas potřebný pro dispenzaci jedné kapky a hodnoty uvedla do tabulky 29.

7.3.5 Vyhodnocení výsledků

Vyhodnocení významnosti vlivu hodnocených faktorů na hmotnost kapek jsem hodnotila pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) na hladině $\alpha = 0,05$.

8 Výsledky a diskuse

V této diplomové práci byly studovány tři faktory: rychlost kapání (design), dispenzační úhel a objem náplně, a jejich vliv na hmotnost komerčních očních kapek pro vakcinaci drůbeže. Výsledky manuální dispenzace z lahvičky s kapátkem byly porovnány s výsledky získanými nově vyvinutým poloautomatickým dávkovacím zařízením. Mimo faktory studované v této diplomové práci dávkování očních kapek ovlivňuje mnoho dalších faktorů zmíněných v teoretické části této práce.

8.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti vakcíny

Fyzikálně chemické vlastnosti přípravku mohou ovlivnit velikost kapky produkované kapacím systémem. V souladu s Tateho zákonem je hmotnost kapky přímo úměrná povrchovému napětí kapaliny a průměru zakončení kapiláry; čím větší povrchové napětí, tím vyšší hmotnost kapky.²⁹ Povrchové napětí lidských slz se nachází mezi 43,0 – 46,0 mN/m. Protože mucin chrání rohovku zajišťováním fyziologické přilnavosti slz k jejímu povrchu, adheze mucinózní vrstvy slz k rohovce nesmí být narušena. Za hraniční hodnotu povrchového napětí očního přípravku je považována hodnota 30 mN/m.²⁸ Ochranná mucinózní vrstva je i u drůbeže a je stejně tak důležitá. Mucin, stejně jako u člověka, je tvořen v pohárkových buňkách spojivky.³²

V této diplomové práci bylo povrchové napětí měřeno dvěma metodami (kroužek, destička). Zjištěná hodnota povrchového napětí 39,64 mN/m je pro Poulvac ILT oproti slzám nižší, ale stále vyhovující (Tab. 1)

Jak je patrné z Tab. 1, hustota přípravku Poulvac ILT byla srovnatelná s vodou a její hodnota mírně klesla při vyšší teplotě 25 °C.

Registrovaný přípravek Poulvac ILT má dynamickou viskozitu 0,989 mPa·s (Tab. 1), tedy srovnatelnou s vodou, protože neobsahuje viskozitní přísadu. Aplikace očních kapek s nízkou viskozitou je charakterizována velmi rychlým odplavením kapky z oka.²⁹ Potřebnou dobu kontaktu přípravku s okem zajišťuje zvýšená viskozita očního přípravku, jejíž optimální uváděné rozmezí je mezi 15 – 30 mPa·s.³³ S rostoucí viskozitou oční přípravky ovlivňují zrakové vnímání, kdy dochází ke zvýšenému odporu pro pohyb víček, k slzení a vytvářejí se depozita okolo víček, krusty a film polymeru na rohovce nebo

řasách. Bylo zjištěno, že pokud je viskozita menší než 15 mPa·s, výslednou hmotnost kapky neovlivňuje.³⁴

Tab. 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti vakcíny (v závorce jsou uvedeny SD)

Hustota (g/ml)	20 °C	1,0028 (0)
	25 °C	1,0016 (0)
Viskozita	ν (mm ² /s)	0,987 (0,99)
	η (mPa·s)	0,989 (0,99)
Povrchové napětí (mN/m)	Kroužek	39,64 (0,52)
	Destička	40,30 (1,12)

8.2 Dispenzace kapek manuálním kapáním

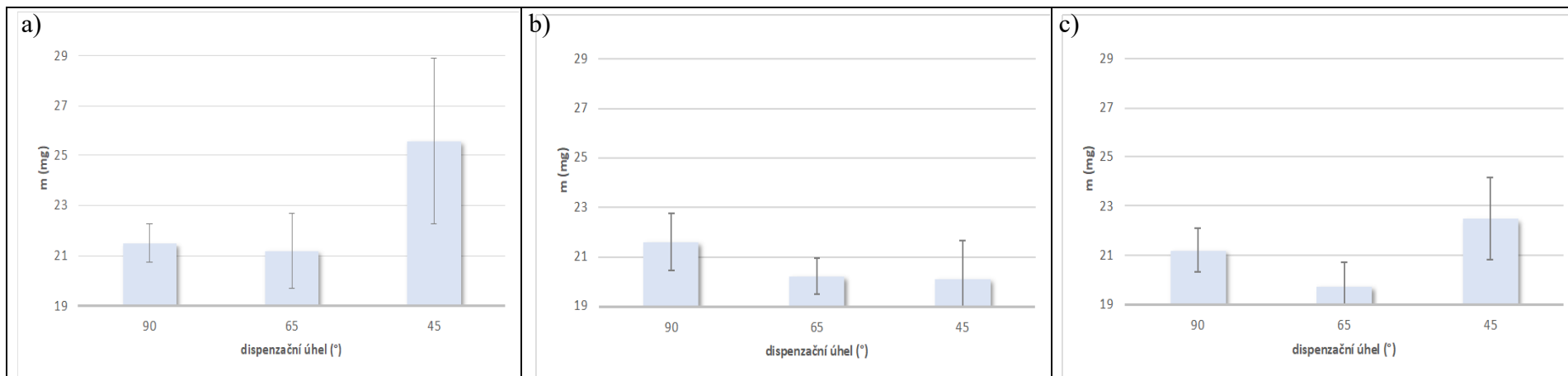
Rychlost kapání a dispenzační úhel jsou řazeny mezi dispenzační faktory ovlivňující hmotnost kapky. Pro hodnocení vlivu rychlosti kapání na hmotnost kapek jsem pro manuální kapání použila tři různé režimy dispenzace kapek, lišící se stiskem plastové lahvičky: standardní kapání (CRD), rychlé kapání (FRD) a kapání s použitím kontinuálního stlačení (CPD).

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2, 9 - 11, 18 - 20 a na obrázcích 8 -13 v kombinaci s dalšími studovanými faktory – dispenzačním úhlem a objemem náplně lékovky. Tabulky 3 – 8, 12 – 17 a 21 - 26 uvádí výsledky analýzy rozptylu (ANOVA).

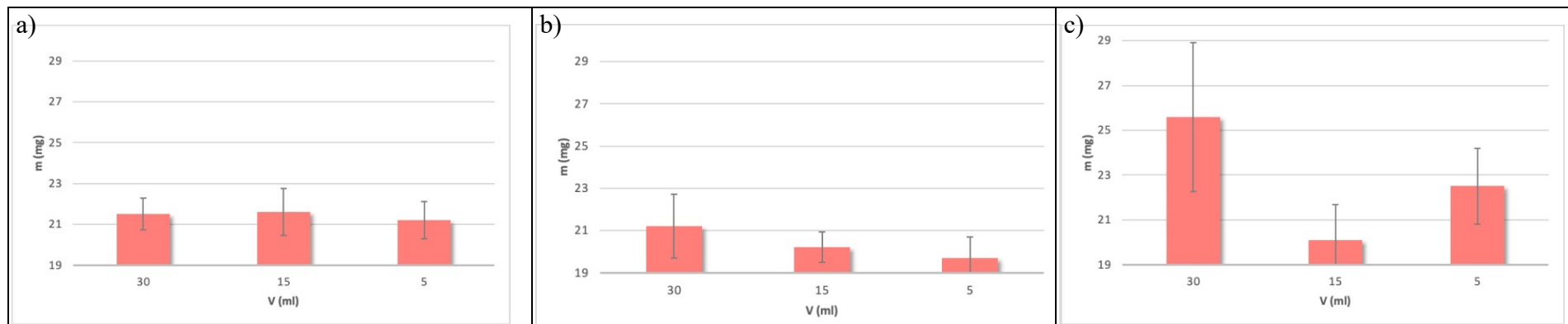
8.2.1 CRD

Tab. 2: Vliv dispenzačního úhlu a objemu vakcíny na hmotnost kapek (mg) při dispenzačním režimu CRD.

hmotnost kapek (mg)	30 ml			15 ml			5 ml		
	90°	65°	45°	90°	65°	45°	90°	65°	45°
1	22,1	19,4	26,2	21,9	20,5	17,3	19,6	20,2	21,5
2	22,2	20,1	30,9	22,4	20,8	18,2	21,2	20,6	22,1
3	20,8	23,2	23,8	21,8	19,0	20,4	21,6	19,4	21,9
4	20,1	23,4	25,0	21,9	19,8	20,3	22,2	21,3	24,2
5	21,1	23,0	28,6	21,9	20,3	21,3	21,4	19,7	25,3
6	21,1	20,3	30,7	22,0	20,5	21,3	22,6	19,8	19,8
7	22,0	21,6	23,0	19,1	20,3	19,2	20,8	19,8	21,0
8	22,3	21,1	22,2	19,8	20,2	19,0	21,2	19,9	23,8
9	21,2	19,6	22,8	22,4	19,2	22,0	20,1	18,2	23,8
10	22,2	20,8	23,2	22,4	21,5	21,6	21,7	18,0	21,7
průměr	21,5	21,2	25,6	21,6	20,2	20,1	21,2	19,7	22,5
SD	0,76	1,51	3,32	1,15	0,72	1,57	0,90	0,99	1,69



Obr. 8: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapek (mg) při objemu a) 30 ml, b) 15 ml a c) 5 ml a dispenzačním režimu CRD



Obr. 9: Vliv objemu na hmotnost kapek (mg) při dispenzačním úhlu a) 90°, b) 65° a c) 45° a dispenzačním režimu CRD

Termínem standardní kapání (CRD) lze označit aplikaci pomalým stiskem lahvičky, která vede k produkci kapky. Při tomto režimu kapání byl sledován vliv dispenzačního úhlu a objemu vakcíny v lékovce na hmotnost kapky. Výsledky hodnocení vlivu úhlu kapání 90°, 65° a 45° a objemů náplně 30 ml, 15 ml a 5 ml jsou uvedeny v tabulce 2 a zobrazeny na obrázcích 8 a 9. Jsou uvedeny vždy souhrny deseti průměrných hodnot hmotnosti kapky, které jsem vypočítala vždy z deseti jednotlivých naměřených hmotností, tj. z celkových 100 hodnot.

Víme, že změna úhlu dispenzace ovlivňuje hmotnost kapky.^{25, 26, 28, 29, 30} Při vertikálním kapání (dispenzační úhel 90°) je hmotnost kapky přímo úměrná povrchovému napětí přípravku a efektivnímu obvodu kapátka (Tateho zákon).²⁹ Při naklánění lahvičky ze svislé polohy se zmenšuje efektivní obvod kapátka, na kterém kapka vzniká, a kapka se proto zmenšuje.^{29, 30, 35}

Vliv dispenzačního úhlu při různém objemu náplně lahvičky je ilustrován na obr. 8 a-c, naopak vliv objemu náplně lahvičky při zvoleném dispenzačním úhlu 90°, 65° a 45° je ilustrován na obr. 9 a-c.

Při počátečním objemu přípravku 30 ml je z obr. 8a zřejmé, že hmotnost kapky se snížením úhlu na 65° snížila v souladu s teoretickými předpoklady, ale při dispenzačním úhlu 45° se zvýšila. Současně s tím byla zaznamenána i vyšší variabilita naměřených hodnot. Jak ukazují obr. 8b a 8c, při odklonu od vertikálního kapání, ovlivňuje hmotnost kapky nejen úhel, ale také objem přípravku.

Vliv objemu náplně je samostatně zachycen na obr. 9. Při úhlu 90° byla hmotnost kapky pro náplně 5 - 30 ml přibližně 21 mg a byla ovlivněna pouze variabilitou experimentálního stanovení (obr. 9a). Při dispenzačním úhlu 65° (obr. 9b) již byl patrný mírný pokles hmotnosti kapky (z 21,2 mg na 20,2 až na 19,7 mg) při zmenšení objemu přípravku v obalu. Při dalším snížení dispenzačního úhlu (45°) byly však v hmotnosti kapky pozorovány rozdíly oproti svislému kapání. Zatímco při náplni 30 ml se průměrná hmotnost kapky zvýšila (21,5 mg vs. 25 mg), při náplni 15 ml byla nižší (21,6 mg vs. 20,1 mg) a při náplni 5 ml opět vyšší (21,2 mg vs. 22,5 mg).

Přechozími studiemi bylo zjištěno, že hmotnost kapky může být při změně dispenzačního úhlu ovlivněna i smáčením kapátka. K častějšímu smáčení kapátka dochází u roztoků s nižší hodnotou povrchového napětí. Na smáčení kapátka má vliv i tvar zakončení kapátka.²⁹ Zejména u kapalin s povrchovým napětím menším než 45 mN/m může při

snížení dispenzačního úhlu na 45° docházet ke smáčení zevní boční stěny kapátka, a to především u zaoblených kapátek, díky čemuž má vytvořená kapka vyšší hmotnost.³⁶ Kapátko použitého komerčního dispenzačního systému mělo tvar zaoblený a výše komentované výsledky pro úhel 45° tedy potvrzují literární údaje, zejména při náplni 30 ml.

Významnost studovaných faktorů při konstantní rychlosti kapání byla hodnocena pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Ze statistických údajů v tabulkách 3 – 5 vyplývá, že dispenzační úhel má na hmotnost kapky významný vliv při všech objemech v rozmezí 5 – 30 ml.

Tab. 3: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 30 ml a režimu CRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	1200,088	2	600,044	101,29	< 0,01	3,03
Všechny výběry	1759,444	297	5,92			
Celkem	2959,532	299				

Tab. 4: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 15 ml a režimu CRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	138,817	2	69,408	39,25	< 0,01	3,03
Všechny výběry	525,183	297	1,77			
Celkem	664	299				

Tab. 5: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 5 ml a režimu CRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	399,313	2	199,657	105,49	< 0,01	3,03
Všechny výběry	562,136	297	1,89			
Celkem	961,45	299				

U plastových kapacích systémů byl studován vliv objemu přípravku v lahvičce na výslednou hmotnost kapky a bylo zjištěno, že při objemu 4 – 10 ml je vliv na hmotnost kapek nevýznamný.²⁸ Výsledky této práce ale ukazují, že s výjimkou dispenzačního úhlu 90° - svislé kapání ovlivnil objem náplně hmotnost kapky významně ($P < 0,01$, viz tab. 7 a 8) a navíc se s nižším objemem zvyšovala variabilita.

Tab. 6: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu dispenzace 90° a režimu CRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	5,521	2	2,76	1,94	0,15	3,03
Všechny výběry	423,379	297	1,43			
Celkem	428,899	299				

Tab. 7: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu dispenzace 65° a režimu CRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	1548,742	2	774,3621	119,25	< 0,01	3,03
Všechny výběry	1928,581	297	6,49			
Celkem	3477,305	299				

Tab. 8: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu dispenzace 45° a režimu CRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	126,373	2	63,187	37,93	< 0,01	3,03
Všechny výběry	494,804	297	1,67			
Celkem	621,177	299				

Standardní dispenzací kapek bylo potvrzeno, že zmenšováním dispenzačního úhlu se snižuje hmotnost kapky, objem za standardních podmínek, tj. dispenzační úhel 90° a náplň 30 ml, nemá na hmotnost kapky vliv. Z výsledků je zřejmé, že vertikální kapání očních kapek za podmínek kontrolovaného stisku lahvičky lze doporučit pro eliminaci vlivu objemu náplně a snížení variability hmotností. To je důležité zejména u systémů s oblým kapátkem.

8.2.2 FRD

Režim dispenzace FRD (*fast rate dropping*) se provádí rychlým nakapáním kapek pomocí stisků lahvičky rychle za sebou. Zároveň je měřen čas, který je pro dispenzaci deseti kapek potřeba. Měřila jsem vždy hmotnost série deseti kapek a čas potřebný pro jejich dispenzaci. Do tabulek 9 – 11 jsem zaznamenala průměrnou hmotnost jedné kapky, čas potřebný pro dispenzaci deseti kapek a směrodatnou odchylku deseti měření. Dispenzace opět probíhala pod úhlem 90°, 65° a 45° s objemy 30 ml, 15 ml a 5 ml.

Tab. 9: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapky (mg) a čas potřebný pro nakapání deseti kapek při objemu 30 ml a dispenzačním režimu FRD.

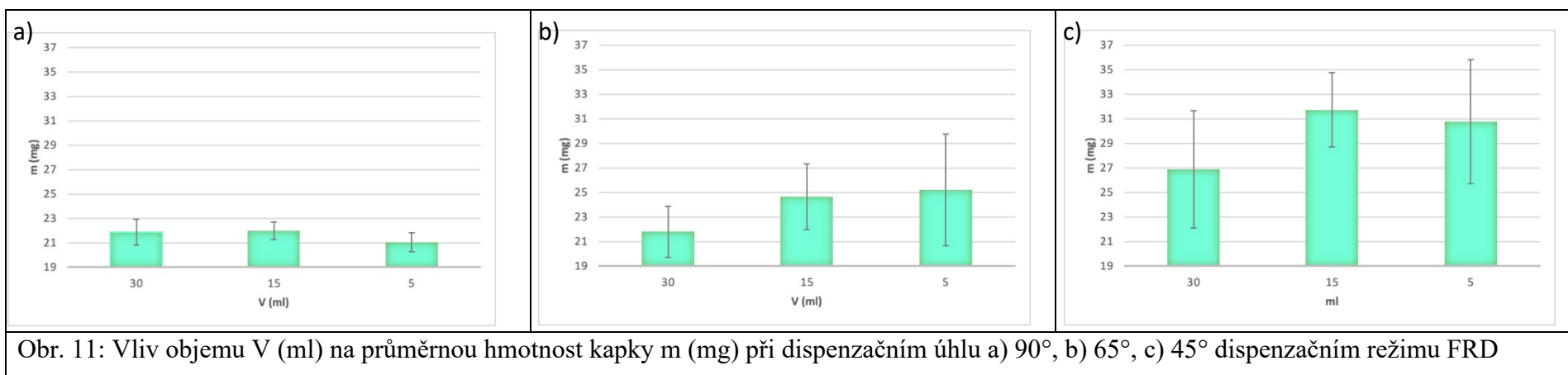
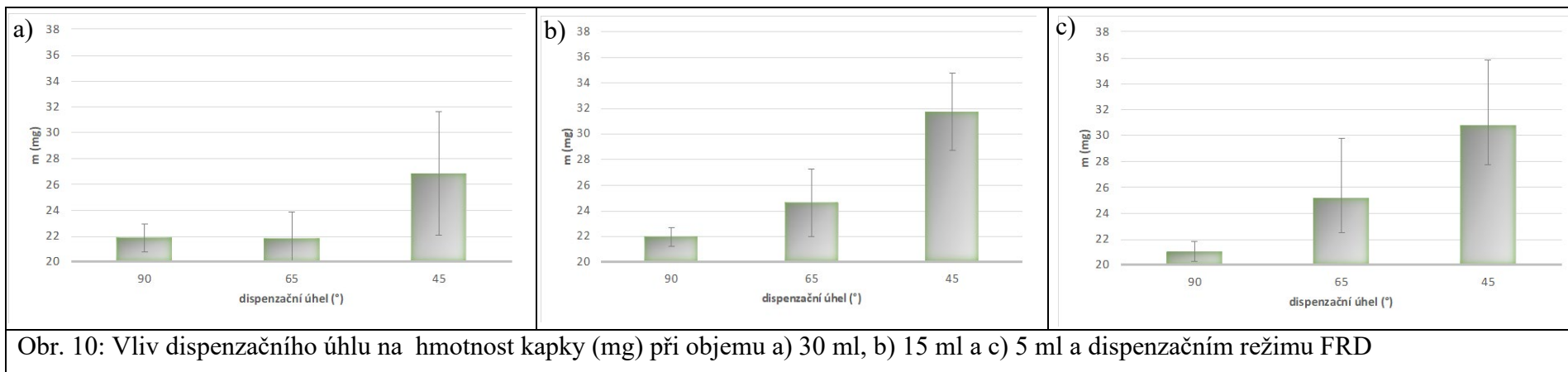
Kapání	90°	čas (s)	65°	čas (s)	45°	čas (s)
1	22,0	17,8	20,4	12,3	32,0	18,1
2	21,8	16,0	21,7	13,1	22,4	14,7
3	22,6	22,0	19,1	12,8	32,0	15,9
4	21,1	13,9	22,9	14,5	32,2	13,5
5	20,2	14,9	21,1	16,1	30,0	13,7
6	21,3	13,7	22,8	14,6	29,6	12,7
7	24,2	16,3	26,7	12,6	22,4	12,4
8	21,3	13,8	22,1	12,0	21,4	13,9
9	22,2	14,5	21,3	11,3	20,9	12,3
10	21,7	14,3	20,1	11,4	25,9	13,8
průměr	21,9	15,7	21,8	13,1	26,9	14,1
SD	1,1	2,6	2,1	1,5	4,6	1,8

Tab. 10: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapky (mg) a čas potřebný pro nakapání deseti kapek při objemu 15 ml a dispenzačním režimu FRD.

Kapání - pokusy	90°	čas (s) pro 90°	65°	čas (s) pro 65°	45°	čas (s) pro 45°
1	20,9	13,5	27,1	15,1	34,4	15,3
2	22,4	15,0	28,8	16,0	34,5	15,1
3	21,9	13,2	28,9	15,4	36,0	11,8
4	20,6	18,3	23,2	15,2	31,5	12,0
5	22,1	13,6	22,3	15,4	32,3	14,0
6	22,1	14,6	23,3	15,5	33,7	12,1
7	21,7	15,2	22,2	14,7	26,1	11,7
8	22,4	13,2	22,2	13,9	29,6	14,9
9	22,9	15,8	23,7	14,7	30,0	15,1
10	22,6	14,6	24,9	17,4	29,3	17,2
Výsledný průměr	22,0	14,7	24,7	15,3	31,7	13,9
Směrodatná odchylka	0,7	1,6	2,7	0,9	3,0	1,9

Tab. 11: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapky (mg) a čas potřebný pro nakapání deseti kapek při objemu 5 ml a dispenzačním režimu FRD.

Kapání - pokusy	90°	čas (s) pro 90°	65°	čas (s) pro 65°	45°	čas (s) pro 45°
1	20,2	15,0	30,5	16,8	19,6	15,4
2	20,9	12,2	31,4	15,9	36,0	16,6
3	20,7	14,9	32,5	16,4	37,4	15,9
4	21,0	15,4	23,7	15,5	30,2	11,3
5	21,7	14,5	24,7	13,5	29,9	14,1
6	19,8	13,5	22,0	14,1	33,9	12,2
7	21,9	17,9	21,3	16,1	34,1	14,3
8	21,7	13,9	22,3	15,3	29,2	17,9
9	22,0	15,4	20,1	11,9	28,3	15,9
10	20,3	15,9	23,5	12,7	29,1	14,1
Výsledný průměr	21,0	14,9	25,2	14,8	30,8	14,8
Směrodatná odchylka	0,8	1,5	4,6	1,7	5,1	2,0



Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulkách 9 – 11. Vliv dispenzačního úhlu při různém objemu přípravku je ilustrován na obrázku 10 a vliv dispenzačního objemu při změnách dispenzačního úhlu na obrázku 11.

Z obr. 10 je patrné, že s výjimkou počátečního objemu 30 ml (obr 10a), kdy se při snížení na 65° hmotnost kapky snížila, pozorujeme, že se hmotnost kapky se snižováním dispenzačního úhlu hmotnost zvyšuje. V případě objemu 15 ml (obr 10b) až o téměř 10 mg při porovnávání svislé polohy s úhlem 45° v důsledku smáčení kapátka. Při všech objemech náplně byl vliv dispenzačního úhlu významný (ANOVA, $P < 0,01$) díky tvaru kapátka a nižšímu povrchovému napětí vakcíny (tab. 12 – 15).

Tab. 12: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 30 ml a režimu FRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	169,624	2	84,812	8,99	< 0,01	3,35
Všechny výběry	254,46	27	9,423			
Celkem	424,084	29				

Tab. 13: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 15 ml a režimu FRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	509,355	2	254,678	45,82	< 0,01	3,35
Všechny výběry	150,083	27	5,56			
Celkem	659,439	29				

Tab. 14: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 5 ml a režimu FRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	477,540	2	238,77	15,26	< 0,01	3,35
Všechny výběry	422,503	27	15,648			
Celkem	900,043	29				

Zkoumáním záznamů pro vliv objemu na hmotnost kapky vidíme, že při úhlu 90° (tab. 15) objem přípravku měl na výslednou hmotnost kapky vliv ($P=0,044$), přestože hmotnost kapky byla téměř stejná pro všechny tři objemy (~ 21,6 mg). Rovněž při úhlu 45° byl prokázán významný vliv objemu (tab. 17, $P = 0,046$); průměrná hmotnost kapek byla 25,2 mg při objemu 15 ml a 30,8 mg při objemu 5 ml. Nejvyšší variabilita byla pozorovatelná pro 5 ml. Pro úhel 65° nebyla významnost prokázána ($P = 0,061$), i když se hmotnost kapky převážně se snižujícím objemem zvyšovala, až o 20%. Příčinou byla vysoká variabilita výsledků.

Tab.15: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu 90° a režimu FRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	5,272	2	2,636	3,52	0,044	3,35
Všechny výběry	20,197	27	0,750			
Celkem	25,470	29				

Tab. 16: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu 65° a režimu FRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	66,709	2	33,354	3,11	0,061	3,35
Všechny výběry	289,732	27	10,731			
Celkem	356,441	29				

Tab. 17: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu 45° a režimu FRD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	132,678	2	66,339	3,46	0,046	3,35
Všechny výběry	517,117	27	19,152			
Celkem	649,795	29				

Praktický význam měl v této části experimentu čas pro aplikaci deseti kapek, který se pohyboval od 13 do 16 s.

Rychlosti stisku lahvičky, která ovlivňuje hmotnost kapky se při běžné aplikaci nepřikládá tak velký důraz, protože pacient ve většině případů aplikuje pouze jednu kapku.³⁰ Pro kontext této diplomové práce rychlost ovšem význam má z důvodu efektivní vakcinace většího počtu kuřat. Porovnání průměrné hmotnosti kapky při režimu CRD a FRD ukazuje, že při rychlejším kapání je hmotnost kapky vyšší. Výjimkou je dispenzační úhel 90°. Při pomalém stisku dochází k pomalé tvorbě kapky a u ústí kapátka tak zůstane neodtržený zbytek kapaliny, tudíž finální hmotnost kapky je menší. Při rychlém kapání dodáváme jednotlivým kapkám větší impuls a kapky se tak odtrhnou celé.²⁹

8.2.3 CPD

Za režimu kontinuálního stlačení CPD jsem na jedno stlačení lahvičky odkapala deset kapek a změřila čas. Touto metodou kapání, mohl být eliminován vliv nasávání vzduchu do lahvičky a tím nežádoucí tvoření bublin, které mají vliv na variabilitu hmotností

kapek.³⁰ Kapala jsem deset sérií při úhlech 90°, 65°, 45° a při dispenzačních objemech 30 ml, 15 ml a 5 ml. V tabulce 18 – 20 jsou uvedeny průměrné hodnoty jedné kapky z příslušných deseti měření, čas potřebný pro dispenzaci kapky a směrodatné odchylky. Vlivy dispenzačního úhlu při daných objemech přípravku jsou zobrazeny na obr. 12 a vlivy objemu náplně při různých úhlech shrnuty na obr. 13. S výjimkou pro úhel 65° a náplň 30 ml vedlo snížení dispenzačního úhlu ke zvýšení hmotnosti kapky (obr. 12 a – c). Při všech objemech měl dispenzační úhel významný vliv ($P < 0,01$) na hmotnost kapky (tabulky 21 – 23) vlivem smáčení zaobleného kapátka při náklonu. Navíc byla zaregistrována vysoká variabilita, kdy se hmotnost kapky lišila při kombinaci úhlu 45° a objemu 5 ml o více než 50% pro nesmáčené a smáčené kapátko.

Tab. 18: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapky (mg) a čas potřebný pro nakapání deseti kapek při objemu 30 ml a dispenzačním režimu CPD.

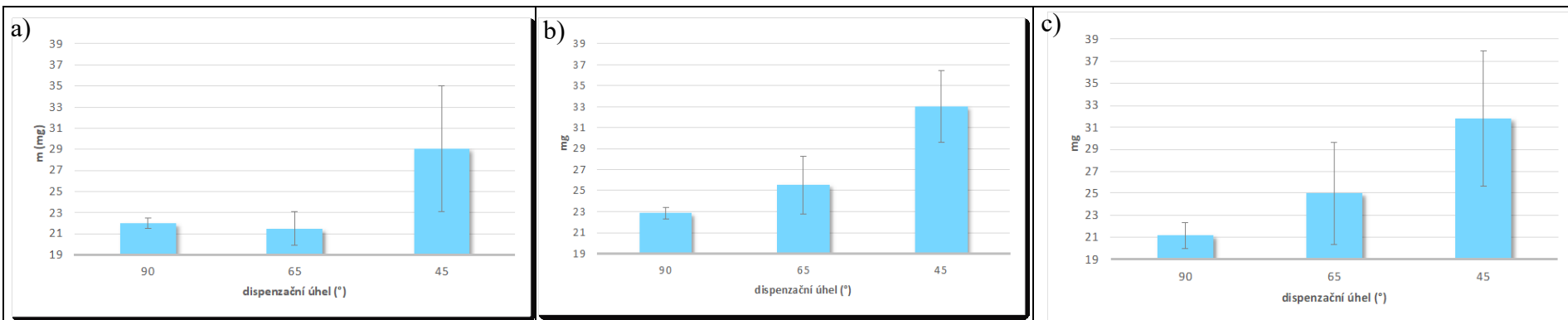
Kapání - pokusy	90°	čas (s) pro 90°	65°	čas (s) pro 65°	45°	čas (s) pro 45°
1	22,4	7,6	23,5	9,0	34,5	9,1
2	21,8	8,7	21,6	8,0	23,7	8,3
3	22,2	8,4	19,0	7,2	34,8	9,8
4	22,6	8,0	21,1	8,8	36,3	9,8
5	21,3	8,2	21,2	6,7	33,4	9,2
6	21,6	8,0	23,8	6,7	32,7	9,8
7	22,0	8,0	20,1	7,1	28,7	8,1
8	21,5	7,8	23,3	9,4	21,8	8,1
9	22,5	7,6	20,7	8,5	20,9	7,1
10	22,6	8,7	20,6	8,1	24,2	8,8
Výsledný průměr	22,0	8,1	21,5	7,9	29,1	8,8
SD	0,5	0,4	1,6	1,0	6,0	0,9

Tab. 19: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapky (mg) a čas potřebný pro nakapání deseti kapek při objemu 15 ml a dispenzačním režimu CPD.

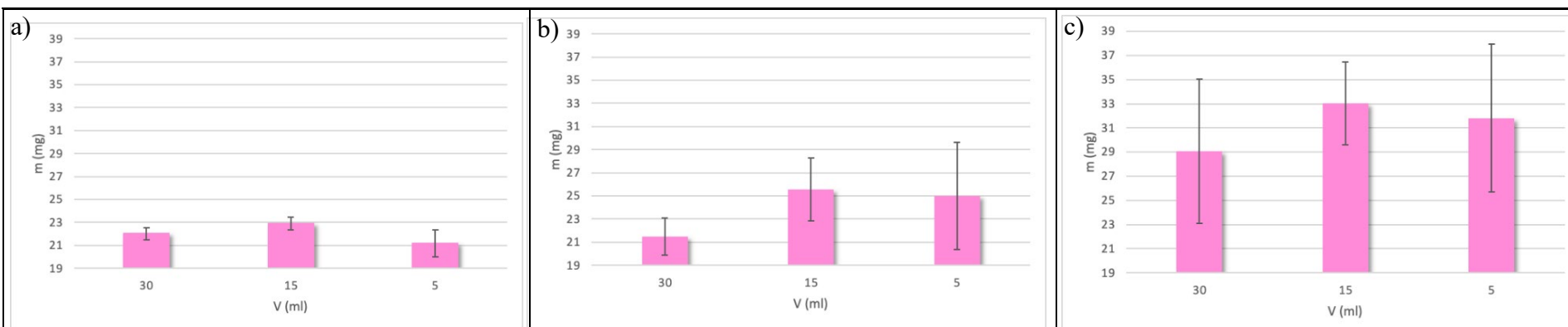
Kapání - pokusy	90°	čas (s) pro 90°	65°	čas (s) pro 65°	45°	čas (s) pro 45°
1	22,8	7,5	28,1	7,5	35,7	8,9
2	23,0	7,1	29,5	7,3	35,4	9,3
3	23,6	6,8	30,0	6,4	35,6	8,9
4	21,7	7,4	25,5	5,9	37,3	7,9
5	23,2	7,1	23,3	6,7	34,5	6,7
6	23,1	6,8	24,5	6,5	35,0	6,5
7	22,3	7,6	22,1	6,5	27,7	7,4
8	23,0	6,9	23,7	7,4	29,6	8,2
9	22,8	8,5	24,0	8,3	30,7	10,3
10	23,4	8,0	24,7	7,0	29,0	8,4
Výsledný průměr	22,9	7,4	25,5	7,0	33,1	8,3
Směrodatná odchylka	0,6	0,6	2,7	0,7	3,4	1,2

Tab. 20: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapky (mg) a čas potřebný pro nakapání deseti kapek při objemu 5 ml a dispenzačním režimu CPD.

Kapání - pokusy	90°	čas (s) pro 90°	65°	čas (s) pro 65°	45°	čas (s) pro 45°
1	18,5	6,0	28,3	8,0	19,6	6,2
2	20,2	5,8	32,3	9,3	37,5	7,8
3	20,6	9,9	32,4	10,1	35,5	7,1
4	21,8	7,3	25,1	7,3	32,6	6,7
5	22,3	10,2	25,5	6,5	31,8	5,9
6	21,3	6,8	19,8	6,0	40,8	6,9
7	22,1	6,6	21,3	6,5	35,4	7,0
8	21,1	6,3	22,3	7,3	25,3	6,8
9	22,1	5,3	22,1	8,6	29,7	6,6
10	22,1	7,6	21,0	7,0	29,9	6,3
Výsledný průměr	21,2	7,2	25,0	7,6	31,8	6,7
Směrodatná odchylka	1,2	1,7	4,6	1,3	6,1	0,5



Obr. 12: Vliv dispenzačního úhlu na hmotnost kapky (mg) při objemu a) 30 ml, b) 15 ml a c) 5 ml a dispenzačním režimu CPD



Obr. 13: Vliv objemu V (ml) na průměrnou hmotnost kapky m (mg) při dispenzačním úhlu a) 90°, b) 65°, c) 45° a dispenzačním režimu CPD

Vliv dispenzačního úhlu při daných objemech přípravku jsou zobrazeny na obr. 12. Se snižováním dispenzačního úhlu se hmotnost kapky lineárně zvyšovala, s výjimkou pro úhel 65° při objemu náplně 30 ml. Současně narůstá variabilita. Jak ukazuje obr. 13c, největší problémy s dávkováním byly zaznamenány při DA 45° pro všechny použité objemy náplně; pro úhel 65° byla vyšší hmotnost kapky zaznamenána pouze pro objemy 15 ml a 5 ml.

Z analýzy rozptylu (ANOVA) v tab. 24 a 25 vyplývá významnost vlivu objemu při dispenzačním úhlu 90° a 65°, zatímco pro úhel 45° byl vliv objemu přípravku na hmotnost kapky nevýznamný (tab. 26, P = 0,24). V tomto případě je hodnocení ovlivněno vysokou variabilitou výsledků.

Tab. 21: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 30 ml a režimu CPD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	357,916	2	178,958	14,03	< 0,01	3,35
Všechny výběry	344,5	27	12,76			
Celkem	702,412	29				

Tab. 22: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 15 ml a režimu CPD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	556,136	2	278,068	43,03	< 0,01	3,35
Všechny výběry	174,494	27	6,46			
Celkem	730,631	29				

Tab. 23: Výsledky hodnocení významnosti vlivu dispenzačního úhlu při objemu 5 ml a režimu CPD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	579,669	2	289,834	14,35	< 0,01	3,35
Všechny výběry	545,426	27	20,20			
Celkem	1125,095	29				

Tab. 24: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu 90° a režimu kapání CPD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	14,45	2	7,225	10,91	< 0,01	3,35
Všechny výběry	17,888	27	0,663			
Celkem	32,339	29				

Tab. 25: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu 65° a režimu kapání CPD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	96,619	2	48,310	4,63	0,02	3,35
Všechny výběry	281,755	27	10,445			
Celkem	378,375	29				

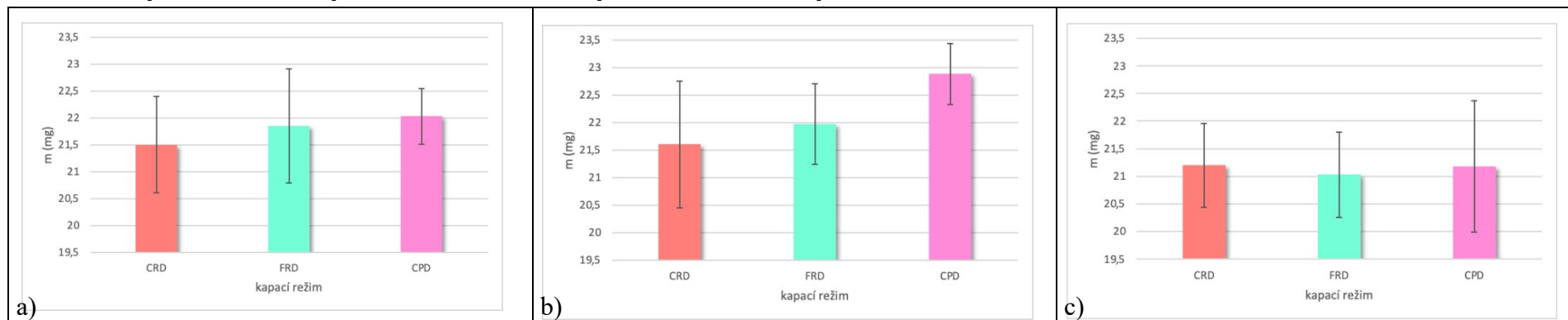
Tab. 26: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při úhlu 45° režimu kapání CPD (ANOVA).

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	82,848	2	41,424	1,46	0,24	3,35
Všechny výběry	746,774	27	28,33			
Celkem	847,622	29				

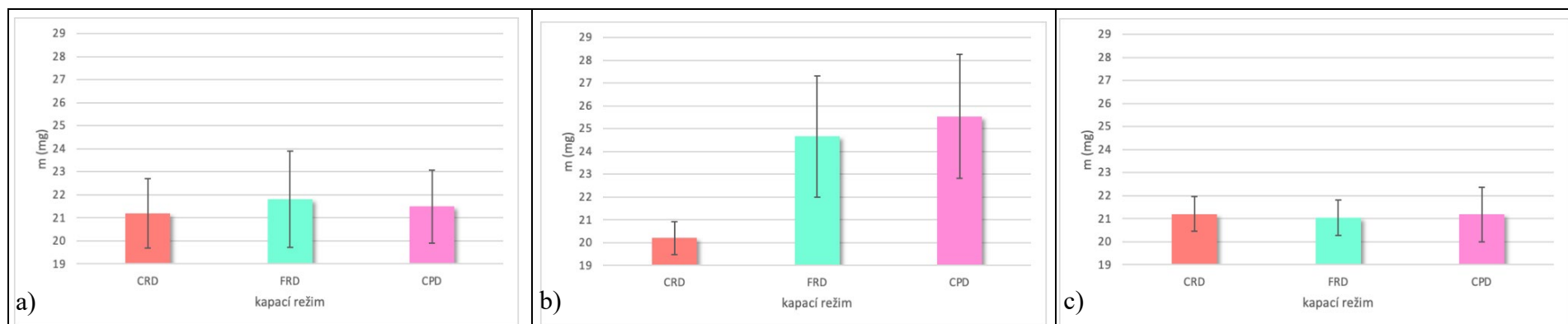
Obecně platí, že čím je objem kapaliny v lahvičce menší, tím více vzduchu v lahvičce je a tím větší síla musí být použita k produkci kapky. Síla použitá při bočním stisku lahvičky pomocí palce a ukazováčku je nepřímo aplikovaná na vzduch nacházející se v lahvičce nad kapalinou, přes zvyšování hladiny kapaliny. Když se lahvička nakloní, například na úhel 45°, dochází ke zvětšení plochy rozhraní voda/vzduch uvnitř lahvičky oproti svislé poloze, avšak poměr objemu vzduchu ani vody se nemění. Přesto je potřeba aplikovat větší sílu na stisk lahvičky, aby došlo ke zvýšení hladiny kapaliny v lahvičce, která nyní musí stoupnout výše, aby se vytvořil stejný vnitřní tlak vzduchu jako při svislé poloze. Naklonění lahvičky má tak za následek delší dobu dávkování a nutnost použít větší sílu k aplikaci menších kapek.²⁹

Z výsledků v tabulkách 18 – 20 vidíme, že oproti svislé poloze se čas aplikace deseti kapek prodloužil při dispenzačním úhlu 45° pro objemy 30 ml a 15 ml, v případě 15 ml se čas prodloužil o 8,1%. Při úhlu 65° se naopak čas aplikace zkrátila pro oba objemy v porovnání s 90°. Přesně naopak to bylo pro objem 5 ml, kdy zatímco se čas aplikace zvýšil o půl vteřiny pro dispenzační úhel 65°(oproti svislé poloze), pro 45° se čas naopak o půl vteřiny snížil oproti svislé poloze.

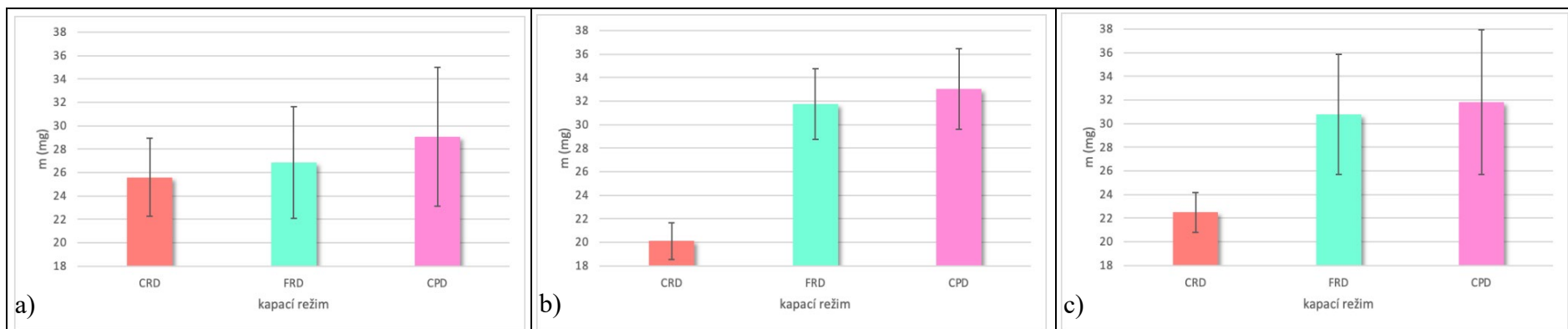
8.2.4 Vliv použitého dispenzačního režimu při manuální dispenzaci



Obr. 14: Vliv režimu dispenzace na hmotnost kapky při dispenzačním úhlu 90° a objemu a) 30 ml, b) 15 ml, a c) 5 ml a režimech dispenzace CRD, FRD, CPD při manuálním kapání



Obr. 15: Vliv režimu dispenzace na hmotnost kapky při dispenzačním úhlu 65° a objemu a) 30 ml, b) 15 ml, a c) 5 ml a režimech dispenzace CRD, FRD, CPD při manuálním kapání



Obr. 16: Vliv režimu dispenzace na hmotnost kapky při dispenzačním úhlu 45° a objemu a) 30 ml, b) 15 ml, a c) 5 ml a režimech dispenzace CRD, FRD, CPD při manuálním kapání

Přehledové obrázky 14 – 16 porovnávají vliv režimu manuální dispenzace na hmotnost kapky v kombinaci s již diskutovanými faktory úhlu a objemu. Je patrné, že při úhlu 90° (svislé kapání) je vliv hodnocených faktorů i rychlosti kapání nejmenší a hmotnost kapky srovnatelná (21,5 – 22 mg). Hmotnost kapky byla vyšší při rychlém kapání (FRD i CPD) oproti doporučenému pomalému kapání, zejména při náklonu; současně se zvyšovala variabilita dávky. Nejmenší vliv snížení dispenzačního úhlu z 90° na 65° je patrný pro plnou lahvičku (objem 30 ml), nejmenší vliv měla redukce objemu při konstantní rychlosti kapání CRD.

8.3 Dispenzace kapek pomocí prototypu

Prototyp dávkovacího automatu byl vyvinut za účelem snížení variability hmotnosti kapky a zkrácení celkového času vakcinace. Aby bylo možné dispenzovat kapky, musí být kapací lahvička ve svislé poloze (požadavek výrobce). Dávkovací kapilára tak produkuje kapky při úhlu cca 45° a vliv dispenzačního úhlu tudíž nemohl být hodnocen. Dispenzace a měření hmotnosti kapek probíhalo při objemu 30 ml, 15 ml a 5 ml.

8.3.1 CRDA

Produkce kapek v tomto režimu probíhala podle instrukcí stiskem tlačítka a odkápnutím kapky. Odkapala jsem deset sérií vždy po deseti kapkách s celkovým počtem 100 hodnot. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 27.

I když při snižování objemu přípravku v lahvičce hmotnost kapky mírně rostla, vliv objemu na výslednou hmotnost kapky byl nevýznamný (tab. 28, $P = 0,05$). Překvapivě byly zaregistrovány poměrně vysoké hodnoty směrodatné odchylky. Příčinou byla občasná blokáda dávkovacího zařízení částicemi vakcíny přítomnými v přípravku.

Tab. 27: Vliv objemu náplně na hmotnost kapek (mg) při dispenzačním režimu CRDA.

Kapání	30 ml	15 ml	5 ml
1	28,4	29,5	26,6
2	27,9	29,6	27,1
3	25,7	28,4	27,8
4	24,4	27,7	25,7
5	24,0	26,4	28,2
6	24,2	29,4	27,9
7	25,9	28,8	28,6
8	27,4	26,3	28,6
9	28,4	22,3	28,2
10	29,7	24,8	28,1
průměr	26,6	27,3	27,7
SD	2,0	2,4	0,9

Tab. 28: Výsledky hodnocení významnosti vlivu objemu při režimu kapání CRDA (ANOVA)

Zdroj variability	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina pravděpodobnosti	F-kritická
Mezi výběry	60,384	2	30,192	2,95	0,05	3,03
Všechny výběry	3036,847	297	10,23			
Celkem	3097,231	299				

8.3.2 FRDA

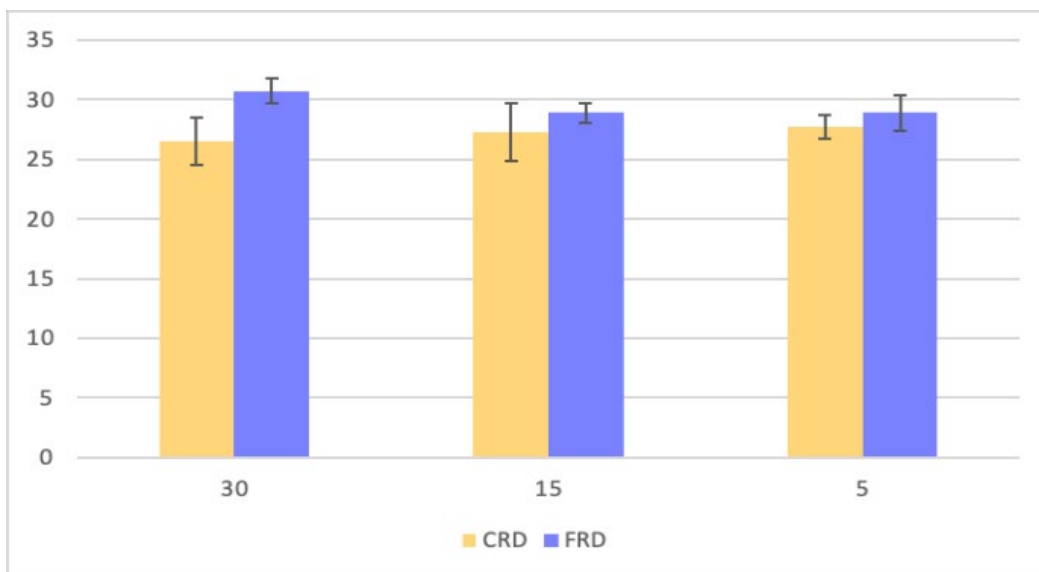
Metoda rychlého kapání spočívala v odkapání deseti kapek za sebou, co nejrychleji, jak bylo možné; současně jsem měřila čas dispenzace. Opět jsem kapala se všemi třemi objemy v deseti sériích vždy po deseti kapkách. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 29 včetně času na produkci deseti kapek.

Tab. 29: Vliv objemu na hmotnost kapek (mg) a čas potřebný pro nakapání deseti kapek (s) při dispenzačním režimu FRDA.

Kapání - pokusy	30 ml	čas (s) pro 30 ml	15 ml	čas (s) pro 15 ml	5 ml	čas (s) pro 5 ml
1	31,6	9,2	28,3	11,0	28,2	11,2
2	31,3	10,3	29,5	10,3	27,5	11,8
3	30,2	11,4	29,9	11,6	29,2	12,9
4	29,1	10,1	29,8	10,1	27,5	13,8
5	32,4	10,2	29,1	10,9	31,7	10,1
6	29,9	11,3	28,9	10,5	31,2	9,6
7	30,1	12,4	28,6	10,8	28,1	10,2
8	31,2	11,7	27,7	11,5	29,4	10,9
9	31,8	9,3	29,3	13,0	28,1	9,7
10	29,9	11,4	27,8	11,3	28,2	11,6
Výsledný průměr	30,8	10,7	28,9	11,1	28,9	11,2
Směrodatná odchylka	1,1	1,1	0,8	0,9	1,5	1,4

Největší hmotnost kapky (30,8 mg) se zároveň nejkratším časem byla zaznamenána pro objem 30 ml. Pro zbylé dva dispenzační objemy byly průměrné hmotnosti kapky i jejich dispenzační časy velmi podobné, s rozdílem ve směrodatných odchylkách. Pro objem 5 ml byla směrodatná odchylka téměř o polovinu větší než pro objem 15 ml.

Porovnání režimů CRDA a FRDA umožňuje obr. 17. Je patrné, že objem přípravku měl na výslednou hmotnost kapky jen malý vliv. Při režimu dispenzace FRDA byla hmotnost kapky při jednotlivých objemech vždy vyšší než při režimu CRDA. To opět potvrzuje důležitost rychlosti kapání na produkovanou hmotnost kapky.



Obr. 17: Vliv objemu V (ml) na hmotnost kapky a režimu dispenzace CRDA, FRDA při použití prototypu.

8.4 Vlastnosti dispenzačních systémů

V této části jsem se zaměřila na porovnání aplikačního systému z pohledu jeho designu (tvar kapátka) a snadnosti aplikace (rigidita lahvičky), které mohou ovlivňovat hmotnost kapky.

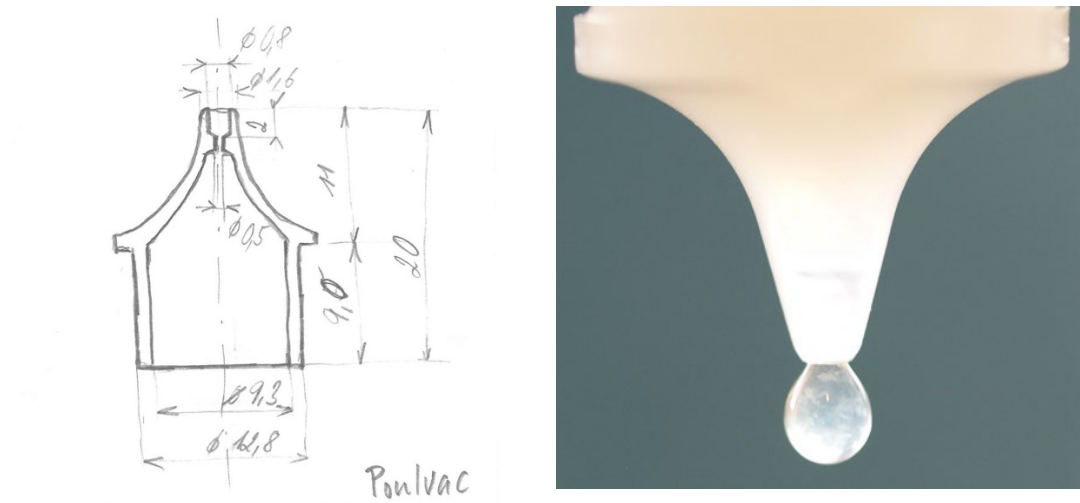
Kapátka můžeme rozlišovat dle materiálu, ze kterého jsou vyrobena (sklo, plast), jejich tvaru (zaoblená, plochá) a jejich geometrických parametrů. Velikost kapky výrazně ovlivňují především rozměry kapací kapiláry. Při konstantním vnitřním průměru kapátka se kapka zvětšuje lineárně s rostoucím vnějším průměrem odkapávacího obvodu. U plochých kapátek je tento obvod jasně definován hranou zakončení. U zaoblených kapátek je jejich efektivní obvod definován ve svislé poloze, ale může být ovlivněn smáčením, zejména při snížení dispenzačního úhlu.³⁷

8.4.1 Manuální dispenzace

Lahvička přípravku Poulvac ILT byla poměrně flexibilní, pro její stlačení nebylo potřeba vyvinout velkou sílu. Při plném objemu (30 ml) bylo možno pozorovat nežádoucí samovolné odkápnutí jedné až dvou kapek při obrácení lahvičky do vertikální polohy. Aplikace větší síly za účelem zvýšení tlaku v lahvičce bylo nejvíce potřeba při úhlu 45°

a při menším objemu vakcíny v lahvičce, kdy byla zaznamenána vyšší variabilita hmotností.

Kapátko přípravku Poulvac ILT používané pro tento experiment mělo zaoblený tvar, rozměry dávkovacího ústí v milimetrech jsou vyznačeny na obr. 18. Pokud je kapátko nesmáčené, tvoří se ve standardní svislé poloze 90° kapka z vnitřního obvodu kapacího ústí.



Obr. 18: Rozměry kapátka a dispenzace kapky při úhlu 90°

Jak ilustruje obr. 19, při snížení dispenzačního úhlu sklouzla kapka po obvodu a kapátko se smáčelo, což mělo za následek zvýšení hmotnosti kapky. Tento efekt dominoval při rychlejším kapání (FRD, CPD), ale byl zaznamenán pro úhel 45° i při režimu CRD pro náplň 30 ml.



Obr. 19: Kapátko při dispenzačním úhlu 45°

Během experimentu se v kapátku tvořily bubliny, které měly za následek menší hmotnost kapky. Rovněž byla pozorována občasná blokáda kapiláry přítomnými částicemi vakcíny, což zvyšovalo variabilitu dávky.

Teoretickou hmotnost kapky M (mg) lze získat po dosazení obvodu kapací kapiláry, kterou jsem dle vzorce (4) vypočítala. Je zapotřebí dosadit poloměr kapiláry kapátka r ($4,0 \times 10^{-4}$ m), povrchové napětí vakcíny σ (40 mN/m) a gravitační zrychlení.³⁸

$$F = M \cdot g = 2\pi r \cdot \sigma \quad (4)$$

Teoretickou hmotnost kapky lze převést na objem kapky při znalosti hustoty vakcíny (1,002 g/ml). V souladu s Tateho zákonem (rovnice 4) jsem vypočítala, že průměrná hmotnost kapky byla 19,8 mg, což odpovídá objemu 20 μ l.

V SPC držitel o registraci uvádí, že jedna lyofilizovaná vakcína obsahuje 1000 dávek v objemu 30 ml.²⁴ Jedna odkápnutá kapka má tedy teoretický objem 30 μ l.

Při konstantní doporučené rychlosti kapání (CRD) dispenzačním úhlu 90° (svisle) a náplni lahvičky 30 ml byla experimentálně zjištěná průměrná hmotnost kapky 21,5 mg, což odpovídá objemu kapky 22 μ l. Je tedy mírně vyšší oproti teoretické, ale nižší než uvedená výrobcem. Měli bychom být schopni z jedné lahvičky odkápnout 1364 kapek.

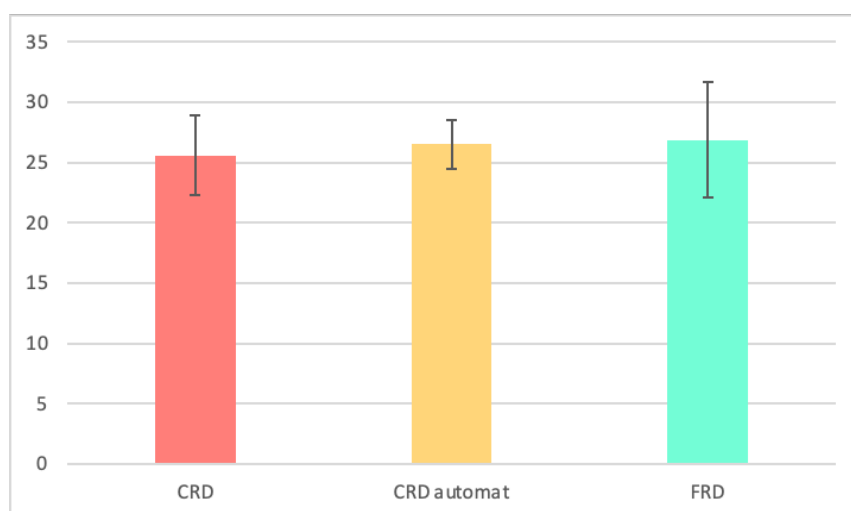
8.4.2 Dispenzace pomocí prototypu

Při standardním automatickém kapáním (CRDA) je dávkovací kapilára v poloze dané požadavkem vertikálního umístění lahvičky. Průměrná hmotnost kapky při režimu CRDA a objemu náplně 30 ml byla 26,6 mg, tj. 27 μ l, což vychází na 1111 kapek na 30 ml. Kapátko (obr. 20) mělo rovné zakončení a tudíž se během dispenzace nesmáčelo. Při dispenzací docházelo k občasné blokádě, díky přítomným částicím suspenze vakcíny, kdy při jednom stisknutí tlačítka z kapiláry kapka neodkápala a při stlačení následujícím pak odkápnul objem odpovídající dvěma kapkám - v důsledku byla zaznamenána vyšší variabilita naměřených hmotností. Proto by bylo vhodnější prototypové zařízení používat na roztoky namísto suspenzí, aby se tomuto problému předešlo.



Obr. 20: Dispenzace kapky z prototypu

8.4.3 Porovnání dispenzačních systémů



Obr. 21: Vliv režimu kapání na hmotnost kapky při manuálním kapání a při kapání použitím poloautomatického prototypu při dispenzačním úhlu 45° a objemu 30 ml

Závěrečné srovnání manuálního kapání při dispenzačním úhlu 45° v režimu CRD a FRD s kapáním z prototypu ve srovnatelném režimu (CRDA) ukazuje obr. 21. Průměrná hmotnost kapky při náplni 30 ml odkápnuté standardním manuálním kapáním je nižší než hmotnost kapky odkápnuté z poloautomatického zařízení. V režimu srovnatelné rychlosti je však hmotnost srovnatelná.

Variabilitu hmotností kapek produkovaných ze zaobleného konvenčního kapátka ovlivňuje jeho smáčení; tento vliv je u prototypu eliminován použitím tenké hladičky

(viz obr. 20). Překvapivě byla u prototypu zaznamenána vyšší variabilita, což je způsobeno výše zmíněnou častou blokádou.

Rychlost produkce jednotlivé kapky závisí u manuálního kapání na stlačení lahvičky, zatímco u prototypu ji nelze ovlivnit, neboť je nastavena stlačením ovládacího tlačítka.

V porovnání času dispenzace poloautomatickým zařízením s manuálním kapáním (tab. 9 a 29) pozorujeme, že prototypem se zkrátil čas kapání deseti kapek v průměru o 3,2 vteřiny.

9 Závěr

Diplomová práce zaměřená na hodnocení dispenzačních systémů pro veterinární oční kapky přinesla následující závěry:

Hodnocené kapky byly charakterizovány hustotou 1,002 g/ml, dynamickou viskozitou 0,987 mm²/s a povrchovým napětím 40 Nm/m.

1. Dispenzační úhel měl při všech dispenzačních režimech manuálního kapání (CRD, FRD, CPD) a při všech objemech náplně lahvičky (30 ml, 15 ml, 5 ml) významný vliv na výslednou hmotnost kapky. Hmotnost kapky se snižovala se zmenšováním dispenzačního úhlu pouze při konstantní rychlosti kapání. V ostatních případech byla hmotnost kapky vyšší v důsledku smáčení zaobleného kapátka a byla ovlivněna objemem náplně.
2. Výsledná hmotnost kapky se zvyšovala se snižujícím se úhlem dispenzace převážně u objemů 15 ml a 5 ml.
3. Objem přípravku neměl vliv na výslednou hmotnost kapky pouze za režimu standardního pomalého kapání CRD při dispenzačním úhlu 90°. Při dispenzačních úhlech 65° a 45° se hmotnost kapky významně snižovala při snížení objemu náplně. Při režimu FRD byl vliv objemu významný s výjimkou úhlu 65°, kde díky vysoké variabilitě nebyla významnost prokázána ($P = 0,061$). Stejně variabilita ovlivnila i statistickou analýzu při režimu CPD pro úhel 45°, v ostatních případech byl vliv objemu na hmotnost kapky významný.
4. S vyšší dispenzační rychlostí se hmotnost kapek zvyšovala ve všech experimentálních kombinacích sledovaných v práci.
5. Nejmenší variabilita dávky byla pozorována při konstantním pomalém kapání (CRD) ve vertikální poloze (90°). Plná lahvička s objemem 30 ml v takovém případě produkuje kapky o hmotnosti 21,5 mg (objemu), což odpovídá teoreticky vypočítané hmotnosti 19,8 mg podle Tateho zákona. Proto je dispenzace pomalým kapáním ve vertikální poloze doporučena.
6. Průměrná hmotnost kapky při náplni 30 ml odkápnuté při standardním pomalém manuálním kapání (CRD) při dispenzačním úhlu 45° je nižší (25,6 mg) než

hmotnost kapky odkápnuté z poloautomatického zařízení (26,6 mg). V režimu srovnatelné rychlosti FRD je však hmotnost srovnatelná (26,9 mg).

7. Vliv objemu na výslednou hmotnost kapky byl při použití prototypu v režimu doporučeném výrobcem (CRDA) nevýznamný.
8. Vyšší variabilita dávky u prototypu byla způsobena častou bloádou dávkovacího systému suspendovanými částicemi vakcíny. Prototyp je proto vhodnější pro dávkování roztoků.

10 Použitá literatura

-
- ¹ FLETCHER, OJ., BARNES, HJ: Avian Immunology: Lymphoid organs and their anatomical distribution. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press Limited, London, ISBN 978-00-805-3376-6, s. 73-81
- ² URTTI, A., SALMINEN, L.: Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Survey of Ophthalmology*. 1993, 37 (6), s. 435-456. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0039-6257\(93\)90141-S](https://doi.org/10.1016/0039-6257(93)90141-S), ISSN 0039-6257
- ³ BROWN, RH. HOTCHKISS, ML. DAVIS, EB.: Creating smaller eyedrops by reducing eyedropper tip dimensions. *Am J Ophthalmol.*, 1985, 99 (4), s. 460-464. doi: 10.1016/0002-9394(85)90013-3. ISSN 0002-9394
- ⁴ KRÁLÍČEK, P.: *Úvod do speciální neurofyzologie*. 3., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-618-2
- ⁵ SYKA, J. A SPOL.: *Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu*. 1. vyd. Praha: Avicenum. 1989, ISBN 978-80-247-4867-2
- ⁶ DOHNAL, F.: *Studijní texty k dějinám farmacie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2618-5
- ⁷ NEČAS, E.: *Patologická fyziologie orgánových systémů*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1711-4
- ⁸ VAŇHARA, P., SEDLÁČKOVÁ, M., LAUSCHOVÁ, I., DUMKOVÁ, J., SEDLÁKOVÁ, V., ČECH, S., HAMPL A.: *Histologický atlas LF MU* [online]. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2018 [cit. 2022-03-13]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=1422550>. ISBN 978-80-210-9068-2
- ⁹ AUTRATA, R., VANČUROVÁ, J.: *Nauka o zraku*. 1. vydání. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2002. s. 226, ISBN 80-7013-362-7
- ¹⁰ ABRÀMOFF, MD., GARVIN, MK., SONKA, M.: Retinal Imaging and Image Analysis. *IEEE Rev Biomed Eng.*, 2010; 3, s. 169-208. ISSN 1937-3333.
- ¹¹ VÁCLAVOVSKÝ, J.: *Chov drůbeže*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2000. ISBN 80-7040-446-9
- ¹² WISELY, CE., SAYED, JA., TAMEZ, H., ZELINKA, Ch., ABDEL-RAHHMAN M., FISCHER A., CEBULLA C.: The chick eye in vision research: An excellent model for

the study of ocular disease, *Progress in Retinal and Eye Research* [online], 61, 2017, s. 72-97 [cit. 2022-01-14]. ISSN 1350-9462

¹³ TUROŇOVÁ, N. *Srovnání a simulace vidění živočichů*. 2020, Bakalářská práce, ČVUT, Praha, [cit. 2022-02-16]. Dostupné z:

<https://dspace.cvut.cz/bitstream/handle/10467/91784/FBMI-BP-2020-Turonova-Natalie-prace.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

¹⁴ MALINA, R. *Všeobecná zoológia* [online]. Banská Bystrica, 2004 [cit. 2022-02-21]. Skripta. Univerzita Mateja Bela, s. 25 – 26. Dostupné z: <https://web.archive.org/web/20061230152321/http://www.fpv.umb.sk/kat/kb/text/knihy/Vseobzoo/VseobZoo.pdf>.

¹⁵ POURLIS AF., Scanning Electron Microscopic Studies of the Pecten Oculi in the Quail (*Coturnix coturnix japonica*), *Anatomy Research International* [online]. 2013, Article ID 650601, 6 p., 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/650601> ISSN 2090-2743

¹⁶ KUCHYŇKA, P., et al.: *Oční lékařství*. 1. vydání, Praha, Grada, 2007. 768 s. ISBN 978-80-247-1163-8

¹⁷ GERHARDT, H., LIEBNER, S., WOLBURG, H.: The pecten oculi of the chicken as a new in vivo model of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*. 1996, 285 (1), s. 91-100. ISSN 1432-0878

¹⁸ GOWTHAMAN, VASUDEVANG et al.: “Infectious laryngotracheitis: Etiology, epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control - a comprehensive review.” *The veterinary quarterly*, 2020, 40 (1), s. 140-161. doi:10.1080/01652176.2020.1759845, ISSN 1875-5941

¹⁹ BELTRAN, G., HURLEY, DJ., GOGAL, RM. Jr, et al.: Immune Responses in the Eye-Associated Lymphoid Tissues of Chickens after Ocular Inoculation with Vaccine and Virulent Strains of the Respiratory Infectious Laryngotracheitis Virus (ILT_V). *Viruses*. 2019, 11 (7), s. 635. doi:10.3390/v11070635 ISSN 1999-4915

²⁰ THILAKARATHNE, DS, COPPO, MJC, HARTLEY, CA., DIAZ-MENDÉZ, A., QUINTEROS, JA., Fakhri O, et al.: Attenuated infectious laryngotracheitis virus vaccines differ in their capacity to establish latency in the trigeminal ganglia of specific pathogen free chickens following eye drop inoculation. *PLoS ONE*, 2019, 14 (3), Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213866> ISSN 1932-6203

-
- ²¹ NOVÁK, Pavel. Základy správné chovatelské praxe v zoologických zahradách: (zoohygiena zoozvířat v praxi). Praha: VUŽV, 2013. ISBN 978-80-7403-109-0.
- ²² HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J.: *Základy imunologie*, 3. vydání, 2008, Praha : Triton. s. 280, ISBN 80-7254-686-4.
- ²³ ŠTEFÁNEK, J. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. [cit. 14. 2. 2022]. dostupné z: www.stefajir.cz
- ²⁴ SPC Poulvac ILT
- ²⁵ ŠKLUBALOVÁ, Z., VRANÍKOVÁ, B.: *Dávkování očních přípravků*, 2018, Praha: Maxdorf, s. 30 – 35, ISBN: 978-80-7345-572-9
- ²⁶ LUDWIG, A., VAN OOTEGHEM M., The influence of the drop size on the elimination of an ophthalmic solution from the precorneal area of human eyes. *Drug Dev Ind Pharm.* 1986, 12 (11-13), 2231-42
- ²⁷ *Český lékopis 2017*, Praha: Grada, 2017, ISBN 978-80-2710-500-7
- ²⁸ ŠKLUBALOVÁ, Z., ZATLOUKAL, Z.: Study of Eye Drops Dispensing and Dose Variability by Using Plastic Dropper Tips. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2006, 32 (2), s. 197-205 [cit. 2021-11-13]. ISSN 0363-9045
- ²⁹ Van SANTVLIET, L., LUDWIG, A.: Determinants of eye drop size. *Survey of Ophthalmology* [online]. 2004, 49 (2), str. 197-213 [cit. 2021-11-10]. ISSN 0039-6257
- ³⁰ Van SANTVLIET, L., LUDWIG, A.: Influence of the dropper tip design on the size of eye-drops. *Pharm. Ind.*, 63, 2001, s. 402-409, ISSN 1616-7074
- ³¹ VRANÍKOVÁ, B.: Měření povrchového a mezifázového napětí [online]. [cit. 2017-10-05]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_povrchoveho_a_mezifazoveho_napeti.html
- ³² LA CROIX, N.: The tear film – The glycocalyx and Mucin [online]. [cit. 2022-01-25]. Dostupné z: <https://vmcli.com/the-tear-film-the-glycocalyx-and-mucin/>
- ³³ ŠKLUBALOVÁ Z.: In situ gelující polymery pro oční kapky, *Česká a Slovenská farmacie*, 54, 1, 2005, s. 4-10 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1210-7816
- ³⁴ JHO, C., CARRERAS, M.: The effect of viscosity on the drop weight technique for the measurement of dynamic surface tension, *Journal of Colloid and Interface Science*, 99, 2, 1984, 543-548. ISSN 0021-9797
- ³⁵ ŠKLUBALOVÁ, Z., ZATLOUKAL, Z. Systematic study of factors affecting eye drop size and dosing variability. *Pharmazie*. 60, 2005, s. 917-920. ISSN 0031-7144

-
- ³⁶ Van SANTVLIET, L., LUDWIG, A.: Influence of the physico-chemical properties of ophthalmic viscolysers on the weight of drops dispensed from a flexible dropper bottle. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 7, 1999, s. 339-345. ISSN 0928-0987
- ³⁷ ZDRÁHALOVÁ, A.: Studium vlivu přísady derivátů celulosy na hmotnost očních kapek. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 2007
- ³⁸ ŠKLUBALOVÁ, Z., ZATLOUKAL, Z.: Classification of plastic eye dropper tips using Harkins and Brown factor. *Pharmazie* 62, 2007, s. 750-755, ISSN 0031-7144