

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

LIBERACE LÉČIV Z BIOADHEZIVNÍCH NOSIČŮ

Rigorózní práce

Hradec Králové 2009

Mgr. Lenka Veselá

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE
Hradec Králové, 2009

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. Děkuji PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení.

Mgr. Lenka Veselá

Lenka Veselá

OBSAH

1	ÚVOD.....	5
2	CÍL PRÁCE.....	7
3	SEZNAM ZKRATEK.....	8
4	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
4.1	BIOADHEZE.....	9
4.1.1	Mechanismus bioadheze.....	9
4.1.2	Substráty pro bioadhezi.....	10
4.2	BIOADHEZIVNÍ POLYMERY.....	12
4.2.1	Klasifikace bioadhezivních polymerů.....	13
4.3	PLASTIFIKOVANÉ POLYMERY.....	14
4.3.1	Plastifikátory ve farmaceutické technologii.....	15
4.3.2	Využití ve farmaceutické technologii.....	15
4.4	BIOADHEZIVNÍ LÉKOVÉ FORMY.....	16
4.4.1	Výhody bioadhezivních lékových forem.....	16
4.4.2	Nevýhody bioadhezivních lékových forem.....	17
4.4.3	Nové koncepty bioadhezivních systémů.....	17
4.4.3.1	Inhibice proteolytických enzymů.....	17
4.4.3.2	Modulace epitelové permeability (zlepšení penetrace).....	18
4.4.3.3	Indukce vezikulárních transportních procesů v buňkách (endocytóza, resp. transcytóza).....	19
4.4.4	Využití bioadhezivních lékových forem.....	19
4.5	KYSELINA POLYMLÉČNÁ A POLYGLYKOLOVÁ.....	20
4.5.1	Příprava.....	20
4.5.2	Fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny polymléčné (PLA) a kyseliny polyglykolové (PGA).....	20
4.5.3	Využití kyseliny polymléčné a kyseliny polyglykolové.....	21
4.6	KOPOLYMERY KYSELINY MLÉČNÉ A GLYKOLOVÉ (PLGA).....	21
4.6.1	Fyzikální a chemické vlastnosti PLGA.....	21
4.6.2	Degradace PLGA.....	22
4.6.3	Možnosti využití PLGA.....	23
4.7	LÉČIVA POUŽITÁ V EXPERIMENTU.....	24
4.7.1	Aciklovir.....	24
4.7.2	Flukonazol.....	25
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
5.1	POUŽITÉ SUROVINY:.....	29
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE:.....	29
5.2.1	Materiálový zkušební stroj T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell.....	29
5.2.2	Spektrofotometr HELIOS GAMMA firmy Unicam.....	30
5.3	PŘÍPRAVA PUFRU A VZORKŮ:.....	31
5.3.1	Příprava pufru.....	31
5.3.2	Kalibrační přímka flukonazolu.....	31
5.3.3	Kalibrační přímka acikloviru.....	32
5.3.4	Příprava matric.....	33
5.4	POSTUP MĚŘENÍ.....	34
5.4.1	Měření adheze.....	34
5.4.2	Měření absorbance.....	34
5.5	STANOVENÍ UVOLNĚNÉHO LÉČIVA.....	35

5.5.1	Stanovení flukonazolu	35
5.5.2	Stanovení acikloviru	36
6	VÝSLEDKY	37
6.1	TABULKY	37
6.1.1	Měření adheze vzorků s flukonazolem:	37
6.1.2	Liberace flukonazolu	39
6.1.3	Liberace acikloviru	45
6.2	GRAFY	51
6.2.1	Adheze	51
6.2.2	Liberace flukonazolu	52
6.2.3	Liberace acikloviru	56
7	DISKUZE	60
7.1	ADHEZIVITA PLASTIFIKOVANÝCH OLIGOESTERŮ.....	61
7.2	LIBERACE MODELOVÝCH LÉČIV.....	64
8	ZÁVĚRY	67
9	SOUHRN.....	68
10	LITERATURA	71

1 ÚVOD

Bioadheze je společný pojem pro všechny druhy adhezních jevů, u kterých je alespoň jedna ze zúčastněných fází – substrát nebo adhezivum – živá. Adhezivum je schopné přilnout k substrátu adhezivními vazbami po určitou dobu. Bioadheze se v přírodě vyskytuje poměrně často, příkladem je přilnavost mořských řas a mušlí na skalách, z lékařského hlediska je bioadheze např. důležitou podmínkou patogenity bakterií na sliznicích nebo na zubní sklovině, tvorby nových tkání na povrchu umělých orgánů nebo implantátů (např. srdeční chlopně, kyčelní klouby) a dále je i předstupněm vzniku trombózy, kdy na cévní stěnu adherují krevní destičky. Významnou roli v bioadhezi hraje vodné prostředí, které umožňuje přilnutí k substrátu.

V medicíně se některé bioadhezivní polymery používají jako ochrana poškozených tkání (gastrointestinální vředy nebo léze v dutině ústní), dále slouží jako lubrikanty (v dutině ústní, oku nebo pochvě) a také se používají jako součást obvazového materiálu na rány nebo při fixaci zubních protéz. Ve farmaceutické technologii se bioadhezivní syntetické nebo přírodní polymery využívají k přípravě lékových forem, které umožňují díky jejich bioadhezi k biologickému substrátu dosažení vyšší biologické dostupnosti léčiva, rychlejší dosažení terapeutické plazmatické koncentrace a rychlejšího nástupu účinku, a také k přípravě lékových forem s řízeným uvolňováním léčiva, které navíc snižují četnost aplikace. Díky těmto bioadhezivním lékovým formám dochází ke zvýšení compliance a hlavně ke zlepšení kvality života pacienta, neboť je omezena nutnost injekční aplikace léčiv a častého podání perorálních léčiv (především u geriatrických pacientů). Bioadhezivní lékové formy dále mohou umožnit podání jinak pouze parenterálně aplikovatelných léčiv. Výhodné k přípravě těchto systémů je použití biodegradabilních bioadhezivních látek, které jsou v organismu enzymaticky nebo hydrolyticky odbourávány a jejichž degradační produkty jsou neškodné a z těla se snadno vylučují. Volbou vhodných nosičů je možné různé dávkování léčiva v závislosti na čase. Díky vysoké specifičnosti v místě účinku se tyto systémy využívají při léčbě lokálního onemocnění, dále např. při hormonální léčbě.

Předložená rigorózní práce navazuje metodologicky na mou diplomovou práci,¹ kde byly testovány oligoestery větvené mannitolem a dipentaerythritolem, plastifikované různou koncentrací methylsalicylátu. Byla měřena jejich viskozita na viskozimetru

Brookfield DV-E s adaptérem pro malé množství vzorku a adhezivní síla na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell. Bylo zjištěno, že se jedná o newtonské systémy, jejichž viskozita klesá s rostoucí koncentrací plastifikátoru. Adhezivita je ovlivněna v první řadě koncentrací plastifikátoru, ale vliv má rovněž molární hmotnost a stupeň větvení nosičů.

V rámci experimentu rigorózní práce byly testovány nosiče větvené pentaerythritolem a tripentaerythritolem, plastifikované 30 % triethylcitrátu. Byla měřena adheze a liberace modelových léčiv. Při testování adheze byly využity zkušenosti získané v rámci diplomové práce, ale nově byl jako podklad pro lepení vzorků použit hydratovaný mucin získaný ze sliznic prasečích žaludků. Provedené liberační testy doplňují experimenty s nosiči větvenými jinou větvicí složkou a plastifikované jiným typem či koncentrací plastifikátoru. Využita byla opět metodologie práce, zejména příprava matric s léčivem a podmínky disolučních testů.

2 CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce je studium adhezivních vlastností větvených terpolymerů kyseliny D,L-mléčné, glykolové a pentaerythritolu (resp. tripentaerythritolu) s léčivou látkou (flukonazol) a studium liberace léčivých látek (flukonazol, aciklovir) z větvených terpolymerů kyseliny D,L-mléčné, glykolové a pentaerythritolu (resp. tripentaerythritolu).

Úkol rigorózní práce je možno rozdělit do těchto dílčích kroků:

1. Připravit vzorky pro měření adheze: pro plastifikaci terpolymerů použít triethylcitrát v koncentraci 30 % a jako léčivou látku použít flukonazol v koncentraci 4 %.
2. Na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell měřit adhezivní vlastnosti připravených vzorků jako maximální sílu F_{max} v jednotkách Newton, potřebnou pro odtržení vzorku od podkladu.
3. Připravit vzorky pro měření liberace: pro plastifikaci terpolymerů použít triethylcitrát, jako léčivou látku použít flukonazol a aciklovir a jako liberační médium fosfát citrátový pufr.
4. Sestrojit kalibrační přímku flukonazolu a acikloviru.
5. Ponechat v termostatu liberovat léčivo z připravených vzorků a v pravidelných časových intervalech odebírat vzorky disoluční kapaliny.
6. Pomocí spektrofotometru HELIOS GAMMA firmy Unicam změřit absorbance vzorků disoluční kapaliny a stanovit množství uvolněného léčiva pomocí rovnice kalibrační přímky.

3 SEZNAM ZKRATEK

PLA.....Kyselina polymléčná

PGA.....Kyselina polyglykolová

PLGA...Kopolymery kyseliny mléčné a glykolové

1P.....Terpolymer kys. D,L-mléčné, kyseliny glykolové a 1% pentaerythritolu

3P.....Terpolymer kys. D,L-mléčné, kyseliny glykolové a 3% pentaerythritolu

5P.....Terpolymer kys. D,L-mléčné, kyseliny glykolové a 5% pentaerythritolu

1T.....Terpolymer kys. D,L-mléčné, kyseliny glykolové a 1% tripentaerythritolu

3T.....Terpolymer kys. D,L-mléčné, kyseliny glykolové a 3% tripentaerythritolu

5T.....Terpolymer kys. D,L-mléčné, kyseliny glykolové a 5% tripentaerythritolu

TEC.....Triethylcitrát

4 TEORETICKÁ ČÁST

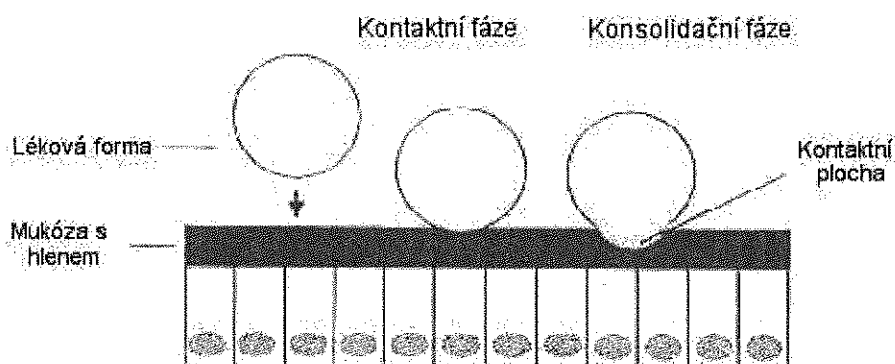
4.1 BIOADHEZE

Bioadheze je charakterizována jako přilnutí syntetického nebo přírodního materiálu – *adheziva* k mukóznímu či k epiteliálnímu povrchu živého organismu – biologickému substrátu na určitou dobu.² Podskupinu bioadheze tvoří mukoadheze – přilnutí substrátu na membránu, která je pokrytá vrstvou hlenu (mucinu), a cytoadheze – buněčně specifická bioadheze.

4.1.1 Mechanismus bioadheze

Bioadheze je založena na přitažlivých a odpuzivých molekulárních silách a probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je vytvoření bezprostředního kontaktu mezi povrchy adheziva a substrátu – hovoříme o **kontaktní fázi**. Následně dochází k interdifúzi a interpenetraci obou fází – hovoříme o **konsolidační fázi**.³

Na molekulární úrovni dochází při bioadhezi k vytvoření vazeb mezi molekulami adheziva a substrátu – adsorpce molekul adheziva na molekuly substrátu. Uplatňují se elektrostatické a hydrofobní interakce, vodíkové vazby a van der Waalsovy síly. Funkční skupiny, které usnadňují adsorpci tvorbou vodíkových vazeb, jsou karboxylové, hydroxylové, amidové a sulfátové skupiny. Polyanionty jsou upřednostňovány před polykationty.



Obr. 1: Kontaktní a konsolidační fáze⁴

4.1.2 Substráty pro bioadhezi

Epiteliální membrána

Buněčná membrána je tvořena fosfolipidovou dvojrůstvou, do níž jsou vmezeřeny molekuly bílkovin a polysacharidů. Je popisována tzv. modelem tekuté mozaiky – tedy že se proteiny a sacharidy mohou relativně volně pohybovat v membránové lipidové dvojrůstvě. Některé proteiny jsou k membráně připojeny volně.

Hlavními složkami membrány jsou lipidy (cholesterol, fosfolipidy a sfingolipidy), proteiny a sacharidy. Fosfolipidy se skládají z polární a nepolární části a vytvářejí dvojrůstvu. Hydrofobní část molekuly směřuje směrem dovnitř membrány a hydrofilní část směrem vně membrány. Díky tomuto charakteru je membrána semipermeabilní – propustí vodu, nepolární a malé molekuly. Nepropustí polární a nabitě částice. Proteiny mají hlavně transportní funkci – jsou transportéry látek, pro které je membrána nepropustná. Nečastěji jsou tyto transportní bílkoviny označovány jako pumpy, přenašeče a kanály. Sacharidy jsou připojeny k proteinům nebo lipidům a vytvářejí s nimi glykoproteiny nebo glykolipidy.

Struktury na vnějším povrchu buněk, které jsou tvořené polysacharidy, jsou nazývány glykokalyx a chrání membránu před mechanickým a chemickým poškozením. Na glykokalyx nebo na polysacharidy glykoproteidů jsou schopny se specificky vázat lektiny. Jsou to buněčné membránové proteinové receptory, o nichž se předpokládá, že jsou částečně zodpovědné za komunikační proces mezi buňkami navzájem a také mezi buňkami a médiem.

Mukózní membrána

Mukózní membrána (mukóza) je povrch, který se nalézá na stěnách tělních dutin, gastrointestinálního a respiračního traktu. Je tvořena třemi vrstvami – pojivem (lamina propria), nad ním se vyskytující epiteliální vrstvou (*jednovrstevná* typická pro žaludek, střevo, průdušky, nebo *vícevrstevná* vyskytující se v jícnu, pochvě, rohovce) pokrytou vlastní mukózou – vlhkou mukózní vrstvou obsahující hlen. Tato hlenová vrstva se v závislosti na lokalizaci liší tloušťkou. V žaludku je tloušťka hlenu přibližně 192 μm , zatímco v duodenu kolísá od 10 do 400 μm .⁵

Hlen (mucus) je zcela hydratovaný, průhledný, viskoelastický gel, který přiléhá k slizničním povrchům, pokrývá povrch oka, nosu, úst, respiračního traktu, děložního

čípku a gastrointestinálního traktu. Je produkován specializovanými epiteliálními buňkami (pohárkovými buňkami), které jsou buď roztroušené mezi enterocyty (v gastrointestinálním traktu) nebo organizované do specializovaných žláz (např. slinné žlázy). Složení hlenu se velmi mění, závisí na živočišném druhu, místě sekrece, typu sekrečních buněk a na tom, zda je tkáň v normálním nebo patologickém stavu. Z 95-99 % jej tvoří voda, zbývajících 1-5 % tvoří ve vodě nerozpustný glykoprotein mucin a další nemucinové látky, mezi něž patří elektrolyty, nukleové kyseliny, enzymy, protilátky, surfaktanty a volné lipidy.⁶ Mucin má tvar kartáče, který je složen z postranních oligosacharidových řetězců připojených na proteinovou kostru. Proteinová kostra tvoří kolem 12 % až 17 % celkové hmotnosti a z toho přibližně 70 % tvoří aminokyseliny serin, threonin a prolin. Zbýající část molekulové hmotnosti připadá na oligosacharidy, které jsou tvořeny pěti složkami: N-acetylgalaktosaminem, N-acetylglukosaminem, N-acetyl/N-glykoyl neuramidovou kyselinou, fukosou a galaktosou. Mucinové glykoproteiny jsou důležitou strukturní složkou hlenu, které zajišťují jeho charakteristické gelové vlastnosti nutné pro funkci hlenu.

Většina glykoproteinů hlenu nese celkový záporný náboj, způsobený přítomností zbytků kyseliny sialové a sulfonové na konci některých cukerných jednotek. Přibližné pKa těchto kyselin je 1,0 – 2,5, což znamená, že jsou při fyziologickém pH zcela ionizovány. Tento záporný náboj se významně podílí na bioadhezi.⁷ Záporný náboj má i buněčná membrána, proto adhezivní síly mezi membránou a vrstvou hlenu musí být tak silné, že překonají tyto odpuzivé síly. Dochází ke vzniku indukovaného dipólu, což vede k velké adhezivní síle mezi tkání a hlenem.⁸

Mezi nejdůležitější funkce hlenu patří ochrana epiteliálních buněk před fyzikálním a chemickým poškozením, poskytování lubrikace, usnadnění průchodu potravy trávicím traktem, dále slouží jako zvlhčující agens a reguluje obsah vody ve spodních vrstvách tkání.⁶ V závislosti na lokalizaci hlenu, věku a pohlaví jedince se může významně lišit rychlost obměny vrstvy hlenu. Přibližný čas obměny této vrstvy v gastrointestinálním traktu myši je přibližně 1 až 5 hodin.⁹ Rychlá obměna hlenové vrstvy je nevýhodná pro využití bioadhezivních lékových forem.

Hlen může přijmout vodu, až 40krát víc než je jeho celková hmotnost a vytvořit tak gel. Tento gel je tvořen velkými glykoproteinovými molekulami, které drží při sobě

nekovalentními vazbami. Jedná se především o vodíkové vazby. Protože se gel nerozpouští v roztoku iontů, nejsou při mukoadhezi hlavním typem interakcí iontové vazby. Soudržnost tohoto přilnavého gelu je dostatečně slabá na to, aby umožnila jeho tok, ale zároveň dostatečně silná, aby odolal solubilizaci a osmotickým tlakům.

Významná je interakce s vápníkem, kdy dochází k vysrážení mucinu. Vysoké koncentrace kalcia mohou zvýšit sílu adheze a také rychlost hydratace hleny. Vzniklou sraženinu lze rozpustit chelatačními látkami jako např. EDTA – ethylendiamintetraoctovou kyselinou. Zvýšení síly adheze a hydratace hleny je způsobeno tím, že kladně nabitě ionty vápníku reagují se záporně nabitými mucinovými skupinami, a tím je umožněna rychlá, až stonásobná expanze mucinu.¹⁰

Modelové biologické tkáně

Pro testování bioadheze jsou používány nejčastěji myší peritoneum, krysí střevo, králičí žaludek, hovězí sublingvální sliznice a vepřová bukální sliznice. Nevýhodou je však obtížné získání sliznic s jednotným povrchem a konzistencí, která by poskytla reprodukovatelné výsledky.¹¹

4.2 BIOADHEZIVNÍ POLYMERY

Bioadhezivní polymery jsou vysokomolekulární látky, které zajišťují dostatečnou adhezi splněním těchto požadavků:

- vysoká molekulová hmotnost – pro každou látku existuje optimální rozmezí molekulové hmotnosti, obecným předpokladem je ale molekulová hmotnost větší než 100 000 Da (např. dextran ~ 2.105 – 2.107 Da).
- dostatečný stupeň polarity – větší množství hydrofilních funkčních skupin (především karboxylových, hydroxylových, amidových a sulfátových) vázících se k substrátu různými interakcemi, hlavně vodíkovými vazbami, zajišťují vysokou polaritu, podmiňují bobtnání polymeru a tím obsazení maximální adhezivní plochy. Hydratace a zbobtnání jsou nezbytné, avšak nadměrná hydratace obvykle způsobí vytvoření slizu o nízké viskozitě a následnou ztrátu bioadhezivních vlastností.
- flexibilita polymerního řetězce – je důležitá především pro prostoupení a propletení řetězců a je ovlivněna zesítním. Výhodnou konformací je dvojitá šroubovice.

4.2.1 Klasifikace bioadhezivních polymerů

Bioadhezivní polymery dělíme podle různých hledisek.

- podle elektrického náboje:

- **anionické** – vážou se na mucus vodíkovými můstky a síla adheze roste v kyselém prostředí.
- **kationické** – vážou se na záporně nabitý mucus elektrostatickými interakcemi při pH 7,4.

Jsou preferovány anionické polymery, neboť kationické polymery jsou v důsledku buněčné agregace toxickejší.¹²

- podle mechanismu účinku:

- **polymery I. generace** – mají nízkou specifitu, vážou se k jakémukoli mukóznímu povrchu fyzikálně-chemickými interakcemi.
- **polymery II. generace** – vážou se specifickými ligandy na receptory. Hovoříme o targetingu, tedy o cílené distribuci léčiva.

Dnes mají polymery I. generace jen omezené použití, neboť jsou nahrazeny adhezivy II. generace.

- podle původu na:

- **přírodní** – např. chitosan, který se získává z krunýřů krabů, je netoxický, biodegradabilní, kationický polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti. Dále např. pektin, který je netoxický, hydrofilní polysacharid pocházející z rostlinných buněčných stěn.
- **syntetické** – např. deriváty kyseliny akrylové – karbomer, polykarbofil (vysoce dlouhodobá adhezivní vazba), polyakrylová kyselina. Dále např. deriváty celulosy – karmelosa, hyetelosa, hyprolosa, karmelosa sodná sůl (aniontový polymer s neobyčejně dobrými mukoadhezivními vlastnostmi, biokompatibilitou a stabilitou).

Velký počet farmaceutických polymerů má za jistých podmínek mukoadhezivní vlastnosti a použitím běžných pomocných látek se především usnadní registrace (není potřeba) nových bioadhezivních léků. Využívají se hlavně polysyntetické nebo syntetické polymery, které tvoří hydrogely, např. celulosové deriváty nebo vysokomolekulární deriváty kyseliny polyakrylové.¹³ Pro farmaceutické použití je

zajímavá i bioadhezivní bílkovinná sloučenina – mušlový adhezivní protein MAP získaný z *Mytilus edulis* (Slávka jedlá).¹⁴

Tab. 1: Porovnání bioadheziv – vztaženo k pektinu (100%)³

Testovaný polymer	Průměrná adhezivní síla [%]	Kvalita adheze
Polykarbofil	≥ 200	výborná
Karmelosa sodná sůl	192,4	
Polyakrylová kyselina	185,0	
Tragant	154,4	
Polyethylen oxid	128,6	
Polymethylvinylether co-maleinový anhydrid	147,7	
Methylcelulosa	128,0	
Alginát sodný	126,2	vyhovující
Hypromelosa	125,2	
Karayová guma	125,2	
Methylethylcelulosa	117,4	docela dobrá
Rozpustný škrob	117,2	
Želatina	115,8	
Pektin	100,0	slabá
Povidon	97,6	
Polyethylenglykol	96,0	
Polyvinylalkohol	94,8	
Polyhydroxyethylmethakrylát	88,4	
Hyprolosa	87,1	

4.3 PLASTIFIKOVANÉ POLYMERY

Jedná se o směsi polymeru a plastifikátoru, ve kterých je obsah plastifikátoru 5 až 30 %. Plastifikátory jsou také označovány jako změkčovadla. Jejich hlavní funkcí je zlepšení zpracovatelnosti, snížení křehkosti a zvýšení mechanické odolnosti materiálu, dále umožnění aplikace, zachování integrity při sušení a zvýšení difuzivity. Plastifikátory mohou být s polymerem mísitelné i nemísitelné (ve většině případů jsou s polymerem mísitelné). Plastifikátory solvatují molekuly i funkční skupiny, dochází k zvětšení vzdálenosti mezi molekulami, tím se částečně snižuje reaktivita a oslabují se intermolekulové síly. Dále dochází ke snížení teploty skelného přechodu T_g a teploty

tečení T_f , snížení krystalinity a zmenšení krystalů. Někdy dochází i k porušení homogenity směsi.¹⁵

4.3.1 Plastifikátory ve farmaceutické technologii

- Estery – málo těkavé, molekulová hmotnost 200 až 400 D, teplota varu 300 - 400 °C
Diestery – odvozené buď od karboxylových kyselin (např. kyseliny sebakové, kyseliny azelaové), nebo od ethylenglykolu nebo propylenglykolu.
Triestery – odvozené od kyseliny fosforečné, citronové (tributylcitrát, triethylcitrát) nebo glycerolu (triacetin – triester glycerolu a kyseliny octové)
Polyhydrické alkoholy – glycerol, propylenglykol, butylenglykol, sorbitol
- Chlorované fenoly a parafíny – dříve se používaly v nátěrových hmotách
- Strukturální voda – např. v želatinových tobolkách, kdy je nutné alespoň 12 % vody, při méně jak 5 % vody tobolky praskají. Voda jako plastifikátor se nachází hlavně v biopolymerech.¹⁵

4.3.2 Využití ve farmaceutické technologii

- Obalování tablet a granulátu – plastifikace polymerů je nezbytná, neboť se zabrání praskání při sušení a dochází i ke snížení napětí při výrobě tablet.
- Membránové systémy – plastifikací se získává pružný a houževnatý materiál, dochází i k modifikaci propustnosti pro plyny, rozpouštědla a léčivé látky.
- Matricové systémy – plastifikací se zlepši zpracovatelnost (netvoří se póry), zvýší se stabilita a je i lepší dispergace částic, neboť částice jsou lépe smáčitelné.¹⁵

Probíhaly různé studie, kdy se zkoumala kombinace více plastifikátorů, např. s ethylcelulosou (vodná koloidní polymerní disperze Aquacoat®). Byly použity hydrofilní i lipofilní plastifikátory. Potencionální nevýhodou hydrofilních plastifikátorů je jejich uvolňování z obalu potahované tablety nebo nosiče při kontaktu s fyziologickými tekutinami. Dochází ke změně složení obalu nebo nosiče a tedy i ke změně kinetiky uvolňování léčivé látky. Systém je proto velmi obtížně kontrolován. Lipofilní plastifikátory, které jsou do polymerní disperze vemulogovány, zůstávají v obalu nebo nosiči, a tím zajišťují konstantní podmínky během uvolňování léčivé látky.¹⁶

4.4 BIOADHEZIVNÍ LÉKOVÉ FORMY

Bioadhezivní lékové formy dělíme podle charakteru přípravku:

- tuhé – tablety, matrice
- polotuhé – gely, masti, pasty
- tekuté – roztoky s vyšší viskozitou

Do bioadhezivních lékových forem lze léčivou látku inkorporovat buď v průběhu syntézy adhezivního polymeru, nebo při saturaci polymeru léčivem bobtnáním polymeru v roztoku léčiva.

4.4.1 Výhody bioadhezivních lékových forem

Mezi výhody bioadhezivních lékových forem patří:

- bezprostřední a prodloužený kontakt v místě aplikace (několik minut v oku, několik hodin v žaludku nebo tenkém střevě). Je také zintenzivněn kontakt mezi aplikačním systémem a absorbující biologickou membránou (sliznicí) ve srovnání s neadhezivním systémem.¹⁷
- zlepšená lokalizace - vysoká koncentrace léčiva v daném místě - vytvoření depa
- zvýšená absorpce léčiva díky změně permeability membrány a díky zvýšení koncentračního gradientu léčiva
- silnější kontakt k absorbující sliznici
- zlepšení biologické dostupnosti (prodloužení času absorpce)
- je vyloučen first-pass efekt
- je zpomalen rozklad nestabilních léčiv v důsledku přímého kontaktu s absorbující sliznicí a zamezení působení tělních tekutin a metabolických enzymů.¹⁸ Byl předpoklad, že by se toho mohlo využít především pro neparenterální aplikaci peptidů a proteinů, které by tímto systémem byly tak navíc chráněny před předčasným odbouráním lumenálními nebo mukózními proteázami, avšak toto očekávání od mukoadhezivních lékových forem se experimentálně ve všech případech nepotvrdilo. Problémem byla časová obměna a složení hlenové vrstvy a chybějící specifičnost použitých mukoadhezivních polymerů.¹⁹
- lepší compliance (prodloužení dávkovacího intervalu)

4.4.2 Nevýhody bioadhezivních lékových forem

Mezi nevýhody bioadhezivních lékových forem, zejména v gastrointestinálním traktu, patří:

- nespolehlivost hlenové vrstvy, co se týče času obměny a složení. Hlenová vrstva je kontinuálně odstraňována a zároveň je buňkami nově vylučována. Pokusy *in vivo* ukázaly, že čas obměny se pohybuje řádově v hodinách, takže mukoadhezivní přípravky mají velmi malou nebo žádnou výhodu oproti lékovým formám s prodlouženým uvolňováním.
- přítomnost odloučeného hlenu, který může adherovat k lékovým formám. To snižuje, alespoň do určitého rozsahu, schopnost tablet dosáhnout hlenové vrstvy pokrývající buněčný povrch. Za těchto podmínek by se potenciální mukoadhezivní přípravky chovaly jako normální tablety, procházející gastrointestinálním traktem s lumenálním obsahem.
- nedostatečná specifická mukoadheze v gastrointestinálním traktu, kdy přípravek nepřilne pouze k požadované části, ale také k mnoha jiným oblastem.
- vyšší koncentrace léčiva aplikovaná na omezenou plochu, která může způsobit až porušení sliznice. Tím je omezen výběr možných léčivých látek.

Kromě toho pokusy *in vitro* ukázaly, že za podmínek převládajících v gastrointestinálním traktu žádný známý mukoadhezivní polymer nebude adherovat optimálně.¹⁸

4.4.3 Nové koncepty bioadhezivních systémů

Díky znalostem nedostatků bioadhezivních lékových forem byla snaha o zmenšení jejich vlivu a byly vytvořeny nové koncepty:

- inhibice proteolytických enzymů
- modulace epitelové permeability (zlepšení penetrace)
- indukce vezikulárních transportních procesů v buňkách (endocytóza, resp. transcytóza)

4.4.3.1 Inhibice proteolytických enzymů

Některé bioadhezivní polymery byly identifikovány jako inhibitory proteolytických enzymů. Např. peptidové léčivo DGAVP (9-desglycinamid-8-arginin-vasopresin) bylo podáno intraduodenálně ve vodné disperzi obsahující 1% polykarbofil. Výsledkem byla 3 x až 5 x vyšší biologická dostupnost než při podání peptidu pouze ve vodném roztoku.

Podobný experiment byl proveden s inzulinem, kalcitoninem nebo buserelinem. Polymer (obvykle považovaný za mukoadhezivum) netvořil adhezivní hydrogel a také nebyl jakýmkoli způsobem spojen s peptidovým léčivem. Z toho vyplývá, že zvýšení absorpce nebylo pravděpodobně dosaženo intenzivnějším kontaktem nebo prodloužením času pasáže. Zvýšená absorpce může být způsobena schopností polymerů ovlivnit permeabilitu epiteliální bariéry (např. pomocí reverzibilního otevření tight junctions mezi sousedními buňkami, které nejsou za normálních podmínek prostupné pro peptidy) nebo schopností polymeru chránit peptidové léčivo před enzymatickou degradací.²⁰

Další výzkum prokázal, že zejména deriváty polyakrylové kyseliny jsou schopné inhibovat proteázy (např. trypsin a chymotrypsin). Důležitou vlastností těchto sloučenin je vysoké množství karboxylových funkčních skupin, které jsou schopné chelatovat divalentní kationty jako je vápník nebo zinek, které jsou nezbytnými kofaktory metaloproteáz. Odstranění těchto kofaktorů vede k úplné ztrátě enzymatické aktivity. Tyto inhibiční vlastnosti nesouvisí s mukoadhezivními vlastnostmi dané molekuly ani s viskozitou přípravku. Tyto inhibiční polymery byly použity ve vysokých dávkách k léčbě gastrointestinálních obtíží, aniž by se objevily vedlejší účinky. To by mohlo být výhodou oproti nízkomolekulárním enzymovým inhibitorům jako je aprotinin nebo bestatin.¹⁸

4.4.3.2 Modulace epitelové permeability (zlepšení penetrace)

Jiným způsobem zvýšením biologické dostupnosti peptidových léčiv je zvýšení epiteliální prostupnosti. Také zde mohou být použity mukoadhezivní polymery. Experiment ukázal, že nasální biologická dostupnost inzulinu je zvýšena, pokud léčivá forma obsahuje bioadhezivní škrobové mikrosféry. Účinek souvisel s dočasným zvýšením permeability epitelu spíše než s prodlouženým residenčním časem. *In vitro* studie na buněčných kulturách ukázaly, že suché materiály, které jsou schopné bobtnat (škrobové mikrosféry), vedou k reverzibilnímu ohniskovému rozšíření tight junctions, a tím ke zvýšení absorpce paracelulární cestou. Polymer, který je schopen bobtnat, aplikovaný jako suchý prášek, absorbuje vodu z epiteliálního substrátu, což vede k dehydrataci buněk a k jejich následnému sraštění.²¹

4.4.3.3 Indukce vezikulárních transportních procesů v buňkách (endocytóza, resp. transcytóza)

Byly zkoumány biomolekuly specificky adherující k mukóznímu substrátu, u nichž bylo zjištěno, že vazba těchto biomolekul vede k jejich zvýšenému příjmu do epiteliálních buněk endo- nebo transcytózou.¹⁸

4.4.4 Využití bioadhezivních lékových forem

Bioadhezivní lékové formy se používají především k lokálnímu ošetření onemocnění dutiny ústní antibiotiky, antihistaminiky nebo lokálními anestetiky. V Japonsku je pod názvem Aftac uvedena na trh bioadhezivní tableta na ošetření zápalových změn ústní sliznice. V Německu je v prodeji dentální adhezivní pasta Solcoseryl, která obsahuje želatinu, pektiny a methylcelulosu rozptýlené v lipofilním základu složeném z parafinu a polyethylenu. Tento přípravek je velmi podobný americkému přípravku Oralbase, který byl patentován ve 40. letech 20. stol. Ve Francii a Švýcarsku je na trhu hydrofilní pasta Pansoral, která obsahuje mukoadhezivní polymer hydroxyethylcelulosu.²² V USA se prodává gel kyseliny polyakrylové bez obsahu léčiva, určený na ošetřování postmenopauzální suchosti pochvy. V tomto mukoadhezivním přípravku působí kyselina polyakrylová, která není neutralizována, jako slabě kyselý tlumící systém (pH hodnota přibližně 3-4). Hodnota pH v kyselé oblasti je v tomto případě fyziologicky žádoucí a umožňuje tomuto polymeru lépe přilnout k sliznici než při neutrálním pH.

Dále se bioadheziva používají v oftalmologii. Někdy je však těžké rozlišit, zda důvodem prodloužení doby působení vodného roztoku je prosté zvýšení viskozity nebo skutečná bioadheze.¹³

Jako specifická bioadheziva je možné použít lektiny, především rostlinného původu. Jedná se o proteiny nebo glykoproteiny rozdílné velikosti (M_w asi $9-15 \cdot 10^3$ Da). Používá se lektin izolovaný z ovocné šťávy zralých rajských jablek (*Lycopersicon esculentum*). Některé lektiny se vážou jen na povrch epitelových buněk, zatímco jiné v návaznosti na tuto primární bioadhezi mohou dát buňce podnět absorbovat vázané ligandy endocytotickými procesy do její cytoplazmy („bioinvaze“). Pomocí moderních metod genové technologie je možné určit lektiny na molekulární úrovni cíleně změnit,

dokonce i vytvořit adhezni a invazni faktory určitých kmenů bakterií ve vysoké čistotě a výtěžku. Tímto způsobem je možné vyrobit nové bioadhezivní, resp. bioinvazivní nosiče léčiv tím, že se takové molekulové struktury připojí na povrch koloidních nosičových systémů léčiv (např. lipozomů nebo nanočástic).¹³

Dále se provádí aplikace makromolekulových léčiv biotechnologického původu (proteiny nebo genové vektory) do bioadhezivních lékových forem.¹⁹

4.5 KYSELINA POLYMLÉČNÁ A POLYGLYKOLOVÁ

4.5.1 Příprava

Nejčastěji používané nosiče pro řízené uvolňování léčiv jsou polymery kyseliny mléčné a glykolové. Běžně se připravují polymerací za otevření kruhu cyklických diesterových dimerů, glykolidu a laktidu. Syntéza je iniciována 1-oktanolem, 1,6-hexandiolem nebo diethylenglykolem. Koncentrace iniciátoru reguluje molární hmotnost vznikajícího polymeru. Při syntéze homopolymeru vznikají vždy stejné produkty. Při syntéze kopolymerů se jednotlivé sekvence náhodně střídají. Přestože je výchozí poměr stejný, jsou získány kopolymer s různými fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Polymery kyseliny mléčné lze připravit i polykondenzací, postupným řetězením molekul kyseliny mléčné. Je to obecně proces probíhající za vysoké teploty, při němž probíhají vedlejší reakce, vznikají nečistoty a hlavně získaný polymer má nízkou molekulovou hmotnost. Proto se před přímou kondenzací kyseliny mléčné dává přednost polymeraci za otevření kruhu z cyklických laktidů.²³

4.5.2 Fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny polymléčné (PLA) a kyseliny polyglykolové (PGA)

PGA je krystalický, biodegradabilní polymer s teplotou tání (T_m) okolo 225 °C a s teplotou skelného přechodu (T_g) okolo 35 °C. Stavební jednotka v molekule PGA obsahuje nepolární methylenovou skupinu a relativně polární esterovou skupinu. PGA lze vystihnout empirickým vzorcem $(C_2H_2O_2)_n$. Ve srovnání s ostatními biodegradabilními polymery je PGA vysoce krystalický polymer s krystalinitou v rozmezí 35 % až 75 %.²⁴ Z jeho struktury vyplývají specifické chemické, fyzikální a mechanické vlastnosti. Polymer je nerozpustný ve většině organických rozpouštědel. PGA má velmi vysokou pevnost a modul elasticity. Biodegradace u PGA nastává hydrolýzou nestabilních esterových vazeb. Celková doba trvání degračního procesu

závisí na molekulové hmotnosti, stupni krystalinity, fyzikální geometrii a fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí.²⁵

PLA má odlišné chemické, fyzikální i mechanické vlastnosti než PGA. Rozdíl je dán přítomností methylové skupiny na α -uhlíku. Díky chirálnímu uhlíku jsou možné L, D, a D,L isomery PLA. Komerčně 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.²³ L-PLA je méně krystalický polymer než PGA s krystalinitou okolo 35 %.²⁶ D,L-PLA je amorfní polymer s teplotou skelného přechodu okolo 57 °C.²³ Pro praktické použití je preferována D,L-PLA, která umožňuje homogenní dispergaci účinné látky.²⁷

4.5.3 Využití kyseliny polymléčné a kyseliny polyglykolové

Polymerní biomateriály odvozené od kyseliny mléčné mají široké využití v medicíně, především na výrobu biodegradabilních stehů. Dále jsou hojně používány v kardiologii a ortopedii, kde slouží např. jako odbouratelné fixační implantáty při léčbě malých zlomenin. Tyto ortopedické implantáty se přirozeně přizpůsobí tělu a jsou jím postupně metabolizovány. Hmota polymeru je po částech transportována do zlomené kosti, kde pomáhá hojícímu procesu.

Polymer D,L-PLA je přednostně využíván jako nosič léčiv, používá se především pro inkorporaci různých antibiotik (gentamycin, sulfadiazin, adriamycin atd.). Může být také využit k inkorporaci antikancerogenních léčiv.

Implantáty z L-PLA lze též použít pro postupné uvolňování některých hormonů.

D,L-PLA bývá také používána k přípravě implantátu s řízeným uvolňováním. Díky znalosti degradace povrchovou erozí byly vyvinuty polymerní matrice umožňující uvolňování jednoho léčiva či dvou různých léčiv ve dvou fázích.²⁴

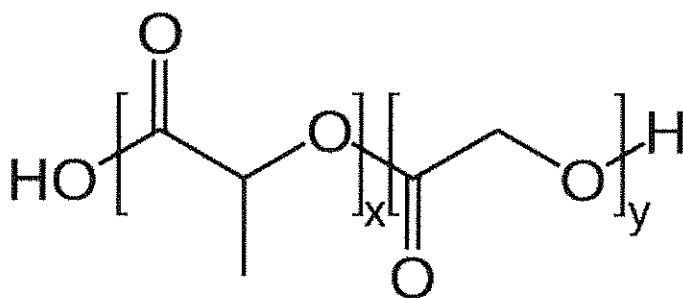
4.6 KOPOLYMERY KYSELINY MLÉČNÉ A GLYKOLOVÉ (PLGA)

4.6.1 Fyzikální a chemické vlastnosti PLGA

Fyzikální, chemické a biologické vlastnosti biodegradabilních polymerů mají hlavní vliv na uvolňování účinných látek z polymerních systémů.²⁸

PLA je více hydrofobní, a proto kopolymer s vyšším obsahem PLA je méně hydrofilní, absorbuje málo vody a následně se i pomaleji rozkládá, biologický rozklad trvá až 5 let.²⁸ Pro použití kopolymerů jako nosičů je především důležitá molekulová hmotnost a stupeň polydisperzity, což jsou faktory určující mechanickou pevnost,²⁴ rychlost

biodegradace a hydrolyzy. S velikostí molekulové hmotnosti souvisí i hodnota vnitřní viskozity, kterou jsou často kopolymery charakterizovány.²⁹ Výsledný stupeň krystalinity PLGA závisí na složení kopolymery. Pokud je připraven z L-PLA a PGA, vznikne krystalický kopolymer, zatímco kombinací D,L-PLA a PGA vznikne kopolymer amorfni.²⁴ Další důležitou charakteristikou je teplota skelného přechodu (T_g), která je vyšší než fyziologická teplota tzn. 37 °C.²⁹ Platí, že teplota skelného přechodu se zvyšuje v závislosti na vzrůstajícím podílu PLA v kopolymery a na zvyšující se molekulové hmotnosti.³⁰



Obr. 2: Vzorec PLGA, kde x je počet jednotek kyseliny mléčné a y je počet jednotek kyseliny glykolové.³¹

4.6.2 Degradace PLGA

Při kontaktu PLGA s vodou dochází k její penetraci do polymeru a k hydrolytickému štěpení esterových vazeb. V hydrofilním prostředí *in vitro* nebo *in vivo* dochází k biodegradaci za náhodného rozštěpení esterových skupin v řetězci.²⁷ Z každé esterové vazby vzniká nová koncová karboxylová skupina, která může katalyzovat štěpení dalších esterových vazeb, a tak nastává homogenní degradace.³² Rychlost degradace je závislá na molárním poměru PLA a PGA v řetězci kopolymery, molekulové hmotnosti, stupni krystalinity a teplotě skelného přechodu.²⁹

Biodegradaci lze rozdělit do 3 fází. V první fázi dochází k náhodnému rozštěpení řetězců za podstatného snížení molekulové hmotnosti, ale bez úbytku hmotnosti a bez tvorby rozpustných monomerů. Ve druhé fázi je snížení molekulové hmotnosti doprovázeno výrazným snížením hmotnosti, jsou ve větší míře tvořeny rozpustné oligomerní a monomerní produkty a nastává difúze v celém objemu matrice. Tento proces, zahrnující difúzi, chemickou reakci a disoluci, je příčinou rozdílu mezi poměrem povrchové a objemové degradace. Oligomery na povrchu matrice mohou na rozdíl od oligomerů uvnitř matrice degradovat dříve, než dojde k celkové degradaci matrice. Autokatalytický efekt karboxylových skupin lokalizovaných na povrchu

matrice oproti karboxylovým skupinám uvnitř matrice je malý. V prostředí pufrů navíc dochází k neutralizaci povrchových karboxylů. To vše vede ke snížení stupně povrchové degradace.³³

Ve třetí fázi vznikají rozpustné monomery z oligomerů a na konci této fáze je polymer už zcela solubilizován.³⁴

Role enzymů v biodegradaci PLGA je nejasná. Existují názory, že PLGA je zcela odbourávána na monomerní jednotky hydrolyzou, ale vliv enzymů není zcela vyloučen.²⁹

Po rozštěpení PLGA kopolymeru na PGA a PLA vstupuje PLA do citrátového cyklu, kde je metabolizována a z těla eliminována ve formě oxidu uhličitého a vody, zatímco PGA je z těla exkretována buď v nezměněné formě ledvinami, nebo také vstupuje do citrátového cyklu a po metabolizaci je vyloučena ve formě oxidu uhličitého a vody.²⁹

Celková doba degračního procesu závisí na molekulové hmotnosti, stupni krystalinity, fyzikální geometrii a fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí.²³ Může být řádově od několika dnů po několik let. Nejrychlejší degradaci vykazují kopolymery s nízkou molekulovou hmotností a poměrem kyseliny glykolové a mléčné 1:1.³⁵

4.6.3 Možnosti využití PLGA

Terapeutické systémy s řízeným uvolňováním tvořené polymery kyseliny mléčné resp. kopolymery PLGA se vyrábí nejčastěji ve formě mikročástic, nanočástic, implantátů a injekcí *in situ*. Do PLGA polymeru byla úspěšně inkorporována řada léčiv vyžadujících dlouhodobé kontinuální uvolňování, například disulfiram, finasterid, antiandrogen, melanotan-1 (analog α -melanocyty stimulujícího hormonu).³⁶

Biodegradabilní matrice z PLGA kopolymeru se také osvědčila pro implantáty s řízeným uvolňováním diklofenaku sodného. Jeho modifikací lze připravit implantátový systém obsahující diklofenak v gelové formě, který lze aplikovat pomocí speciálního injekčního vybavení.

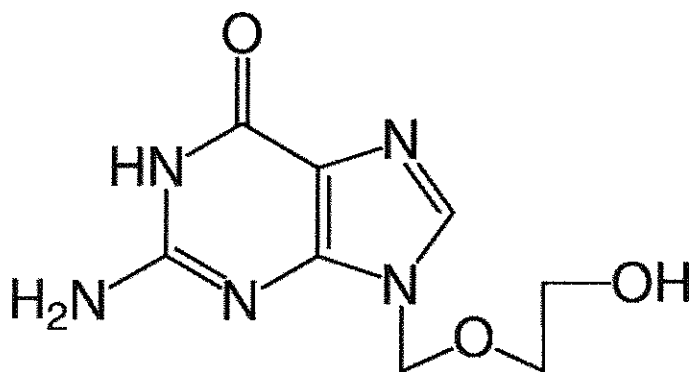
Makromolekuly, jako jsou proteiny, se z PLGA systémů uvolňují relativně rychle. Pro dlouhodobé uvolňování proteinů, jako jsou antigeny pro jednodávkovou imunizaci nebo peptidické hormony pro různá terapeutická využití, jsou požadovány PLGA maticové systémy s velmi nízkým obsahem léčiva. Celkové fyzikální charakteristiky lékové formy, jako jsou tvar a velikost, velmi málo ovlivňují stupeň uvolňování léčiva.³⁷

Dále se PLGA využívá jako médium pro růst kmenových buněk. Dalším směrem výzkumu je snaha obnovit přerušené nervové dráhy míchy, kde je PLGA používána jako „lešení“ pro zachycení nervových kmenových buněk. Vědci se díky jejich upoutání v polymerním nosiči snaží napravit a obnovit funkce přerušovaných nervů. Na univerzitě v Tallahassee vytvářejí z PLGA pěnu, kdy jednotlivé bublinky tvoří matici, na které se snaží vypěstovat funkční plicní tkáň. V neposlední řadě jsou snahy vědců na fóliích z kopolymeru nízkomolekulárních polymerů kyseliny mléčné a glykolové kultivovat lidské osteoblasty.³⁸ Dále se PLGA využívá v tkáňovém inženýrství jako nanovláknenný nosič (výrobce-firma Nanopharma, a.s.) a jako podpůrná struktura pro buňky, kdy kopolymery PLGA po dobu vývoje tkáně zastupují roli vlastní mezibuněčné hmoty.

4.7 LÉČIVA POUŽITÁ V EXPERIMENTU

4.7.1 Aciklovir

Aciklovir je nukleosidový derivát (9-/2-hydroxyethoxymethyl/guanin), má výrazný virostatický účinek zejména proti virům *Herpes simplex (I a II)* a *Varicella zoster* a méně účinný je proti cytomegalovirům a viru Epstein-Barrův.



Obr. 3: Vzorec acikloviru³⁹

Po průniku do virem infikované buňky je aciklovir pomocí virově specifické thymidinkinázy konvertován na monofosfátový derivát. Ten je pak buněčnými enzymy přeměněn až na aciklovirtrifosfát, který je vlastní účinnou látkou. Aciklovirtrifosfát působí jako inhibitor a falešný substrát pro virus specifickou DNA polymerázu a tím brání syntéze virové DNA, aniž by byly významně ovlivněny normální buněčné pochody.

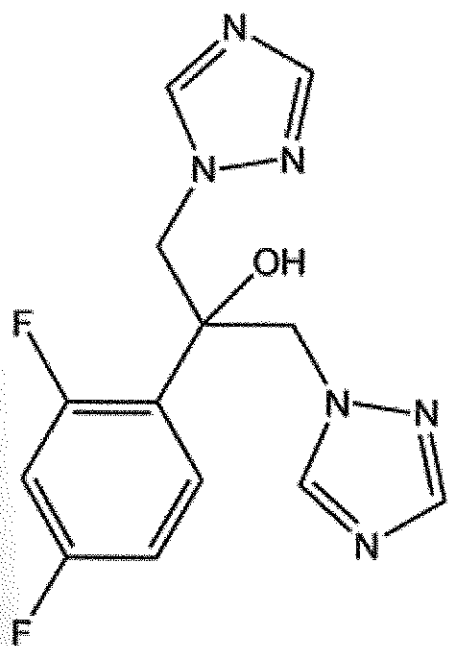
Rezistence k acikloviru vzniká jako důsledek deficiencie virové thymidinkinázy, nebo jako důsledek změn ve virové DNA polymeráze. Rezistence je obzvláště častá u pacientů s AIDS, kteří se dlouhodobě léčí.⁴⁰

Aciklovir se používá k léčbě kožních a slizničních forem infekcí vyvolaných virem *Herpes simplex I a II*, k potlačování nebo prevenci opakovaných infekcí u pacientů s normálním stavem imunity, k prevenci infekcí virem *Herpes simplex* u pacientů se změnou imunitní odpovědi, k léčbě infekcí virem *Varicella zoster*, k léčbě pacientů s výrazným snížením imunitní reakce, zvláště s pokročilým AIDS onemocněním nebo u pacientů po transplantaci kostní dřeně.⁴¹ Je zvláště vhodný u herpetických genitálních infekcí a herpetických mukokutánních infekcí u pacientů trpících AIDS. Aciklovir aplikovaný povrchově ve formě roztoku se také osvědčil pro léčbu herpetické keratitidy, podaný perorálně ve vysokých dávkách je schopen vést k rychlému uzdravení (do 24 hodin) dětí, které trpí závažnými formami planých neštovic. Aciklovir podaný intravenózně je též lékem volby u herpetické encefalitidy.⁴⁰

Aciklovir se používá k povrchové (krémy, oční masti), perorální (tablety, suspenze) i k intravenózní aplikaci (lyofilizát pro přípravu infuzního roztoku).

4.7.2 Flukonazol

Flukonazol je systémové azolové antimykotikum, patřící mezi triazoly. Je syntetického původu, jedná se o bis-triazolový derivát propanolu. Od ostatních azolových antimykotik se liší farmakokinetikou (je hydrofilní), má nejvyšší terapeutický index a má nejméně nežádoucích účinků a lékových interakcí.



Obr. 4: Vzorec flukonazolu⁴²

Mechanismus fungistatického účinku spočívá v inhibici enzymů konečné fáze syntézy ergosterolu v membráně hub. Ergosterol je nejvýznamnější strukturní sterol buněčné

membrány mikromycet. K inhibici konverze lanosterolu na ergosterol dochází prostřednictvím enzymu C-14- α -demetylázy, jejíž katalytická aktivita je závislá na cytochromu P450. Klíčovým krokem účinku azolových antimykotik je právě blokáda cytochromu P450. Inhibicí syntézy buněčné stěny omezují kolonizaci sliznic a adhezi kandid na endotel, umělé povrchy (katétr, chlopenní a kloubní náhrady) apod.

Nejcitlivější k flukonazolu jsou *Candida* spp., která je nejcitlivější (méně non-albicans kmeny), *Cryptococcus* spp., dermatofyty (*Microsporum* spp. a *Trichophyton* spp.). Flukonazol je účinný i u endemických mykóz, jako jsou infekce způsobené *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* (včetně intrakraniálních infekcí) a *Histoplasma capsulatum*.⁴⁰

Rezistentní jsou kmeny *Candida krusei* a *Candida glabrata*, flukonazol dále není vhodný k léčbě aspergilových infekcí a zygomycóz. U těchto infekcí je vhodný jen itrakonazol.

Flukonazol je indikován k léčbě a profylaxi mykotických infekcí.

- Kryptokokóza (kryptokoková meningitida a jiné formy infekce - např. plicní, kožní). K léčbě nemocných bez imunitního deficitu i pacientů s AIDS, po orgánové transplantaci či s jinou formou porušené imunity. Flukonazol lze použít pro udržovací léčbu k zabránění relapsu kryptokokového onemocnění u pacientů s AIDS.
- Systémová kandidóza, diseminovaná kandidóza včetně kandidémie a další formy invazivní kandidové infekce, mezi něž patří infekce peritoneální, postižení endokardu, oka, plic, močového ústrojí, jater a sleziny a dalších orgánů. Léčba je indikována zejména u pacientů s maligním onemocněním, kteří dostávají cytotoxickou nebo imunosupresivní terapii, anebo jsou vlivem jiných faktorů predisponováni ke kandidové infekci.
- Slizniční kandidózy, k nimž patří orofaryngeální, jícnová a neinvazivní bronchopulmonální infekce, kandidurie, mukokutánní a chronická orální atrofická kandidóza (záněty vzniklé pod umělým chrupem). Léčit je možné jak nemocné imunologicky oslabené, tak i osoby s neporušenou imunitou.
- Kandidóza genitálu
 - vulvovaginální kandidóza, akutní či recidivující, dále jako profylaxe ke snížení výskytu rekurentní vaginální kandidózy (3 nebo více epizod ročně).

- kandidová balanitída (zánět žaluďu penisu), která je často spojená se zánětem předkožky.
- Prevence mykóz, především u pacientů s malignitami, u nichž je zvýšené riziko těchto infekcí důsledkem cytotoxické chemoterapie nebo radioterapie.
- Dermatomykózy, mezi něž řadíme *tinea pedis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea versicolor*, *tinea unguium* (onychomykóza) a kožní kandidové infekce.
- Systémové endemické mykózy u imunokompetentních nemocných, jako jsou kokcidiomykóza, parakokcidiomykóza, sporotrichóza a histoplazmóza.
- Profylaxe relapsu orofaryngeální kandidózy u pacientů s AIDS, u pacientů s malignitami, u nichž je zvýšené riziko těchto infekcí důsledkem cytotoxické chemoterapie nebo radioterapie.⁴³

Flukonazol se používá pro perorální (tobolky, sirup, suspenze) i pro parenterální podání (infúzní roztok).

Proběhly různé studie, jejichž snahou bylo zvýšit antifungální aktivitu flukonazolu, např. byly zkoumány komplexní sloučeniny flukonazolu a stříbra. U polymerních sloučenin $[Ag(HFlu)(NO_3)]_n$ a $\{[Ag(HFlu)_2](ClO_4)\}_n$ bylo zjištěno, že mají vyšší antifungální aktivitu než samotný flukonazol, především proti *Aspergillus niger*, jen antifungální účinnost proti *Candida albicans* je stejná jako u flukonazolu.⁴⁴

Dále proběhly studie, ve kterých se flukonazol zkoušel aplikovat i topicky, ve formě vaginálního gelu. Kvůli lipofilním vlastnostem flukonazolu byla připravena mikroemulze. K mikroemulzi byla přidána vhodná gelotvorná látka (Carbopol® ETD 2020), díky které nedošlo ke změně struktury mikroemulze a především díky které byly zajištěny bioadhezivní vlastnosti lékové formy. Bylo zjištěno, že topická aplikace antifungálních látek má vyšší účinnost než orální léčba,⁴⁵ že dochází k rychlejšímu uvolnění účinné látky, vyšší koncentraci v dané tkáni a menším systémovým nežádoucím účinkům. Vaginální gel s flukonazolem by byl také velmi důležitý pro léčbu těhotných žen,⁴⁶ neboť pro ně je právě perorální léčba flukonazolem nevhodná. Sledovala se bioadheze *in vitro*, vaginální dráždění u samic králíků a proběhla i pilotní studie u žen. Jako porovnání v této studii sloužil Candid-V® gel (vaginální gel obsahující clotrimazol). Bylo zjištěno, že zkoušený vaginální gel s flukonazolem má vyšší bioadhezivní i antifungální vlastnosti než Candid-V® gel, vaginální dráždění nebylo pozorováno ani u jednoho zkoušených gelů a byly dobře tolerovány. V pilotní studii bylo zjištěno, že ženy léčené vaginálním gelem s flukonazolem zaznamenaly zmírnění symptomů vaginální kandidózy během dvou dnů

a po šesti dnech léčby většina symptomů byla minimální. Pacientky léčené Candid-V[®] gelem zaznamenaly zmírnění symptomů třetí den a po šesti dnech léčby byly symptomy také minimální. Nyní probíhají větší klinické studie.⁴⁷

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 POUŽITÉ SUROVINY:

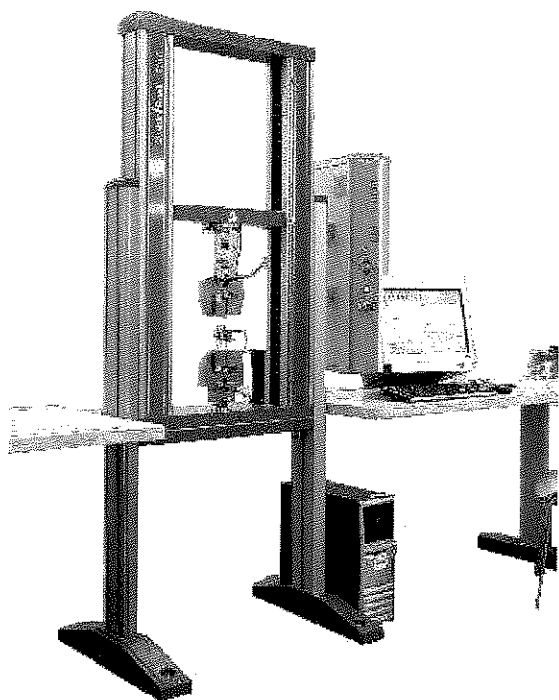
- 1P...Terpolymer kys. D,L-mléčné, kys. glykolové a 1% pentaerythritolu (FaF UK HK)
3P...Terpolymer kys. D,L-mléčné, kys. glykolové a 3% pentaerythritolu (FaF UK HK)
5P...Terpolymer kys. D,L-mléčné, kys. glykolové a 5% pentaerythritolu (FaF UK HK)
1T..Terpolymer kys. D,L-mléčné, kys. glykolové a 1% tripentaerythritolu (FaF UK HK)
3T..Terpolymer kys. D,L-mléčné, kys. glykolové a 3% tripentaerythritolu (FaF UK HK)
5T..Terpolymer kys. D,L-mléčné, kys. glykolové a 5% tripentaerythritolu (FaF UK HK)
TEC....Triethylcitrát (Merck Mnichov)
Flukonazol (Zentiva a.s. Praha)
Aciklovir (Pliva Lachema)
Kyselina citronová mohohydrát (Lachema Neratovice)
Hydrogenfosfát sodný dodekahydrát (Lachema Neratovice)
Azid sodný (Fluka)
Mucin z prasečího žaludku Typ III (Sigma – Aldrich spol. s.r.o. Praha)

5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE:

- Digitální váhy KERN 440-33, max. 200g, d = 0,01g firmy Fischer Scientific Pardubice
Analytické digitální váhy KERN ABS 220-4, max. 220 g, d = 0,0001 g firmy Fisher Scientific Pardubice
Materiálový zkušební stroj T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell
Horkovzdušná sušárna HS 61 A
Digitální pH-metr HANNA pH 223
Spektrofotometr HELIOS GAMMA firmy Unicam
Biologický termostat BT 120 firmy Chirana Brno

5.2.1 Materiálový zkušební stroj T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell

Tento zkušební stroj má univerzální použití. Lze ho uzpůsobit téměř pro všechny požadavky národních a mezinárodních standardů. Je použitelný pro rutinní testování i pro studium mechanických vlastností materiálů, umožňuje tlakové, tahové a ohybové testy materiálu. Software Master test lze předem definovat pro nejčastěji používané zkoušky nebo komplexní testy.



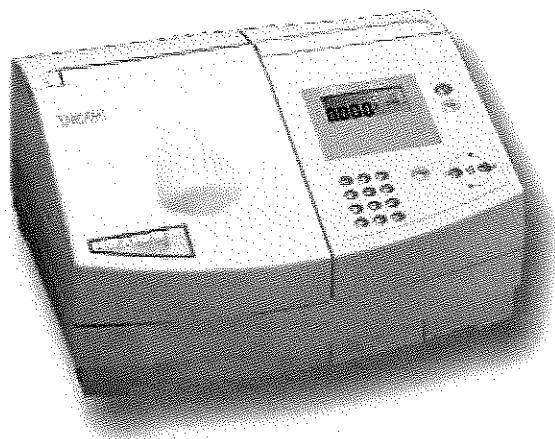
V softwaru Mater test byla servisním technikem vytvořena šablona *Adheze 2 kN* pro měření adheze materiálu. V šabloně byla předem definována většina parametrů, pouze níže uvedené parametry byly zvoleny pro tento experiment:

- Zatížení – zkušební cyklus: standardní síla 10 N
- Jiná rychlost pro odlehčení: 100 mm/min
- Prodleva na referenční hodnotu síly při zatěžování: 60 s

Obr. 5: Materiálový zkušební stroj T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell⁴⁸

5.2.2 Spektrofotometr HELIOS GAMMA firmy Unicam

Obr. 6: Spektrofotometr HELIOS GAMMA firmy Unicam⁴⁹



Jedná se o jednopaprskový spektrofotometr pracující v ultrafialové i viditelné oblasti spektra, který umožňuje přímé měření absorbance, transmitance i koncentrace. Obsahuje deuteriovou lampu – zdroj záření pro UV oblast, proto je přístroj vhodný pro měření absorbance při vlnových délkách pod 325 nm.

Po spuštění přístroje je nutné počkat 30 min na jeho vytemperování.

Po nastavení vlnové délky pro UV oblast se automaticky zapne deuteriová lampa, pro kterou je potřeba interval 15 minut pro její stabilizaci.

5.3 PŘÍPRAVA PUFRU A VZORKŮ:

5.3.1 Příprava pufru

Liberačním médiem pro flukonazol i aciklovir byl zvolen fosfát citrátový pufr pH 7,0. Podle chemických tabulek Merck se 1000 ml pufru připraví smícháním x dílů roztoku A s 100-x díly roztoku B. Pro fosfát citrátový pufr pH 7,0 se použije 190 ml 0,1 M roztoku kyseliny citronové monohydrátu (roztok A) a 810 ml 0,2 M roztoku hydrogenfosfátu sodného dihydrátu (roztok B). K dispozici byl pouze hydrogenfosfát sodný dodekahydrát, takže množství dihydrátu odečtené z tabulek muselo být přepočítáno na dodekahydrát.

Po důkladném rozpuštění jsem změřila hodnotu pH vykalibrovaným digitálním pH-metrem a případná odchylka byla eliminována přidávkem malého množství kyseliny citrónové nebo dihydrogenfosforečnanu sodného. Aby byla zachována antimikrobiální stabilita, přidala jsem 0,02% azidu sodného (0,2 g azidu sodného na 1000 ml pufru).

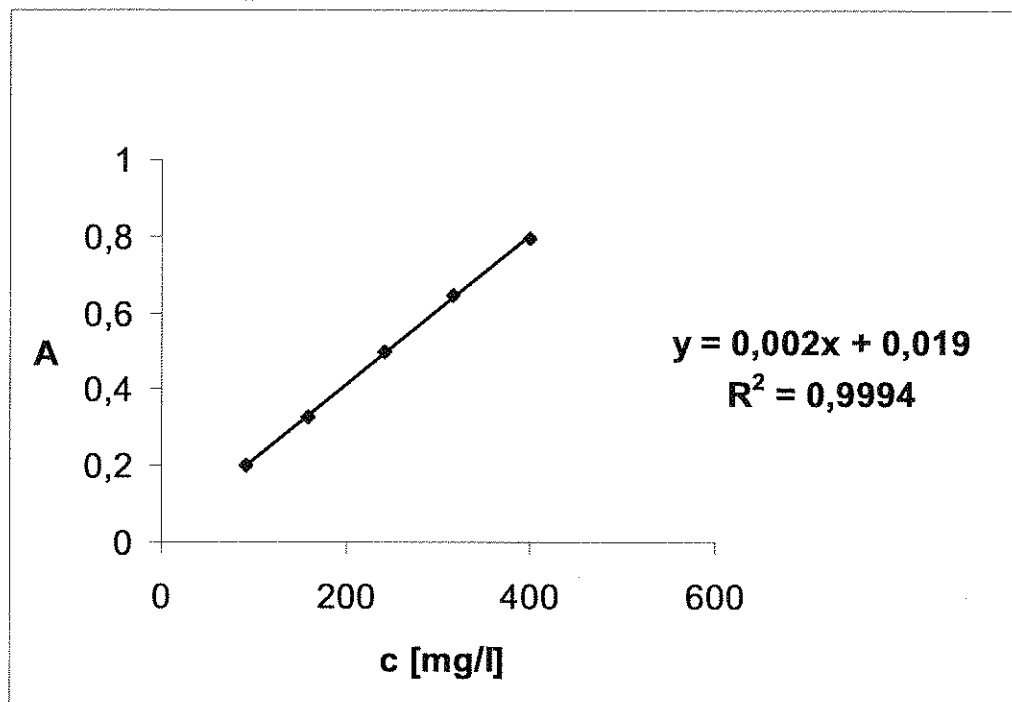
5.3.2 Kalibrační přímka flukonazolu

K sestavení kalibrační přímky flukonazolu jsem připravila zásobní roztok o koncentraci 400 mg/l. Léčivo tvořilo velmi těžce rozpustné shluky částic, proto byl roztok vložen na 1 min do ultrazvuku. Poté byl na 24 hod umístěn do termostatu vytemperovaného na 37°C. Zásobní roztok jsem postupně ředila na roztoky o koncentraci 92-400 mg/l (tab. 2). Poté jsem změřila absorbance jednotlivých roztoků proti fosfát citrátovému pufru při vlnové délce 261 nm, při níž má flukonazol absorpční maximum. Z naměřených hodnot absorbance jsem sestrojila kalibrační přímku, zjistila její rovnici a hodnotu korelačního koeficientu (obr. 7).

Tab. 2: Absorbance roztoků flukonazolu při 261 nm

Koncentrace flukonazolu [mg/l]	A
400	0,796
316	0,645
242	0,499
159	0,326
93	0,200

Obr. 7: Kalibrační přímka flukonazolu



5.3.3 Kalibrační přímka acikloviru

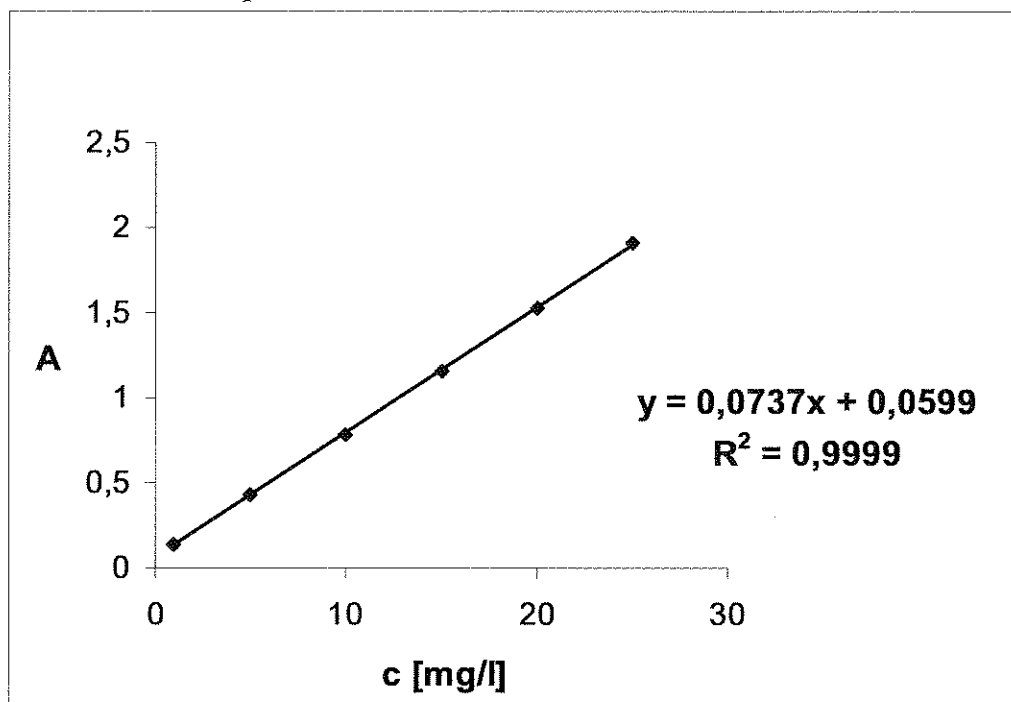
K sestrojení kalibrační přímky acikloviru jsem připravila zásobní roztok o koncentraci 25 mg/l, který jsem postupně ředila na roztoky o koncentraci 1-25 mg/l (tab. 3). Celkem bylo připraveno 6 roztoků. Poté jsem změřila absorbance jednotlivých roztoků proti fosfát citrátovému pufru při vlnové délce 256 nm, při níž má aciklovir absorpční maximum.

Z naměřených hodnot absorbance jsem sestrojila kalibrační přímku, zjistila její rovnici a hodnotu korelačního koeficientu (obr. 8).

Tab. 3: Absorbance roztoků acikloviru při 256 nm

Koncentrace acikloviru [mg/l]	A
1	0,136
5	0,436
10	0,787
15	1,16
20	1,53
25	1,91

Obr. 8: Kalibrační přímka acikloviru



5.3.4 Příprava matric

Matrice byly tvořeny z 66 % nosiče, 30 % triethylcitrátu ve funkci plastifikátoru a 4 % léčiva. Jako nosič byly použity větvené terpolymery kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a pentaerythritolu (řada P) nebo tripentaerythritolu (řada T).

Do malé kádinky jsem si navázila 3,3 g polymeru a nechala jsem jej roztavit v sušárně na 60°C. Po změknutí jsem přidala 1,5 g triethylcitrátu. Směs jsem zahřívala a důkladně zhomogenizovala kopistkou. Nakonec jsem přidala 0,2 g léčiva (flukonazolu) a opět zahřívala a zhomogenizovala. Hotový vzorek jsem přikryla alobalem a označila názvem nosiče a léčiva. Postupně jsem si připravila vzorky pro jednotlivé polymery: 1P, 3P, 5P, 1T, 3T a 5T.

Stejným způsobem jsem připravila vzorky s aciklovirem, které jsem také řádně označila.

Na analytických vahách jsem 150 mg vzorku s flukonazolem navázila na dno každé ze tří scintilačních lahvíček, přelila 15,0 g fosfát citrátového pufru, řádně označila a dala do termostatu vytemperovaného na 37°C. V pravidelných časových intervalech jsem odebírala disoluční kapalinu, opět dovážila 15,0 g fosfát citrátového pufru a vložila do termostatu.

Stejný postup jsem zopakovala i u vzorků s aciklovirem.

5.4 POSTUP MĚŘENÍ

5.4.1 Měření adheze

Po zapnutí zkušebního stroje a k němu připojeného počítače jsem nejdříve zkontrolovala předdefinované parametry měření a nastavila testovací parametry dle zadání experimentu: kontaktní síla 10 N, kontaktní doba 60 s, rychlost odtržení vzorku od podkladu 100 mm/min.

Na spodní plochu jsem umístila korkovou destičku, na kterou jsem před každým měřením nanesla tenkou vrstvu hydratovaného mucinu získaného ze sliznice prasečího žaludku. (Příprava hydratovaného mucinu: navázila jsem 1,0 g mucinu z prasečích žaludků, 14,0 g destilované vody a v třence jsem postupně mísila mucin s vodou do získání homogenního slizu.) Na horní plochu nástavce jsem nanesla tenkou vrstvu měřeného vzorku. Ovládáním pomocí PC jsem nastavila výchozí vzdálenost horní a dolní plochy nástavců, vynulovala sílu a spustila vlastní zkoušku. Horní plocha se pohybovala směrem dolů, (pohyb z výchozí pozice LE 25 mm rychlostí 25 mm/min do okamžiku, kdy se přiblíží na zkušební vzdálenost čelistí 5 mm, po dosažení této vzdálenosti rychlostí 10 mm/min) až se plochy dostaly do kontaktu. Následovala doba kontaktu 60 s, zatížení 10 N a poté se horní čelist odtrhla rychlostí 100 mm/min. Snímač síly zaznamenal maximální sílu nutnou pro odtržení obou ploch F_{\max} . Po ukončení zkoušky se automaticky nastavila výchozí poloha obou ploch LE 25 mm.

Mezi každým měřením jsem odstranila z horní plochy i z korkové destičky veškeré zbytky vzorku i mucinu pomocí acetonu a znova vytvořila tenkou vrstvu mucinu na korkové destičce a tenkou vrstvu vzorku na horní ploše. Prováděla jsem vždy pět měření pro stejný vzorek za daných podmínek.

5.4.2 Měření absorbance

Po zapnutí spektrofotometru jsem počkala 30 minut na jeho vytemperování. Poté jsem nastavila vlnovou délku, při které má daná látka absorpční maximum. Obě vlnové délky použité v experimentu spadají do UV oblasti, automaticky tedy byla spuštěna deuteriová lampa (zdroj záření pro UV oblast). Po její stabilizaci (15 minut) jsem vložila do měřicí cely kyvetu se slepým vzorkem, který byl tvořen pufrem. Po zobrazení hodnoty absorbance jsem stiskla klávesu Zero, při které došlo k vynulování hodnoty, aby pufř neměl rušivý vliv na naměřenou absorbanci vzorku. Po vyjmutí slepého vzorku jsem do měřicí cely vložila kyvetu se vzorkem a zaznamenala naměřenou hodnotu

absorbance. Po vyjmutí kyvety se vzorkem jsem vzorek odstranila a kyvetu důkladně opláchla destilovanou vodou a vysušila.

5.5 STANOVENÍ UVOLNĚNÉHO LÉČIVA

5.5.1 Stanovení flukonazolu

Z odebraných vzorků disoluční kapaliny jsem pomocí naměřené absorbance při 261 nm stanovila množství uvolněného flukonazolu. Na začátku pokusu byly intervaly odběrů krátké (3 hod., 6 hod.), aby byl zachycen počátek liberace (případný burst efekt nebo lag time). Dále byly vzorky disoluční kapaliny odebírány v intervalu 24 hod. po dobu, kdy probíhalo uvolňování léčiva z matric. Ke konci experimentu byly časové intervaly prodlouženy na několik dní a pokus byl ukončen, pokud se z matric uvolnilo veškeré množství léčiva, nebo se léčivo již neuvolňovalo.

Výpočet uvolněného léčiva

Podle vzorce odvozeného z rovnice kalibrační přímky jsem vypočetla množství uvolněného léčiva. Hodnoty pak byly převedeny na podíl liberovaného množství k celkovému množství léčiva v matrici v %. Průběh liberace byl vyjádřen graficky jako závislost kumulativních % uvolněného léčiva na čase.

Rovnice kalibrační přímky flukonazolu:

$$y = 0,002x + 0,019$$

Výpočet uvolněného flukonazolu:

$$x_1 = \frac{y - 0,019}{0,002}$$

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

$$x\% = \frac{x_2}{0,04 \times m_n} \times 100$$

x_1množství léčiva [mg/l]

x_2množství léčiva v 15 ml [mg/l]

$x\%$podíl liberovaného léčiva [%]

D.....ředění vzorku

m_nnavážka matrice

y.....absorbance

5.5.2 Stanovení acikloviru

Z odebraných vzorků disoluční kapaliny jsem pomocí naměřené absorbance při 256 nm stanovila množství uvolněného acikloviru. Intervaly odběrů byly stejné jako u stanovení flukonazolu. Ke konci experimentu byly časové intervaly prodlouženy na několik dní a pokus byl ukončen, pokud se z matric uvolnilo veškeré množství léčiva, nebo se léčivo již neuvolňovalo.

Výpočet uvolněného léčiva

Podle vzorce odvozeného z rovnice kalibrační přímky jsem vypočetla množství uvolněného léčiva. Hodnoty pak byly převedeny na podíl liberovaného množství k celkovému množství léčiva v matrici v %. Průběh liberace byl vyjádřen graficky jako závislost kumulativních % uvolněného léčiva na čase.

Rovnice kalibrační přímky acikloviru:

$$y = 0,0737x + 0,0599$$

Výpočet uvolněného acikloviru:

$$x_1 = \frac{y - 0,0599}{0,0737}$$

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

$$x\% = \frac{x_2}{0,04 \times m_n} \times 100$$

x_1množství léčiva [mg/l]

x_2množství léčiva v 15 ml [mg/l]

$x\%$podíl liberovaného léčiva [%]

D.....ředění vzorku

m_nnavážka matrice

y.....absorbance

6 VÝSLEDKY

6.1 TABULKY

6.1.1 Měření adheze vzorků s flukonazolem:

Pro výpočet tlaku F/S jsem počítala s plochou horní plochy nástavce zkušebního stroje.

$$d = 20,11 \text{ mm}$$

$$S = \pi r^2 = 317,62 \text{ mm}^2$$

d..... poloměr horní plochy nástavce [mm]

S..... plocha [mm²]

F..... síla [N]

s..... směrodatná odchylka síly

s'..... směrodatná odchylka tlaku

Tab. 4: Adhezivita matrice 1P

č. měření	F_{\max}	F[N]	s	F/S [mN/mm ²]	s'
1	12,72	14,63	1,38	46,06	4,34
2	14,09				
3	14,83				
4	16,48				
5	15,06				

Tab. 5: Adhezivita matrice 3P

č. měření	F_{\max}	F[N]	s	F/S [mN/mm ²]	s'
1	9,80	10,23	1,22	32,21	3,84
2	11,61				
3	11,05				
4	8,45				
5	10,22				

Tab. 6: Adhezivita matrice 5P

č. měření	F_{\max}	F[N]	s	F/S [mN/mm ²]	s'
1	12,61	14,62	1,93	46,03	6,08
2	13,26				
3	13,90				
4	16,87				
5	16,48				

Tab. 7: Adhezivita matrice 1T

č. měření	F_{\max}	F[N]	s	F/S [mN/mm ²]	s'
1	15,77	17,99	2,34	56,64	7,37
2	19,62				
3	17,71				
4	15,79				
5	21,04				

Tab. 8: Adhezivita matrice 3T

č. měření	F_{\max}	F[N]	s	F/S [mN/mm ²]	s'
1	15,74	17,55	2,14	55,25	6,74
2	15,07				
3	20,07				
4	19,11				
5	17,78				

Tab. 9: Adhezivita matrice 5T

č. měření	F_{\max}	F[N]	s	F/S [mN/mm ²]	s'
1	10,15	11,36	1,76	35,77	5,54
2	12,34				
3	13,95				
4	9,67				
5	10,69				

Tab. 10: Porovnání adhezivity matric s flukonazolem

typ polymeru	F[N]	s	F/S [mN/mm ²]	s'
1P	14,63	1,38	46,06	4,34
3P	10,23	1,22	32,21	3,84
5P	14,62	1,93	46,03	6,08
1T	17,99	2,34	56,64	7,37
3T	17,55	2,14	55,25	6,74
5T	11,36	1,76	35,77	5,54

6.1.2 Liberace flukonazolu

Tab. 11: Liberace flukonazolu z matrice 1P

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,114	1	0,713	11,83	13,71	13,71
	0,134	1	0,863	14,55		
	0,135	1	0,870	14,76		
6 hod	0,077	1	0,435	7,22	15,03	28,74
	0,096	1	0,578	9,74		
	0,240	1	1,658	28,11		
24 hod	0,355	1	2,520	41,83	36,82	65,56
	0,295	1	2,070	34,92		
	0,284	1	1,988	33,71		
48 hod	0,158	1	1,043	17,31	15,83	81,39
	0,149	1	0,975	16,45		
	0,127	1	0,810	13,74		
4 dny	0,163	1	1,080	17,93	14,44	95,82
	0,109	1	0,675	11,39		
	0,129	1	0,825	13,99		
7 dní	0,096	1	0,578	9,59	10,96	106,79
	0,169	1	1,125	18,98		
	0,053	1	0,255	4,32		

Tab. 12: Liberace flukonazolu z matrice 3P

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,112	1	0,698	11,78	15,96	15,96
	0,144	1	0,938	15,81		
	0,180	1	1,208	20,29		
6 hod	0,137	1	0,885	14,95	18,74	34,70
	0,162	1	1,073	18,09		
	0,203	1	1,380	23,19		
24 hod	0,311	1	2,190	36,99	34,81	69,51
	0,288	1	2,018	34,03		
	0,284	1	1,988	33,39		
48 hod	0,086	1	0,503	8,49	8,85	78,36
	0,104	1	0,638	10,75		
	0,077	1	0,435	7,31		
4 dny	0,106	1	0,653	11,02	11,04	89,40
	0,132	1	0,848	14,30		
	0,081	1	0,465	7,81		
7 dní	0,114	1	0,713	12,04	9,48	98,89
	0,092	1	0,548	9,24		
	0,076	1	0,428	7,18		
13 dní	0,054	1	0,263	4,43	2,28	101,17
	0,022	1	0,023	0,38		
	0,035	1	0,120	2,02		

Tab. 13: Liberace flukonazolu z matrice 5P

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,179	1	1,200	19,97	19,38	19,38
	0,168	1	1,118	18,79		
	0,173	1	1,155	19,38		
6 hod	0,182	1	1,223	20,35	22,02	41,40
	0,165	1	1,095	18,41		
	0,236	1	1,628	27,31		
24 hod	0,313	1	2,205	36,70	37,68	79,08
	0,323	1	2,280	38,33		
	0,321	1	2,265	38,00		
48 hod	0,097	1	0,585	9,74	9,17	88,25
	0,103	1	0,630	10,59		
	0,076	1	0,428	7,17		
4 dny	0,062	1	0,323	5,37	4,69	92,93
	0,056	1	0,278	4,67		
	0,051	1	0,240	4,03		
7 dní	0,043	1	0,180	3,00	2,80	95,74
	0,042	1	0,173	2,90		
	0,039	1	0,150	2,52		

Tab. 14: Liberace flukonazolu z matrice 1T

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,216	1	1,478	24,25	23,51	23,51
	0,211	1	1,440	23,62		
	0,202	1	1,373	22,66		
6 hod	0,073	1	0,405	6,65	6,70	30,21
	0,078	1	0,443	7,26		
	0,069	1	0,375	6,19		
24 hod	0,192	1	1,298	21,30	21,29	51,51
	0,198	1	1,343	22,02		
	0,185	1	1,245	20,56		
48 hod	0,061	1	0,315	5,17	5,43	56,93
	0,062	1	0,323	5,29		
	0,066	1	0,353	5,82		
4 dny	0,170	1	1,133	18,59	17,97	74,90
	0,156	1	1,028	16,86		
	0,168	1	1,118	18,45		
7 dní	0,149	1	0,975	16,00	18,34	93,24
	0,174	1	1,163	19,07		
	0,180	1	1,208	19,94		
13 dní	0,048	1	0,218	3,57	3,25	96,48
	0,042	1	0,173	2,83		
	0,046	1	0,203	3,34		

Tab. 15: Liberace flukonazolu z matrice 3T

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,117	1	0,735	12,34	13,64	13,64
	0,121	1	0,765	12,84		
	0,143	1	0,930	15,75		
6 hod	0,033	1	0,105	1,76	1,98	15,62
	0,041	1	0,165	2,77		
	0,030	1	0,083	1,40		
24 hod	0,238	1	1,643	27,58	29,69	45,30
	0,236	1	1,628	27,31		
	0,288	1	2,018	34,17		
48 hod	0,125	1	0,795	13,35	14,73	60,04
	0,139	1	0,900	15,10		
	0,143	1	0,930	15,75		
4 dny	0,169	1	1,125	18,89	18,56	78,60
	0,159	1	1,050	17,62		
	0,170	1	1,133	19,18		
7 dní	0,088	1	0,518	8,69	7,91	86,51
	0,086	1	0,503	8,43		
	0,071	1	0,390	6,61		
13 dnů	0,064	1	0,338	5,67	4,12	90,63
	0,048	1	0,218	3,65		
	0,043	1	0,180	3,05		
20 dnů	0,112	1	0,698	11,71	9,84	100,48
	0,093	1	0,555	9,31		
	0,086	1	0,503	8,51		
28 dnů	0,083	1	0,480	8,06	7,45	107,92
	0,079	1	0,450	7,55		
	0,072	1	0,398	6,73		

Tab. 16: Liberace flukonazolu z matrice 5T

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,060	1	0,308	5,16	4,75	4,75
	0,048	1	0,218	3,67		
	0,062	1	0,323	5,43		
6 hod	0,073	1	0,405	6,80	8,12	12,87
	0,065	1	0,345	5,82		
	0,112	1	0,698	11,74		
24 hod	0,210	1	1,433	24,05	28,32	41,20
	0,222	1	1,523	25,68		
	0,298	1	2,093	35,23		
48 hod	0,124	1	0,788	13,22	13,55	54,75
	0,144	1	0,938	15,81		
	0,111	1	0,690	11,62		
4 dny	0,158	1	1,043	17,50	16,37	71,12
	0,172	1	1,148	19,36		
	0,116	1	0,728	12,25		
7 dní	0,174	1	1,163	19,52	16,20	87,31
	0,158	1	1,043	17,59		
	0,110	1	0,683	11,49		
13 dní	0,059	1	0,300	5,04	3,58	90,89
	0,050	1	0,233	3,92		
	0,033	1	0,105	1,77		

6.1.3 Liberace acikloviru

Tab. 17: Liberace acikloviru z matrice 1P

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,675	2	0,250	4,02	4,66	4,66
	0,762	2	0,286	4,74		
	0,822	2	0,310	5,21		
6 hod	0,553	1	0,100	1,61	1,72	6,38
	0,524	1	0,094	1,57		
	0,642	1	0,118	1,99		
24 hod	0,238	10	0,362	5,82	5,90	12,28
	0,233	10	0,352	5,84		
	0,236	10	0,358	6,02		
48 hod	0,426	5	0,373	5,98	5,45	17,73
	0,398	5	0,344	5,71		
	0,333	5	0,278	4,67		
4 dny	0,630	10	1,160	18,63	16,20	33,93
	0,518	10	0,932	15,47		
	0,484	10	0,863	14,50		
7 dní	0,417	10	0,727	11,67	13,84	47,77
	0,555	10	1,008	16,72		
	0,444	10	0,782	13,13		
13 dní	1,055	5	1,013	16,26	14,62	62,39
	0,728	5	0,680	11,28		
	1,014	5	0,971	16,31		
20 dní	0,542	5	0,491	7,88	5,53	67,92
	0,234	5	0,177	2,94		
	0,398	5	0,344	5,78		

Tab. 18: Liberace acikloviru z matrice 3P

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,195	5	0,137	2,25	1,64	1,64
	0,124	5	0,065	1,07		
	0,153	5	0,095	1,60		
6 hod	0,650	2	0,240	3,94	3,28	4,93
	0,414	2	0,144	2,37		
	0,573	2	0,209	3,54		
24 hod	0,204	10	0,293	4,80	4,03	8,96
	0,148	10	0,179	2,95		
	0,186	10	0,257	4,35		
48 hod	0,520	2	0,187	3,07	2,44	11,40
	0,373	2	0,127	2,10		
	0,370	2	0,126	2,14		
4 dny	0,422	5	0,368	6,04	3,83	15,23
	0,244	5	0,187	3,09		
	0,198	5	0,141	2,38		
7 dní	0,300	10	0,489	8,01	6,20	21,43
	0,225	10	0,336	5,53		
	0,207	10	0,299	5,07		
13 dní	1,054	5	1,012	16,57	22,35	43,78
	1,454	5	1,419	23,36		
	1,633	5	1,601	27,11		
20 dní	0,730	10	1,364	22,34	20,94	64,72
	0,713	10	1,329	21,89		
	0,599	10	1,097	18,58		

Tab. 19: Liberace acikloviru z matrice 5P

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,792	10	1,490	24,87	27,36	27,36
	0,988	10	1,889	31,57		
	0,805	10	1,516	25,65		
6 hod	0,705	10	1,313	21,91	21,61	48,97
	0,716	10	1,335	22,32		
	0,658	10	1,217	20,59		
24 hod	0,384	10	0,660	11,01	8,67	57,64
	0,258	10	0,403	6,74		
	0,300	10	0,489	8,27		
48 hod	0,591	1	0,108	1,80	1,82	59,45
	0,183	1	0,025	0,42		
	0,997	1	0,191	3,23		
4 dny	0,228	1	0,034	0,57	0,77	60,23
	0,060	1	0,000	0,00		
	0,567	1	0,103	1,75		

Tab. 20: Liberace acikloviru z matrice 1T

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,499	10	0,894	15,15	13,18	13,18
	0,430	10	0,753	12,59		
	0,403	10	0,698	11,81		
6 hod	0,391	5	0,337	5,71	4,47	17,65
	0,291	5	0,235	3,93		
	0,279	5	0,223	3,77		
24 hod	0,232	10	0,350	5,94	5,96	23,61
	0,255	10	0,397	6,64		
	0,214	10	0,314	5,31		
48 hod	0,421	5	0,367	6,23	6,36	29,97
	0,435	5	0,382	6,38		
	0,436	5	0,383	6,47		
4 dny	0,861	10	1,630	27,63	19,85	49,83
	0,621	10	1,142	19,08		
	0,433	10	0,759	12,84		
7 dní	0,331	10	0,552	9,35	12,23	62,06
	0,498	10	0,892	14,90		
	0,421	10	0,735	12,43		
13 dní	0,555	5	0,504	8,54	14,94	76,99
	0,706	5	0,657	10,99		
	1,529	5	1,495	25,29		
20 dní	0,511	2	0,184	3,11	3,98	80,97
	1,063	2	0,408	6,82		
	0,350	2	0,118	2,00		

Tab. 21: Liberace acikloviru z matrice 3T

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,689	1	0,128	2,17	2,15	2,15
	0,700	1	0,130	2,23		
	0,653	1	0,121	2,04		
6 hod	0,175	10	0,234	3,97	4,00	6,15
	0,157	10	0,198	3,38		
	0,195	10	0,275	4,65		
24 hod	0,267	10	0,422	7,15	5,89	12,04
	0,220	10	0,326	5,57		
	0,204	10	0,293	4,96		
48 hod	0,442	5	0,389	6,59	4,13	16,17
	0,226	5	0,169	2,89		
	0,229	5	0,172	2,91		
4 dny	0,946	2	0,361	6,12	6,51	22,68
	1,148	2	0,443	7,57		
	0,907	2	0,345	5,84		
7 dní	0,272	10	0,432	7,32	6,63	29,31
	0,254	10	0,395	6,75		
	0,229	10	0,344	5,83		
13 dní	1,024	5	0,981	16,64	21,38	50,70
	1,524	5	1,490	25,46		
	1,340	5	1,303	22,05		
20 dní	0,665	10	1,232	20,89	18,07	68,77
	0,514	10	0,924	15,79		
	0,569	10	1,036	17,54		

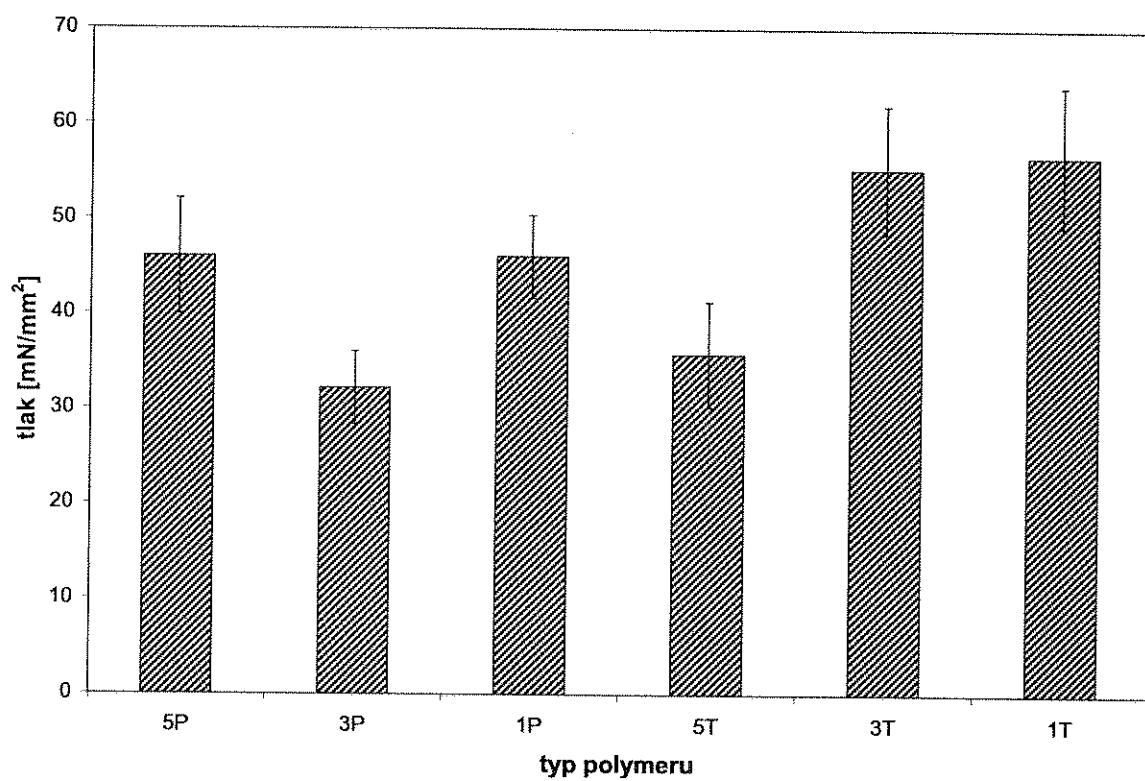
Tab. 22: Liberace acikloviru z matrice 5T

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,448	2	0,158	2,64	1,55	1,55
	0,285	2	0,092	1,55		
	0,130	2	0,029	0,47		
6 hod	0,843	2	0,319	5,32	4,18	5,74
	0,800	2	0,301	5,11		
	0,376	2	0,129	2,12		
24 hod	0,298	10	0,485	8,09	6,79	12,52
	0,258	10	0,403	6,83		
	0,222	10	0,330	5,44		
48 hod	0,350	5	0,295	4,93	4,04	16,56
	0,300	5	0,244	4,14		
	0,242	5	0,185	3,06		
4 dny	1,234	2	0,478	7,98	7,69	24,25
	1,354	2	0,527	8,93		
	0,978	2	0,374	6,16		
7 dní	0,392	10	0,676	11,28	9,04	33,29
	0,292	10	0,472	8,01		
	0,293	10	0,474	7,82		
13 dní	0,902	5	0,857	14,30	15,98	49,27
	0,933	5	0,889	15,06		
	1,167	5	1,127	18,58		
20 dní	0,471	10	0,837	13,96	19,50	68,77
	0,740	10	1,384	23,46		
	0,688	10	1,278	21,08		

6.2 GRAFY

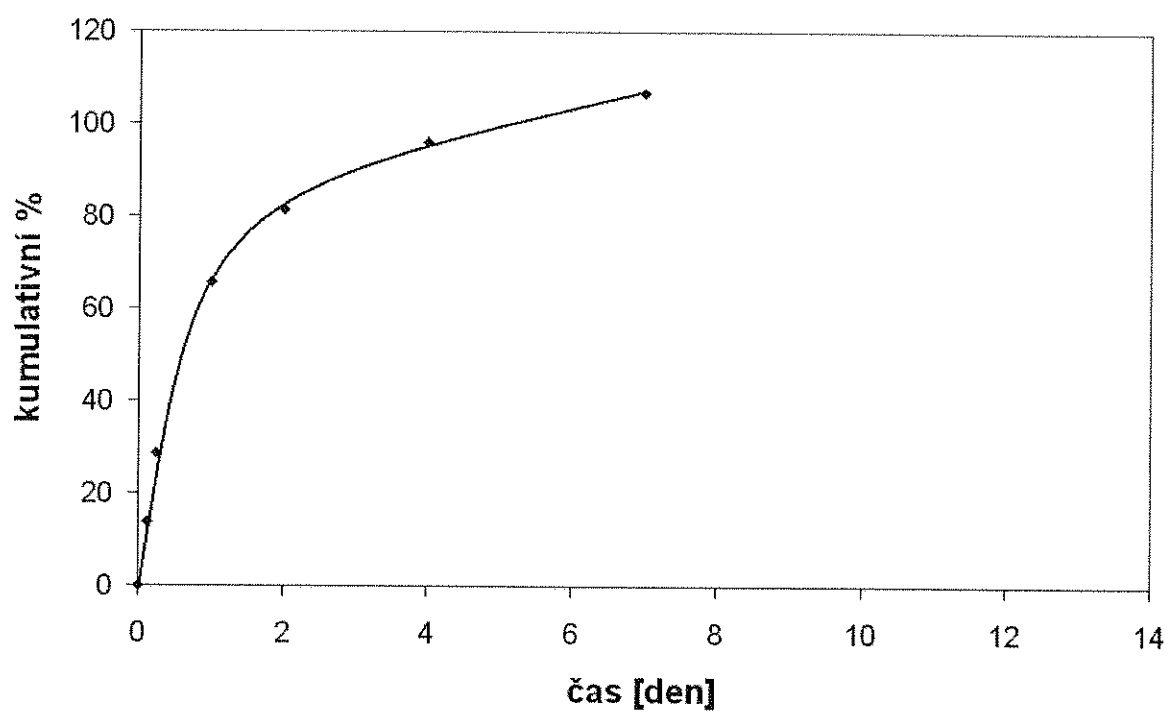
6.2.1 Adheze

Obr. 9: Porovnání adheze jednotlivých matric

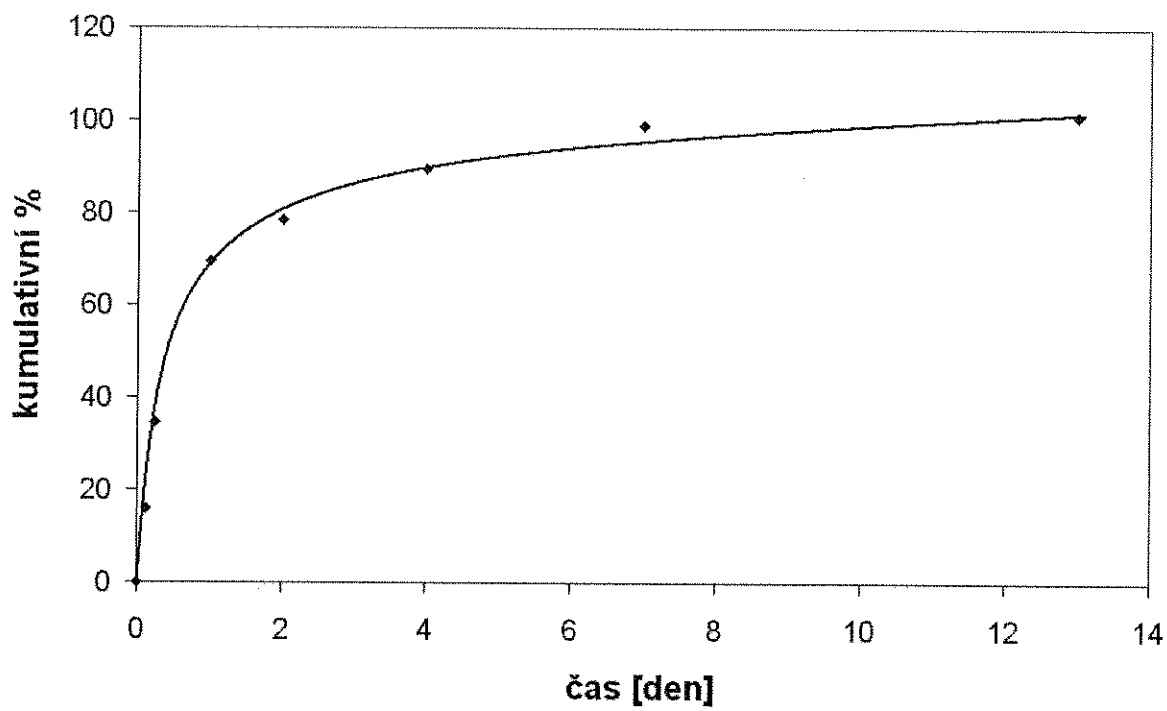


6.2.2 Liberace flukonazolu

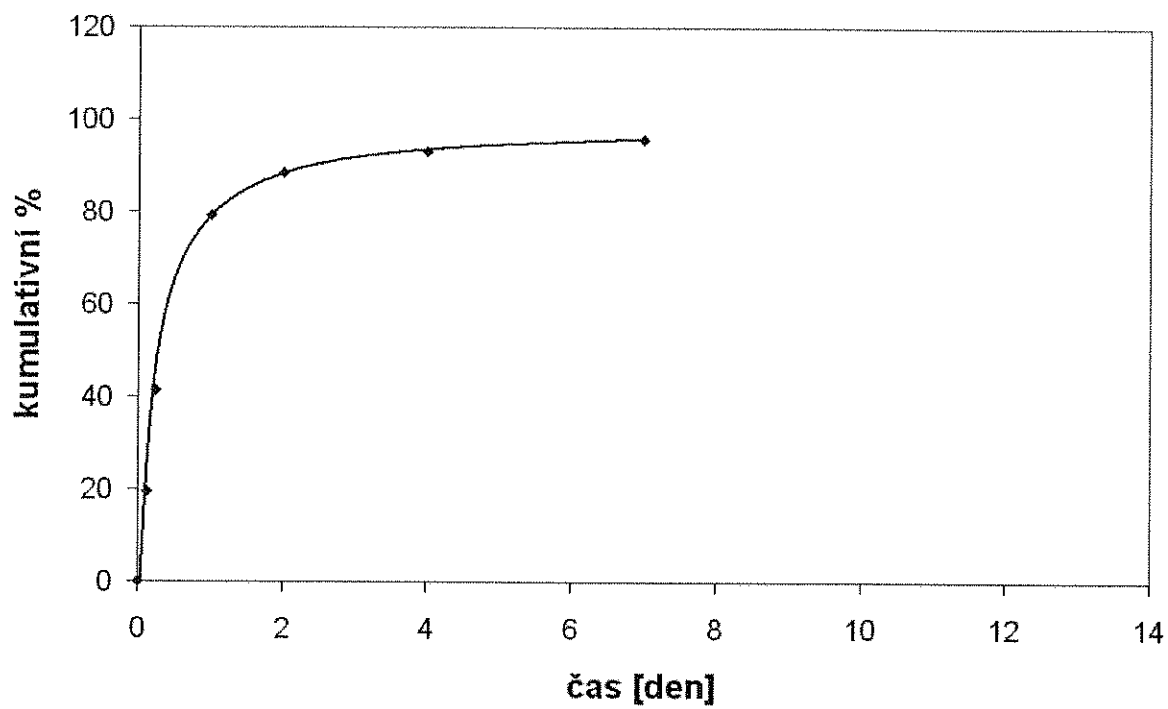
Obr. 10: Liberace flukonazolu z matrice 1P



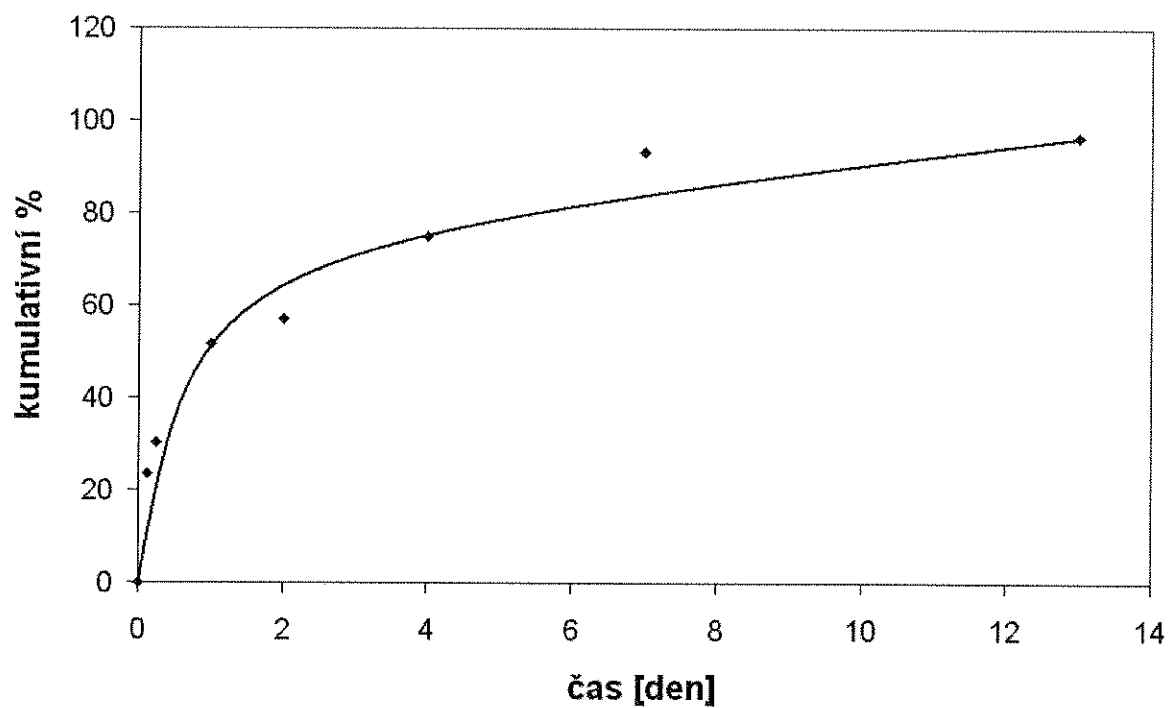
Obr. 11: Liberace flukonazolu z matrice 3P



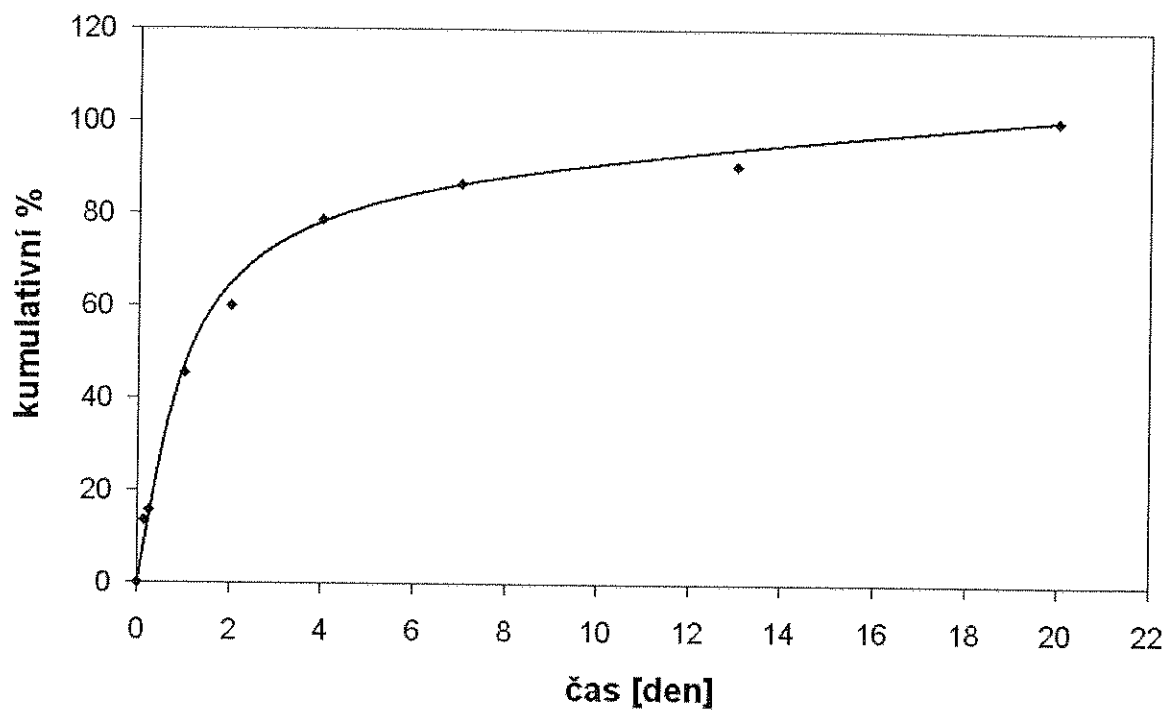
Obr. 12: Liberace flukonazolu z matrice 5P



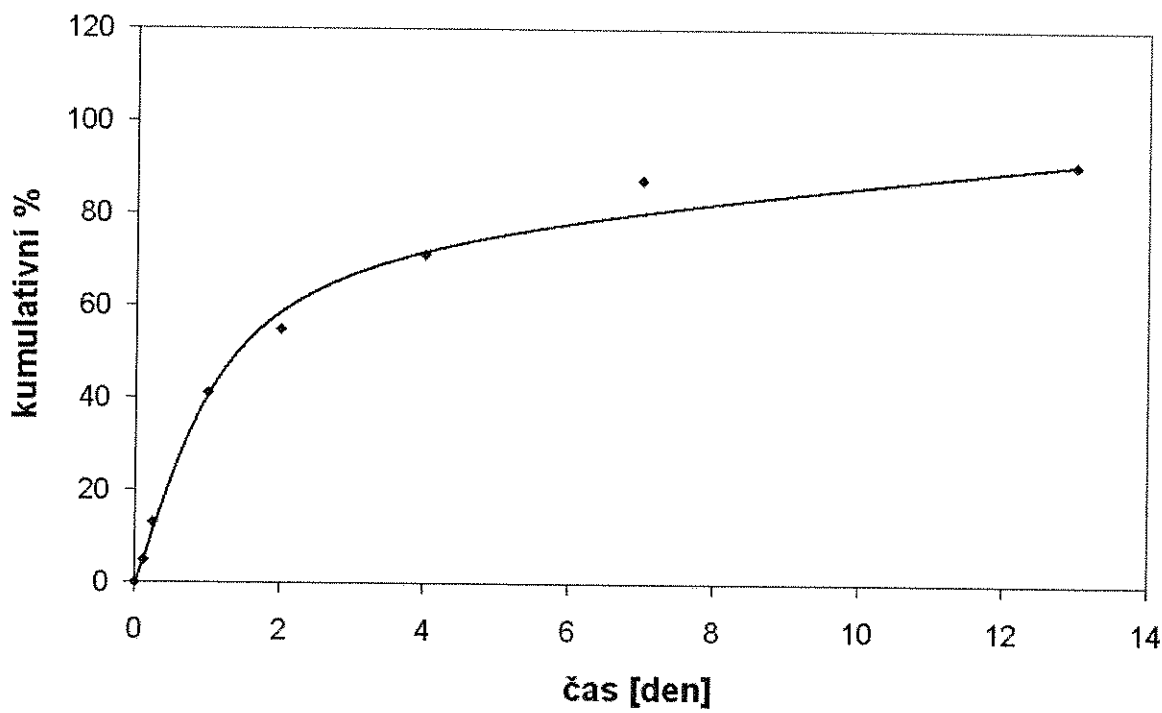
Obr. 13: Liberace flukonazolu z matrice 1T



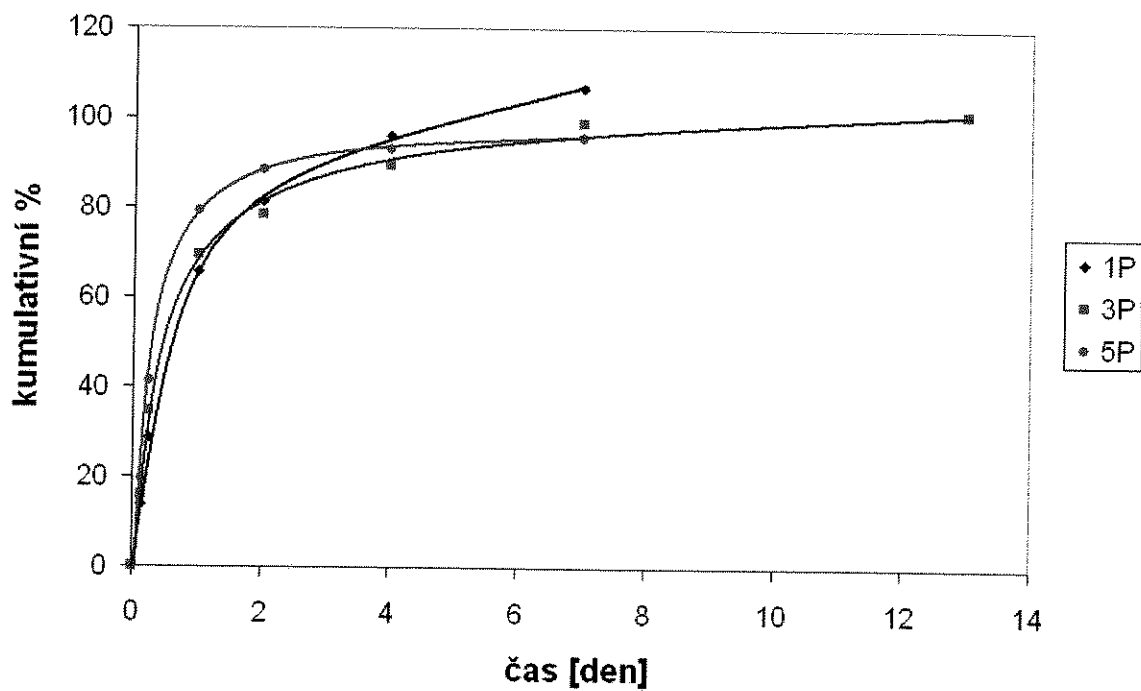
Obr. 14: Liberace flukonazolu z matrice 3T



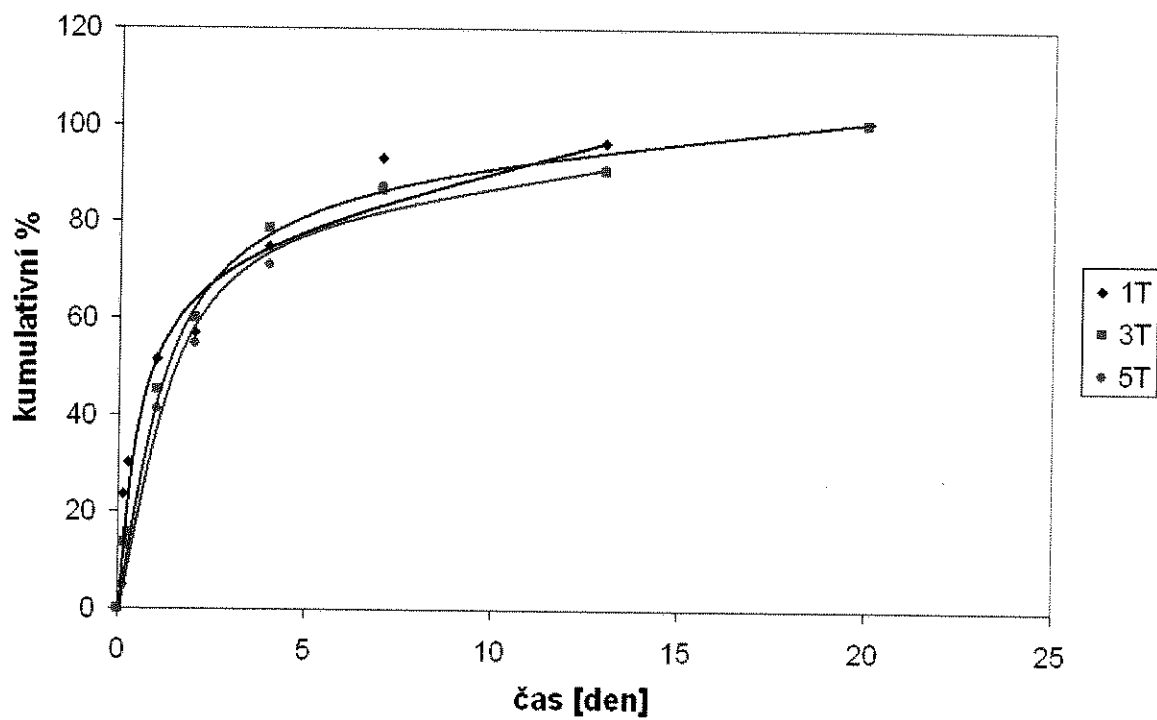
Obr. 14: Liberace flukonazolu z matrice 5T



Obr. 16: Porovnání liberace flukonazolu z matric řady P

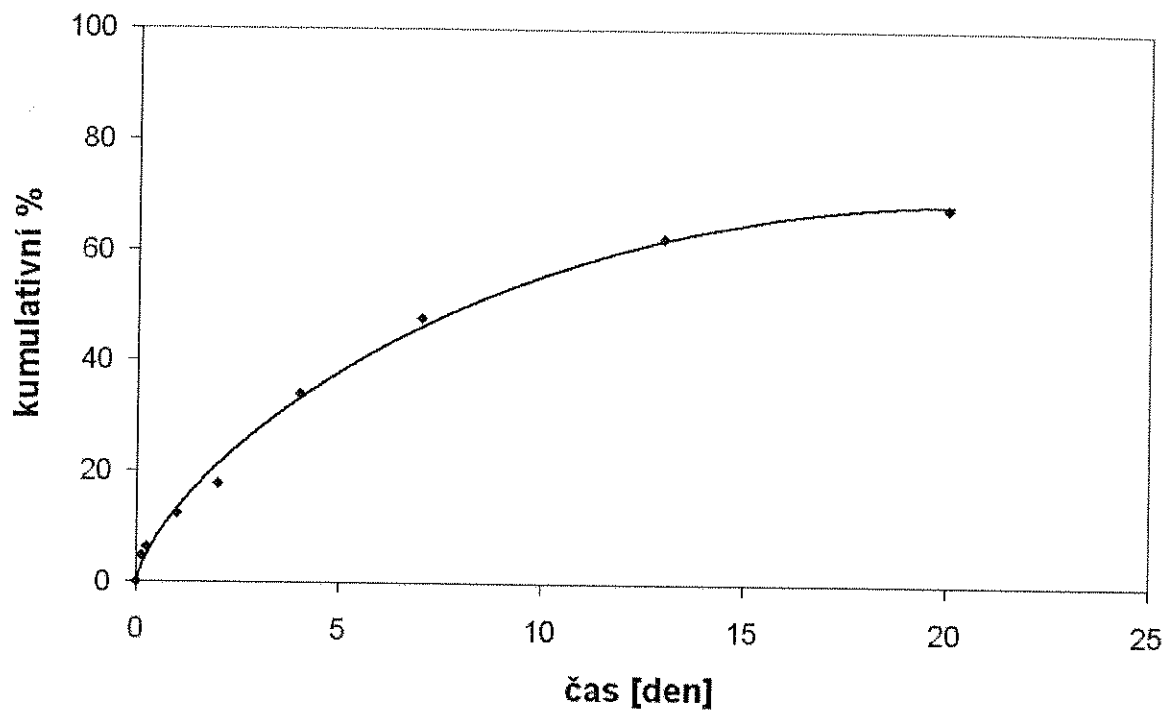


Obr. 17: Porovnání liberace flukonazolu z matric řady T

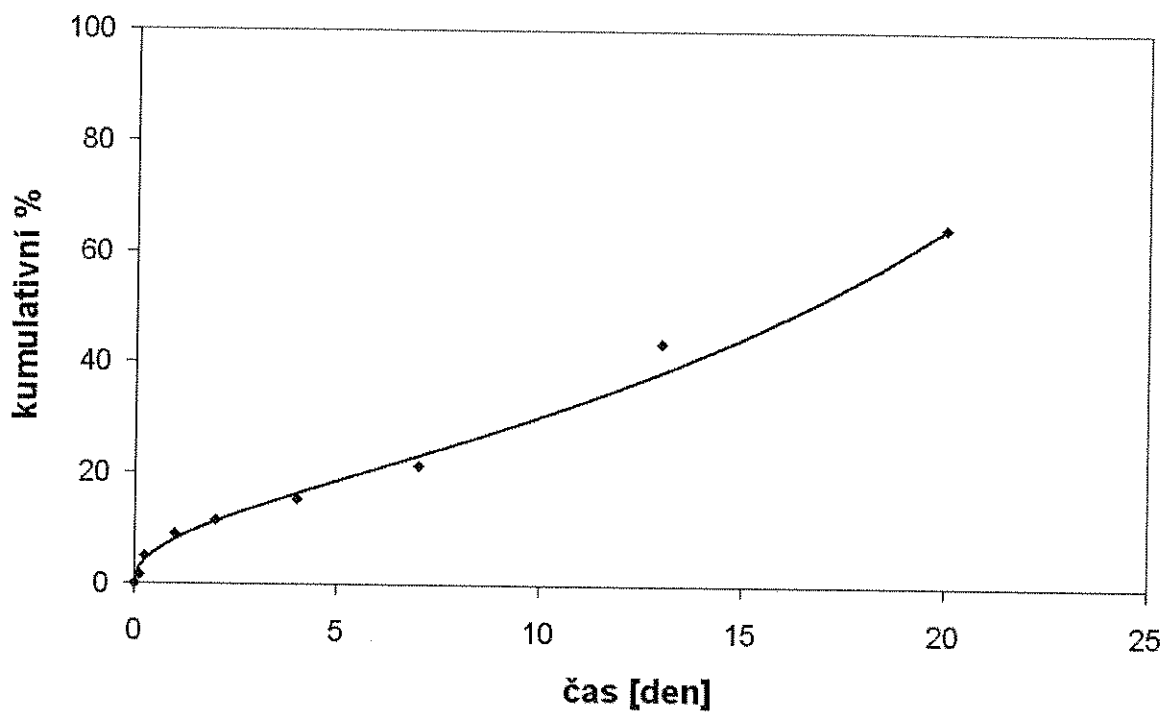


6.2.3 Liberace acikloviru

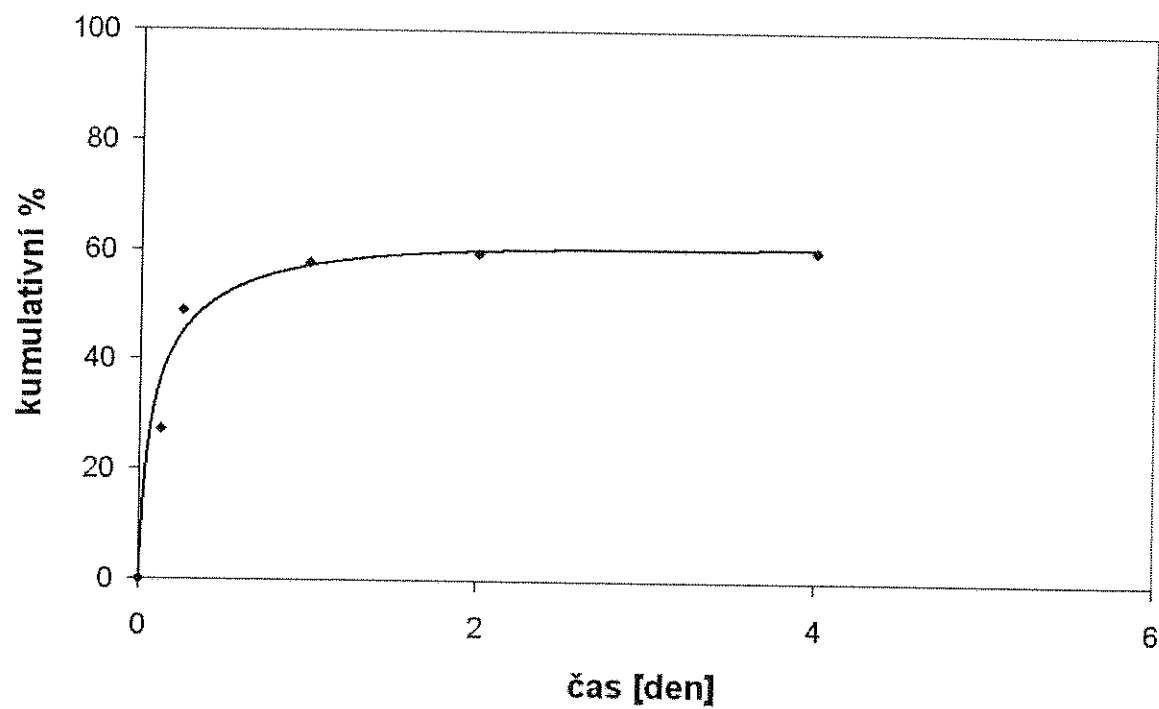
Obr. 18: Liberace acikloviru z matrice 1P



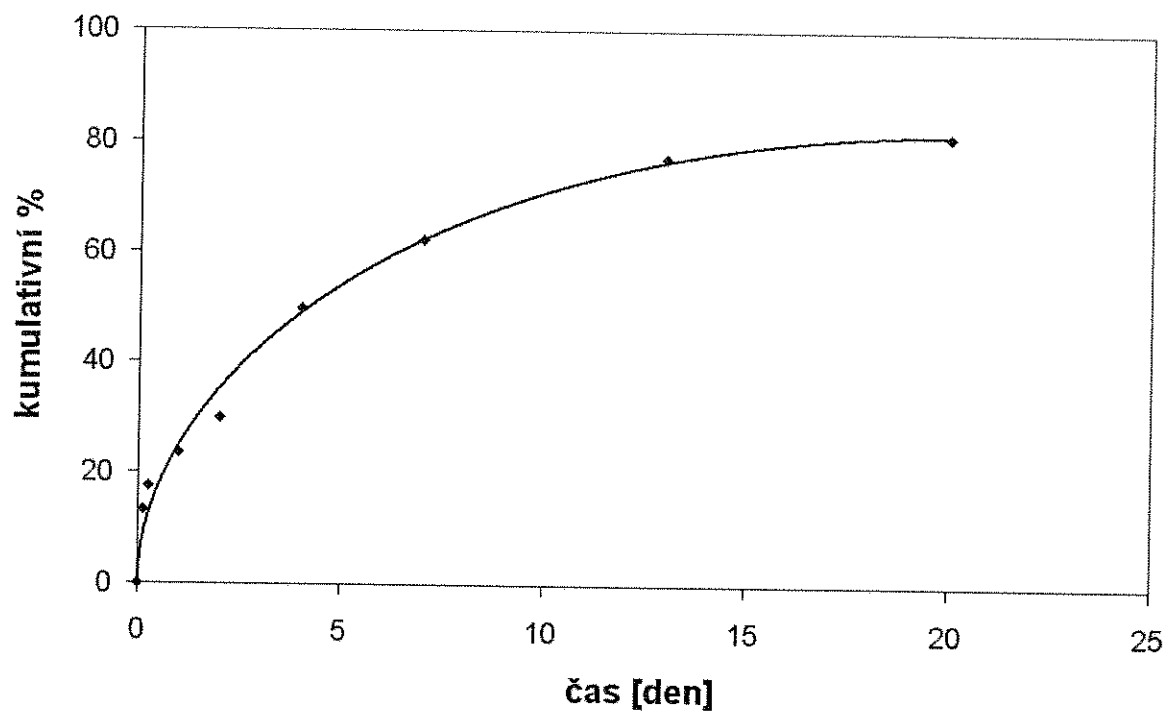
Obr. 19: Liberace acikloviru z matrice 3P



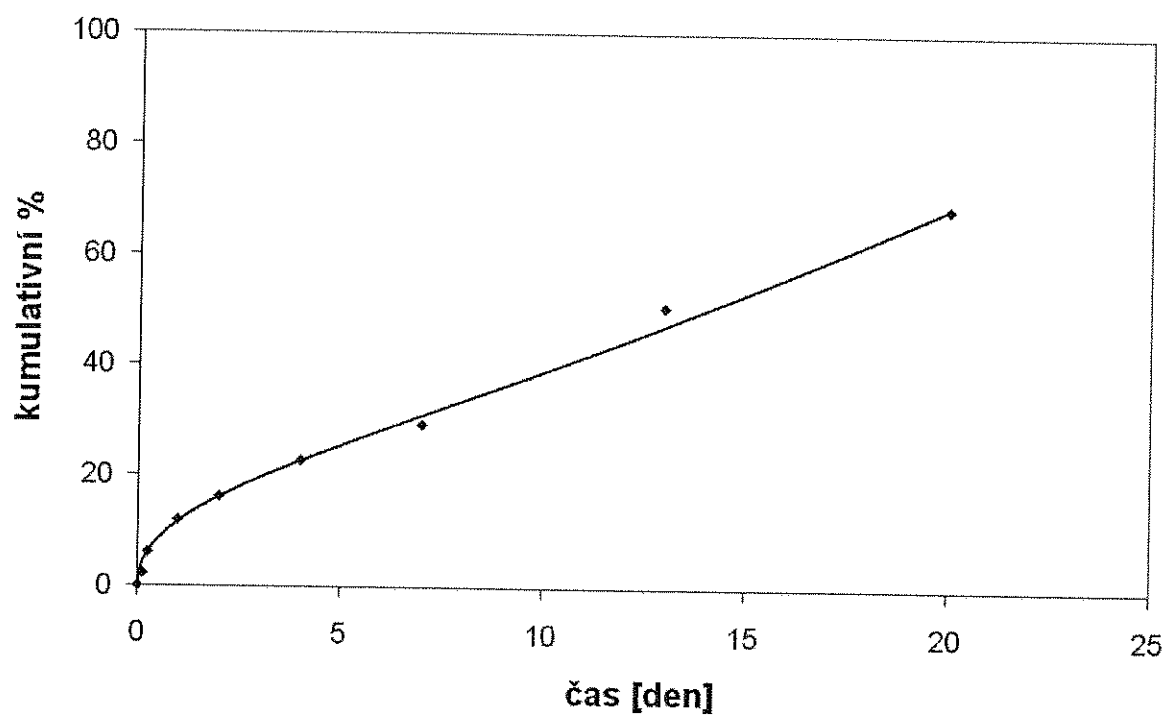
Obr. 20: Liberace acikloviru z matrice 5P



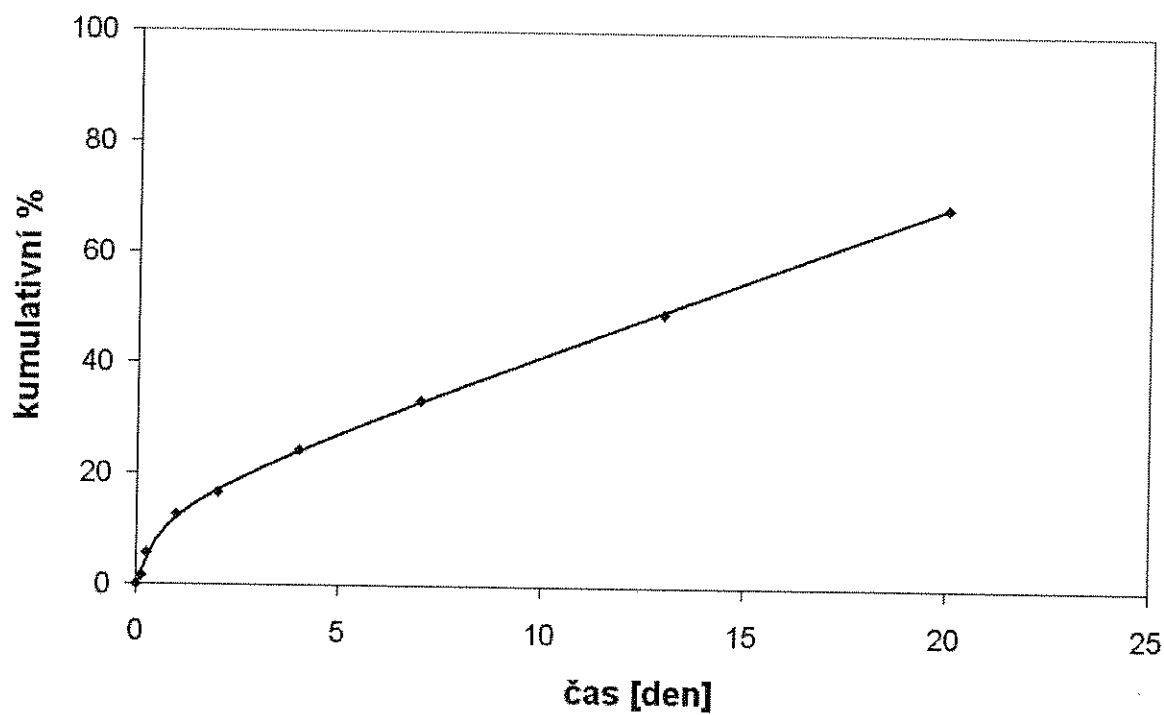
Obr. 21: Liberace acikloviru z matrice 1T



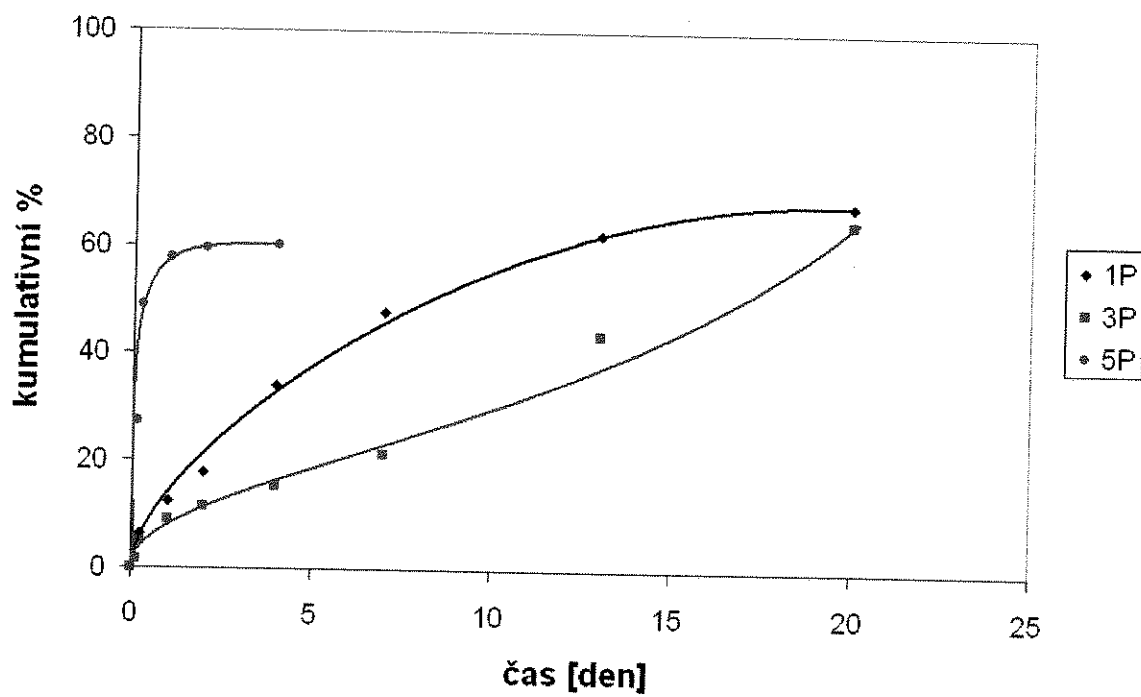
Obr. 22: Liberace acikloviru z matrice 3T



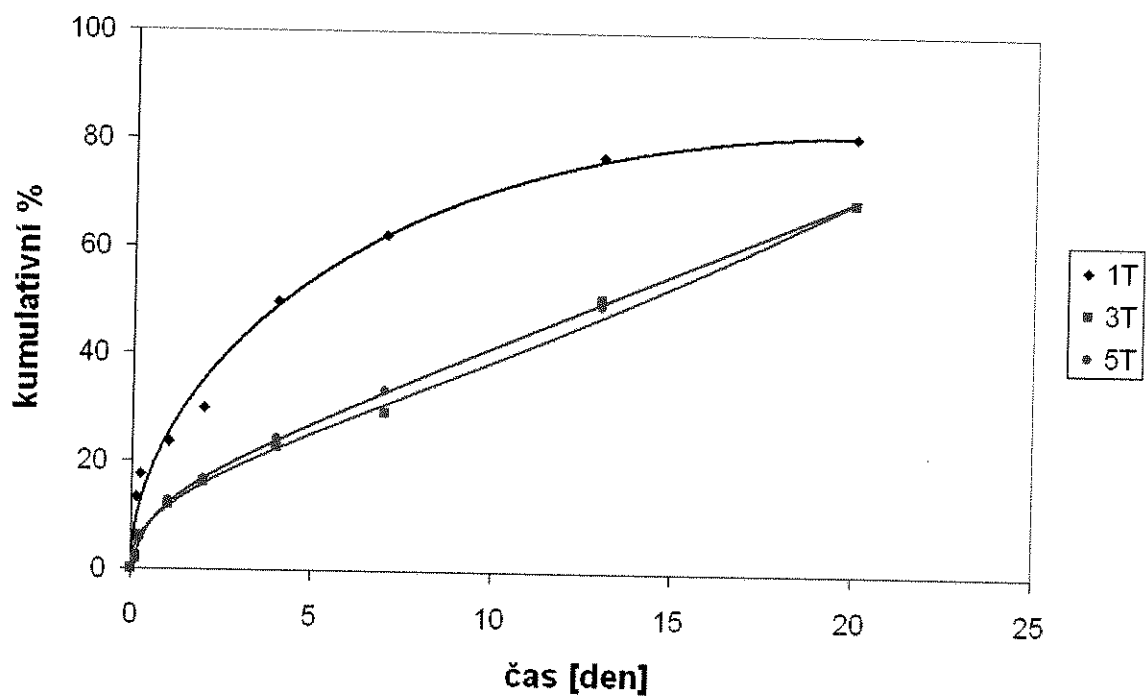
Obr. 23: Liberace acikloviru z matrice 5T



Obr. 24: Porovnání liberace acikloviru z matric řady P



Obr. 25: Porovnání liberace acikloviru z matric řady T



7 DISKUZE

Testované větvené polyestery byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie stupňovou kopolymerací ternární směsi složené z ekvimolárního podílu kyseliny glykolové a kyseliny D,L-mléčné, doplněné pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem v koncentraci 1 %, 3 % nebo 5 %. V důsledku různého typu a koncentrace větvicí složky mají jednotlivé polymery různý stupeň větvení, různou molární hmotnost a tedy odlišnou hydrofilitu, stupeň bobtnání a eroze. Charakteristiky testovaných nosičů jsou uvedeny v Tab. 23.

Tab. 23: Charakteristika testovaných nosičů

Označení polymeru	Poměr LA/GA/P(T) [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	η_w [ml/g]	T_g (°C)	g'
1P	49,5/49,5/1,0	4 200	8 400	9,1	26,6	0,59
3P	48,5/48,5/3,0	8 700	12 700	6,5	22,2	0,33
5P	47,5/47,5/5,0	2 200	2 700	4,6	12,7	0,61
1T	49,5/49,5/1,0	3 800	15 200	9,4	25,3	0,42
3T	48,5/48,5/3,0	7 900	20 600	8,5	21,7	0,31
5T	47,5/47,5/5,0	5 800	11 900	6,5	17,2	0,34

M_nčíselný průměr molární hmotnosti

M_whmotnostní průměr molární hmotnosti

g'větvicí poměr $g' = \left(\frac{\eta_{br}}{\eta_{lin}} \right)$

kde η je vnitřní viskozita lineárního (*lin*) a větveného (*br*) polymeru při shodné molární hmotnosti M

Pro lineární polymery dosahuje g' hodnoty 1,0 a klesá směrem k nule s rostoucím stupněm větvení. V Tab. 23 jsou uvedeny průměrné hodnoty g' počítané z experimentálně stanovené hodnoty vnitřní viskozity a hodnoty vnitřní viskozity počítané z hodnoty M_w a Markovy-Houwinkovy (MH) rovnice pro lineární poly(DL-mléčnou) kyselinu. Ta byla stanovena čtyřnásobnou analýzou vzorku poly(DL-mléčné) kyseliny: $\eta = 5,22 \times 10^{-2} M^{0,629}$ [ml/g].

U vzorků větvených pentaerytrolelem a tripentaerythritolem stupeň větvení a molární hmotnost vzrůstá při zvýšení koncentrace větvicího monomeru z 1 % na 3 %. Při použití 5 % se však již pravděpodobně projevuje přebytek hydroxylových skupin a stupeň větvení i molární hmotnost klesají.⁵⁰

Plastifikované větvené polyestery se používají jako nosiče léčiv. Přídavkem plastifikátoru dojde ke zlepšení zpracovatelnosti, protože se významně sníží viskozita polymerní soustavy, a tím se zároveň umožní aplikace polymerního systému s inkorporovaným léčivem.⁵¹ Plastifikátor jako složka polymerního systému není jednoznačně definován. Běžně používaným plastifikátorem polymerů je např. triethylcitrát. Jeho výhodou je neškodnost prověřená dlouhodobým používáním a vysoká účinnost při snižování teploty skelného přechodu alifatických polyesterů. Triethylcitrát je mísitelný s většinou polyesterových nosičů a může být použit téměř bez omezení.⁵²

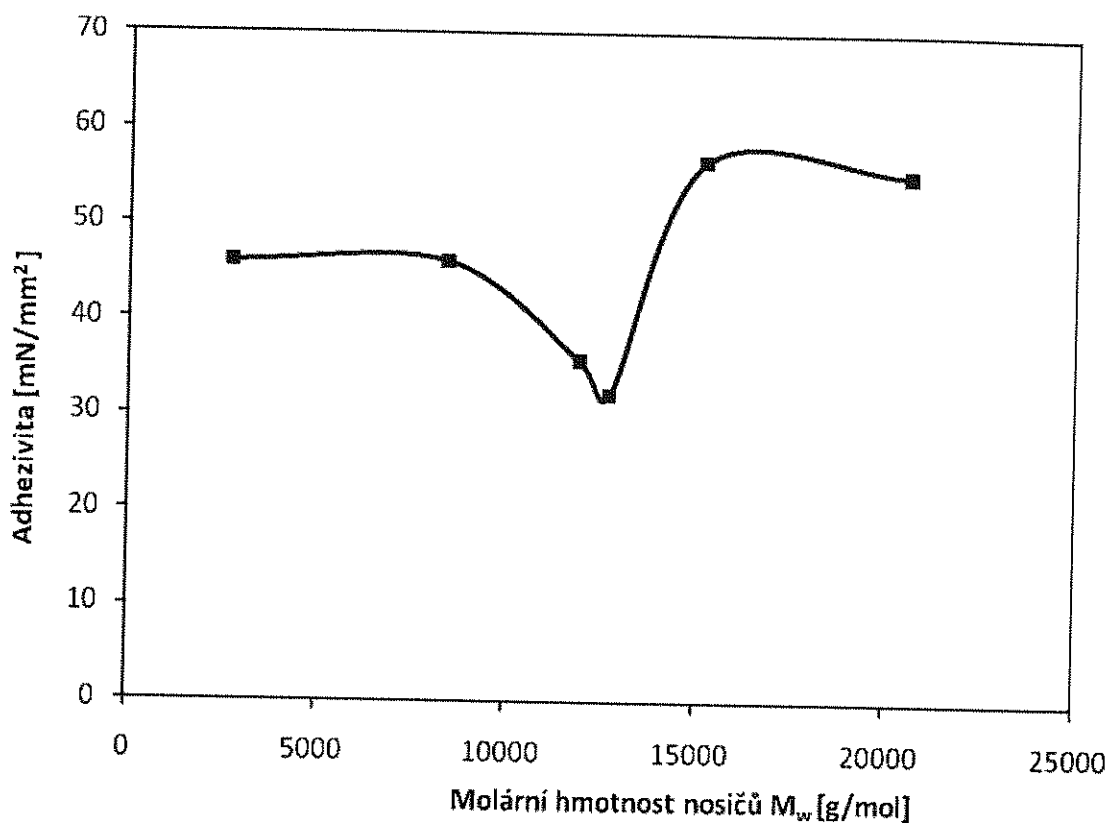
7.1 ADHEZIVITA PLASTIFIKOVANÝCH POLYESTERŮ

Byla měřena síla F_{max} , potřebná k odtržení vzorku od podkladu, jako míra adhezivních vlastností plastifikovaných nosičů s flukonazolem (Tab. 4 – 9). Testy adheze byly realizovány při kontaktní době 60 s, kontaktní síle 10 N a rychlosti odtržení vzorku od podkladu 100 mm/min. Jako modelový podklad byl použit hydratovaný mucin z prasečího žaludku. Z pěti naměřených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Síla v newtonech byla přepočtena na velikost adhezivní plochy a vyjádřena jako F/S v jednotkách mN/mm^2 , aby bylo možno porovnávat výsledky adhezivních testů realizovaných při různé velikosti kontaktní plochy.

Předpokládalo se, že adhezivita jednotlivých testovaných polymerních soustav bude ovlivněna molární hmotností a stupněm větvení nosiče, dále plastifikátorem, který ovlivňuje viskozitu soustavy a rovněž přítomností léčiva.

Nejvyšší adhezivita byla naměřena u nosičů s nejvyšší molární hmotností. Jedná se o vzorky 3T a 1T s M_w vyšší než 15 000 g/mol. U nosičů s nižší molární hmotností však nelze jednoznačně vyvodit závislost mezi adhezivitou a molární hmotností. Nosiče se střední hodnotou molární hmotnosti mají nižší adhezivitu než nosiče s nízkou hodnotou molární hmotnosti (Obr. 26).

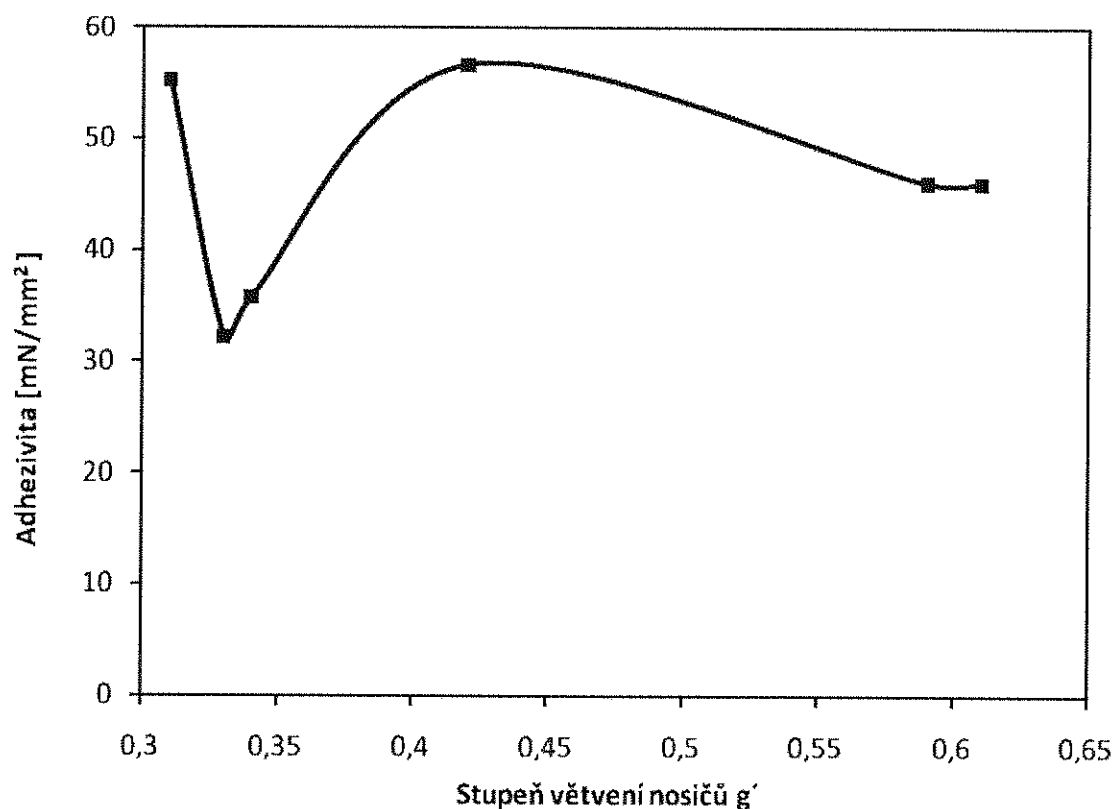
Obr. 26: Vliv molární hmotnosti nosiče na jeho adhezivitu



Testované nosiče mají relativně vysoký stupeň větvení. Při syntéze nosičů se předpokládalo, že se s rostoucí koncentrací větvící složky (pentaerythritol nebo tripentaerythritol) v reakční směsi bude zvyšovat stupeň větvení nosičů. Dle výsledků analýzy provedené v Synpo Pardubice se tento předpoklad potvrdil pouze při zvýšení koncentrace větvící složky z 1 % na 3 %. Zvýšení koncentrace větvící složky na 5 % k získání nosičů s vyšším stupněm větvení nevedlo.

Nejvyšší adhezivní síla byla zjištěna u nosiče 1T, který má stupeň větvení $g' = 0,42$ a molární hmotnost $M_w = 15\,200$ g/mol. Srovnatelnou adhezivní sílu měl nosič 3T s nejvyšším stupněm větvení $g' = 0,31$ a nejvyšší molární hmotností. A nejnižší adhezivita byla zjištěna u nosičů 5T a 3P s vysokým stupněm větvení a střední molární hmotností. Z těchto výsledků plyne nejednoznačný vliv stupně větvení nosiče na jeho adhezivní sílu, a to zejména u nosičů s molární hmotností nižší než 15 000 g/mol.

Obr. 27: Vliv stupně větvení nosičů na jejich adhezivitu



Adhezivita testovaných soustav, které se skládaly z nosiče, plastifikátoru a léčiva, je samozřejmě ovlivněna nejen charakterem nosiče, ale i zbylými dvěma složkami polymerního systému. Porovnáním s výsledky adhezivních testů se stejnými systémy, ale bez léčiva, které byly provedeny v rámci experimentu souběžně realizované rigorózní práce Anny Bacílkové (dosud nepublikováno) bylo zjištěno, že vliv pouhých 4 % flukonazolu na adhezivní sílu není významný. Adhezivitu však významně ovlivňuje plastifikace soustavy 30 % triethylcitrátu (TEC). Dynamická viskozita nosičů 1P, 3P, 5P, 1T, 3T a 5T plastifikovaných 30 % TEC byla měřena v rigorózní práci Šárky Podzimkové (Tab. 24).⁵³ Nejvyšší adhezivitu měly nosiče 1T a 3T, u nichž byla zjištěna nejvyšší viskozita. Lineární závislost mezi viskozitou a adhezivitou však zjištěna nebyla. Viskozita ostatních nosičů byla několikanásobně nižší, ale adhezivita se významně snížila jen u nosičů 3P a 5T.

Tab. 24: Dynamická viskozita plastifikovaných nosičů η [Pa.s] při teplotě 37°C

Nosič	1T	3T	5T	1P	3P	5P
η [Pa.s]	544,3	372,3	160,8	121,2	109,6	41,1
F/S [mN/mm ²]	56,64	55,25	35,77	46,06	32,21	46,03

7.2 LIBERACE MODELOVÝCH LÉČIV

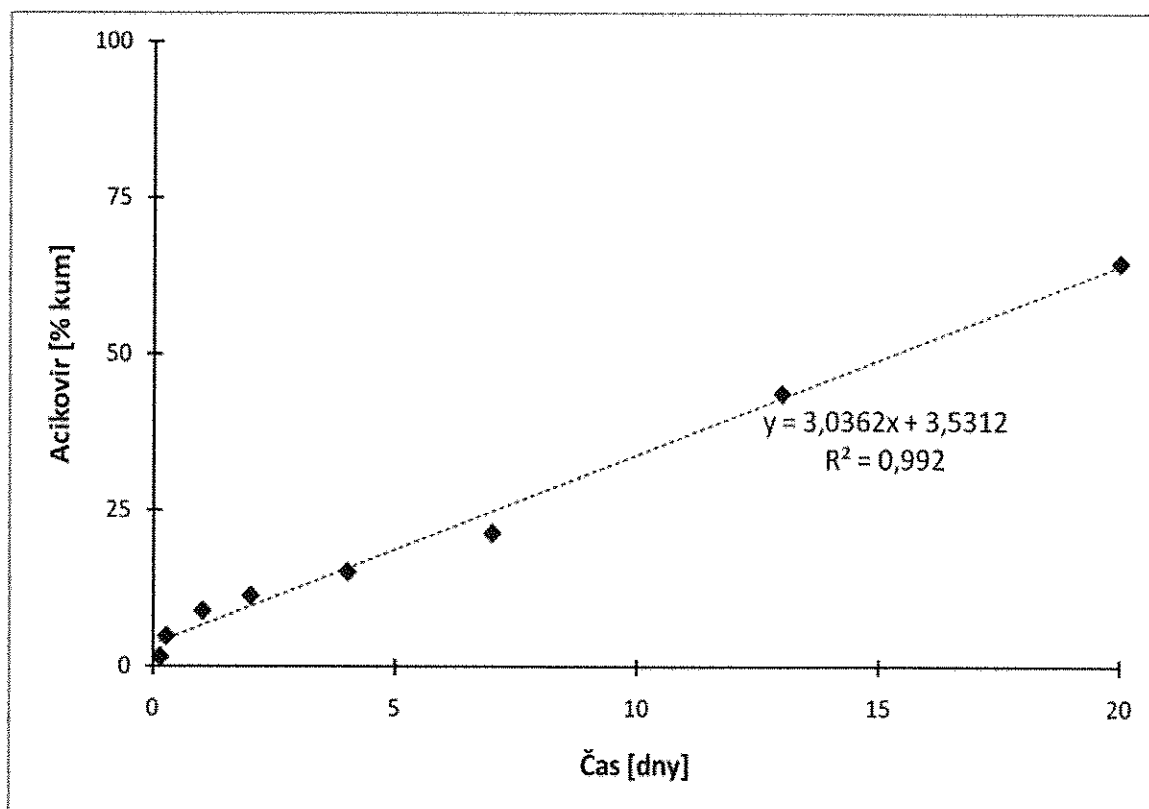
Po dobu 20 dnů byla sledována liberace flukonazolu a acikloviru z plastifikovaných nosičů větvených pentaerythritolem a tripentaerythritolem. Byl proveden statický disoluční test při 37 °C. Jako liberační médium byl zvolen fosfát citrátový pufr pH 7,0.

Liberace flukonazolu z nosičů větvených pentaerythritolem měla stejný průběh. Flukonazol inkorporovaný do plastifikovaných nosičů se uvolňoval po dobu 7 dnů (Obr. 16). Jednodenní burst, flukonazol uvolněný za 24 hod., byl vysoký: u nosiče 1P 65 %, u nosiče 3P 69 % a u nosiče 5P 79 %. Z nosičů větvených tripentaerythritolem se flukonazol uvolňoval pomaleji (Obr. 17). Celková doba liberace u nosičů 1T a 5T byla 13 dnů. Z nosiče 5T se tuto dobu uvolnilo pouze 91 % inkorporovaného flukonazolu a v dalších časových intervalech už nebylo zjištěno zvýšení. Z nosiče 3T se flukonazol uvolňoval po dobu 20 dnů. Jednodenní burst u nosičů řady T byl nižší než 50 %.

Rychlost liberace flukonazolu z nosičů větvených pentaerythritolem a tripentaerythritolem byla ovlivněna molární hmotností nosičů. Nosiče řady T mají M_w větší než 15 000 g/mol, proto byla liberace pomalejší než z nosičů řady P, které dle hodnot M_w lze označit jako oligoestery.

Liberace acikloviru probíhala s výjimkou nosiče 5P pozvolna a za dobu 20 dnů, po kterou byla sledována, nedošlo k uvolnění veškerého léčiva obsaženého v nosiči. Z nosiče 5P se za 4 dny uvolnilo 60 % acikloviru a dále liberace neprobíhala. Důvodem je nízká molární hmotnost nosiče $M_w = 2\,700$ g/mol a nízká viskozita $\eta = 41,1$ Pa.s. Z nosičů 1P a 3P se za 20 dnů uvolnilo přibližně stejné množství léčiva (68 % resp. 65 %), odlišný byl však průběh liberace (Obr. 24). Jednodenní burst byl ještě srovnatelný, 12 % acikloviru u 1P a 9 % acikloviru u 3P, dál probíhala liberace acikloviru z nosiče 3P výrazně pomaleji. V intervalu mezi 2. dnem a 7. dnem se z nosiče 1P uvolnilo více než dvojnásobné množství léčiva. Liberace acikloviru z nosiče 3P probíhala lineárně (Obr. 28).

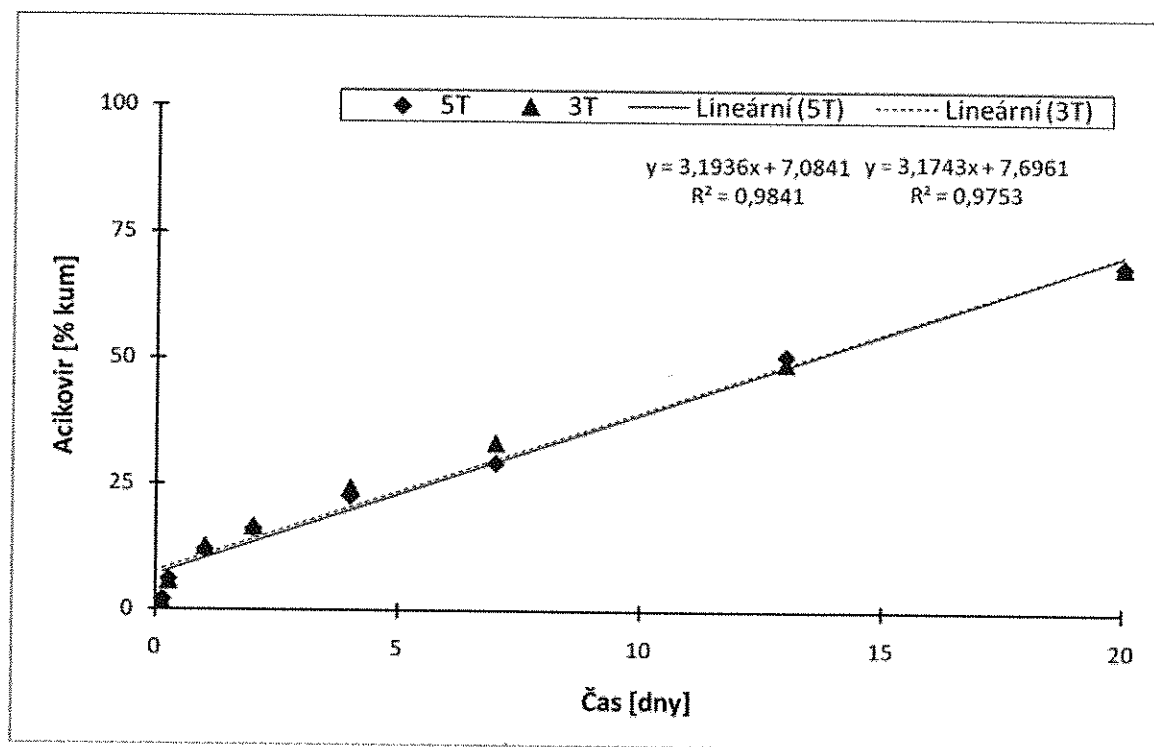
Obr. 28: Linearizace liberace acikloviru z nosiče 3P



Nosiče 1P a 3P mají srovnatelnou molární hmotnost (8 400 g/mol, resp. 12 700 g/mol) i srovnatelnou dynamickou viskozitu (121,2 Pa.s, resp. 109,6 Pa.s). Významnější vliv na průběh liberace má patrně molární hmotnost nosičů než viskozita, proto je průběh liberace mezi 2. dnem a 7. dnem u nosiče 3P pomalejší.

Liberace acikloviru z nosičů větvených tripentaerythritolem je znázorněna na obr. 25. Nejvíce léčiva (81 %) a nejrychleji (jednodenní burst 23 %) se za dobu 20 dnů uvolnilo z nosiče 1T. Z nosičů 3T a 5T probíhala liberace lineárně, jednodenní burst byl 12 % a uvolnilo se 69 % léčiva (Obr. 29). Průběh liberace je opět ovlivněn molární hmotností nosičů a viskozitou polymerního systému.

Obr. 29: Linearizace liberačních křivek acikloviru z nosičů 3T a 5T



8 ZÁVĚRY

Z výsledků předložené rigorózní práce lze vyvodit následující závěry:

1. Nejvyšší adhezivita byla naměřena u nosičů s nejvyšší molární hmotností, které mají zároveň relativně vysoký stupeň větvení. Jedná se o vzorky 1T a 3T s M_w vyšší než 15 000 g/mol. U nosičů s nižší molární hmotností však nelze jednoznačně vyvodit závislost mezi adhezivitou a molární hmotností.
2. Porovnáním s výsledky adhezivních testů se stejnými systémy, ale bez léčiva, bylo zjištěno, že vliv pouhých 4 % léčiva v polymerním systému na adhezivní sílu není významný.
3. Adhezivitu významně ovlivňuje plastifikace soustavy 30 % triethylcitrátu. Nejvyšší adhezivitu měly nosiče 1T a 3T, u nichž byla zjištěna nejvyšší viskozita. Lineární závislost mezi viskozitou a adhezivitou však zjištěna nebyla.
4. Vhodnými nosiči léčiv se z testovaných větvených nosičů jeví polyestery s vyšší molární hmotností, které při plastifikaci 30 % triethylcitrátu mají vyšší dynamickou viskozitu a vyšší adhezivitu.

9 SOUHRN

V teoretické části rigorózní práce jsou shrnuty mechanismy bioadheze, substráty pro bioadhezi, bioadhezivní polymery, plastifikované polymery, bioadhezivní lékové formy, kyselina polymléčná a polyglykolová, kopolymery kyseliny mléčné a glykolové a léčiva použitá v experimentu.

V experimentální části této práce byly studovány adhezivní vlastnosti větvených terpolymerů kyseliny D,L-mléčné, glykolové a pentaerythritolu (resp. tripentaerythritolu) s léčivou látkou. Jako plastifikátor byl použit triethylcitrát v koncentraci 30 % a jako léčivá látka flukonazol v koncentraci 4 %. Adhezivita byla měřena na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell při těchto testovacích parametrech: kontaktní síla 10 N, kontaktní doba 60 s a rychlost odtržení vzorku od podkladu 100 mm/min. Mírou adhezivty je maximální síla F_{max} [N] potřebná pro odtržení vzorku od podkladu. Jako modelový podklad byl použit hydratovaný mucin z prasečího žaludku. Nejvyšší adhezivita byla naměřena u nosičů s nejvyšší molární hmotností (vyšší než 15 000 g/mol). U nosičů s molární hmotností nižší než 15 000 g/mol nelze jednoznačně vyvodit závislost mezi adhezivitou a molární hmotností. Stupeň větvení nosičů se zvyšuje s rostoucí koncentrací větvicí složky (pentaerythritol nebo tripentaerythritol) v reakční směsi, a to pouze při zvýšení koncentrace z 1 % na 3 %. Zvýšení koncentrace větvicí složky na 5 % nevede k získání nosičů s vyšším stupněm větvení. Nejvyšší adhezivita byla naměřena u nosičů s vyšším stupněm větvení a s molární hmotností vyšší než 15 000 g/mol. U nosičů s molární hmotností nižší než 15 000 g/mol nelze jednoznačně vyvodit závislost mezi adhezivitou a stupněm větvení. Adhezivita je dále ovlivněna koncentrací plastifikátoru. S rostoucí koncentrací plastifikátoru adhezivní síla nosiče klesá. Porovnáním s výsledky adhezivních testů se stejnými systémy, ale bez léčiva, bylo zjištěno, že vliv pouhých 4 % flukonazolu na adhezivní sílu není významný.

Dále byla po dobu 20 dnů sledována liberace flukonazolu a acikloviru z plastifikovaných nosičů větvených pentaerythritolem a tripentaerythritolem. Byl proveden statický disoluční test při 37 °C. Jako liberační médium byl zvolen fosfát citrátový pufr pH 7,0. Flukonazol inkorporovaný do plastifikovaných nosičů větvených pentaerythritolem se uvolňoval po dobu 7 dnů. Z nosičů větvených tripentaerythritolem se flukonazol uvolňoval pomaleji. Bylo zjištěno, že rychlost liberace flukonazolu je

ovlivněna molární hmotností nosičů. Z nosičů s vyšší molární hmotností je liberace flukonazolu pomalejší.

Liberace acikloviru probíhala pozvolna a za dobu 20 dnů, po kterou byla sledována, nedošlo k uvolnění veškerého léčiva obsaženého v nosiči. Liberace acikloviru z nosiče 3P, 3T a 5T probíhala lineárně. Bylo zjištěno, že průběh liberace acikloviru je opět ovlivněn molární hmotností nosičů.

Vhodnými nosiči léčiv se z testovaných větvených nosičů jeví polyestery s vyšší molární hmotností, které při plastifikaci 30 % triethylcitrátu mají vyšší dynamickou viskozitu a vyšší adhezivitu.

SUMMARY

There are summarized the mechanisms of bioadhesion, the substrates for bioadhesion, the bioadhesive polymers, the plasticized polymers, the bioadhesive dosage forms, the polylactic and polyglycolic acid, and the copolymers of lactic and glycolic acid and the drugs (used in the experiment) in the theoretic part of this thesis.

There were studied the adhesive characteristics of plasticized polymers of D,L-lactic and glycolic acid branched with pentaerythritol (P) or tripentaerythritol (T) with the drug in the experimental part of this thesis. As plasticizer there was used triethyl citrate (TEC) in the concentration of 30 % and as drug was used fluconazole in the concentration of 4 %. The adhesivity was measured on the machine T1-FR050TH.A1K from the company Zwick/Roell by these testing parameters: the contact force 10 N, the contact time 60 s and the speed of separation of the sample from the surface 100 mm/min. The adhesion rate is the maximal force F_{max} [N], which is needed for separation of the sample from the surface. As a model base was used the hydrated mucin of pig stomach. The highest adhesivity was measured by carriers with the highest molar mass (greater than 15 000 g/mol). We can't exactly determinate the relationship between adhesivity and the molar mass for the carriers with molar mass of less than 15 000 g/mol. The degree of branching of carriers increases with increasing concentration of branching component (pentaerythritol or tripentaerythritol) in the reaction mixture and only an increase in concentration from 1 % to 3 %. Increasing concentration of branching component to 5 % doesn't get carriers

with a higher degree of branching. The highest adhesivity was measured by carriers with higher degree of branching and with molar mass greater than 15 000 g/mol. We can't exactly determinate the relationship between adhesivity and the degree of branching for the carriers with molar mass of less than 15 000 g/mol. The adhesivity is also influenced by concentration of plasticizer. The adhesive force of carrier decreases with increasing concentration of plasticizer. Comparing the results of adhesion tests with the same systems, but no drugs were found out that the influence of only 4 % of fluconazole isn't significant on the adhesion force.

We had also studied the liberation of fluconazole and aciclovir of plasticized carriers branched pentaerythritol and tripentaerythritol during 20 days. The static dissolution test was performed at 37 °C. As a medium of liberation was selected the phosphate citrate buffer pH 7,0. Fluconazole incorporated into plasticized carriers branched with pentaerythritol was released for 7 days. Fluconazole incorporated into plasticized carriers branched with tripentaerythritol was released more slowly. It was found out that the speed of liberation of fluconazole is influenced by the molar mass of carriers. The liberation of fluconazole is slower from the carriers with higher molar mass.

The liberation of aciclovir went slowly and during 20 days, after when it has been observed, there was no liberation of all drug contained in the carrier. The liberation of aciclovir from the carrier 3P, 3T and 5T went linearly. It was found out that the process of liberation of aciclovir is also influenced by molar mass of carriers.

As a suitable pharmaceutical carriers from the tested branched carriers appear polyesters with higher molar mass, that have higher dynamic viscosity and higher adhesivity by 30 % plastification of triethyl citrate.

10 LITERATURA

1. Veselá, L.: Měření adheze plastifikovaných oligoesterů in vitro. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 2008, 60.
2. Longer, M. A., Robinson, J. R.: Fundamental aspects of bioadhesion. *Pharm. Int.* 7, 1986, 114 – 117.
3. Junginger, H. E.: Mucoadhesive Hydrogels. *Pharm. Int.* 53, 1991, 1056 – 1065.
4. Smart, J. D.: The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2005, 1556 – 68.
5. Allen, A., Hutton, D. A., Pearson, J. P., Sellers, L. A.: Mucus glycoprotein structure, gel formation and gastrointestinal mucus function. *Mucus and Mucosa*, Ciba Foundation Symposium, 1984, 137 – 156.
6. Marriott, C., Gregory, N. P.: Mucus physiology and pathology. In: Lanaerts, V., Gurny, R.: *Bioadhesive Drug Delivery Systems*. CRC Press., Florida, 1990, 1 – 24.
7. Yang, X., Robinson, J. R.: Biorelated polymers and gels, Chapter 5. Academic Press, Wisconsin, 1998.
8. Gandhi, R. B., Robinson, J. R.: Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13, 1994, 43 – 74.
9. Lehr, C. M., Poelma, F., G. J., Junginger, H. E., Tukker, J. J.: An estimate of turnover time of intestinal mucus gel layer in the rat in situ loop. *Int. J. Pharm.* 70, 1991, 235 – 240.
10. Verdugo, P., Deyrup-Olsen, I., Aitken, M., Villalon, M., Johnson, D.: Molecular mechanism of mucin secretion. *J. Dent. Res.* 66, 1987, 506 – 508.
11. Smart, J. D.: An in vitro assesment of some mucosa-adhesive dosage forms. *Int. J. Pharm.* 73, 1991, 69 – 74.
12. Park, K., Robinson, J. R.: Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: Method to study bioadhesion. *Int. J. Pharm.* 19, 1984, 107 – 127.
13. Žabka, M., Müller, R. H., Hildebrand, G. E.: *Moderní léčivé formy ve farmaceutické technologii*. Slovak Academic Press, Bratislava, 2001.
14. Schnurrer, J., Lehr, C. M.: Mucoadhesive properties of the mussel adhesive protein. *Int. J. Pharm.* 141, 1996, 251 – 256.
15. Dittrich M. – přednášky z Farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta UK, 2006.

-
16. Siepman, J., Paeratakul, O., Bodmeier, R.: Modeling plasticizer uptake in aqueous polymer dispersions. *Int. J. Pharm.* 165, 1998, 191 – 200.
 17. Junginger, H. E.: Bioadhesive polymer systems for peptide delivery. *Acta Pharm. Technol.* 36, 1990, 110 – 126.
 18. Haas, J., Lehr, C. M.: Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2, 2002, 287 – 298.
 19. Lehr, C. M.: Bioadhesion technologies for the controlled delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Critical Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 11, 1995, 177 – 218.
 20. Luessen, H. L., Verhoef, J. C., Borchard, G.: Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. II. Carbomer and polycarbophil are potent inhibitors of the intestinal proteolytic enzyme trypsin. *Pharm. Res.* 12, 1995, 1293 – 1298.
 21. Bjork, E., Isaksson, U., Edman, P., Artursson, P.: Starch microspheres induce pulsatile delivery of drugs and peptides across the epithelial barrier by reversible separation of the tight junctions. *J. Drug Target.* 2, 1995, 501 – 507.
 22. Nguyen-Xuan, T., Towart, R., Teras, A., Jaques, Y., Buri, P., Gurny, R.: Mucoadhesive semi-solid formulations for intraoral use containing sucralfate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 1996, 133-137.
 23. Schindler, A., Jeffcoat, R., Kimmel, G. L., Pitt, C. G., Wall, M. E., Zweidinger, R.: Biodegradable polymers for sustained drug delivery. *Contemporary Topics in Polymer Science.* Plenum Press, New York, 2, 1977, 251 – 289.
 24. Lewis, D. H., Chasin, M., Langer, R.: *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.* Inc., New York, 1990, 1 – 41.
 25. Ginde, R. M., Gupta, R. K.: In vitro Chemical Degradation of Poly(glycolic Acid) Pellets and fibers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 33, 1987, 2411 – 2429.
 26. Gogolewski, S., Pennings, A. J.: Resorbable materials of poly(L-lactide). Fibers spun from solutions of poly(L-lactide) in good solvents. *J. Appl. Polym. Sci.*, 28, 1983, 1045 – 1061.
 27. Cohen, S., Alonso, M. J., Langer, R.: Novel approaches to controlled release antigen delivery. *Int. J. Technol. Assessment in Health Care*, 10, 1994, 121 – 130.
 28. Jalil, R., Nixon, J. R.: Microencapsulation using poly(D,L-lactic acid). Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *Microencapsulation*, 7, 1990, 297 – 325.

-
29. Wu, X. S., Wise, D. L.: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Inc. New York, 1995, 1015 – 1054.
 30. Jamshidi, K., Hyon, S. H., Ikada, Y.: Thermal Characterization of Polylactides. *Polymer*. 1988, 2229 – 2234.
 31. <http://en.wikipedia.org/wiki/PLGA> (13. 8. 2009)
 32. Pitt, C. G., Gratzel, M. M., Kimmel, G. L., Surles, J., Schindler, A.: Aliphatic polyesters 2. The degradation of poly(D,L-lactide), poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers *in vivo*. *Biomaterials*. 1981, 215 – 220.
 33. Li, S. M., Garreau, H., Vert, M.: Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 1: Poly(D,L-lactic acid). *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1990, 123 – 130.
 34. Raghuvanshi, R. S., Singh, M., Talwar, G. P.: Biodegradable delivery system for single step immunization with tetanus toxoid. *Int. J. Pharm.* 93, 1993.
 35. Dunn, R. L., English, J. P., Strobel, J. D., Cowsar, D. R., Tice, T. R.: Preparation and evaluation of lactide/glycolide copolymers for drug delivery. In: C. Migliaresi (Ed.), *Polymers in medicine*. Amsterdam, Elsevier, 3, 1988.
 36. Bhardwaj, R., Blanchard, J.: In vitro evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymer-based implants containing the α -melanocyte stimulating hormone analog, Melanotan-I. *J. Control. Release*. 45, 1997, 49 – 55.
 37. Wise, D. L., Trantolo, D. J., Marino, R. T., Kitchell, J. P.: Opportunities and challenges in the design of implantable biodegradable polymeric systems for the delivery of antimicrobial agents and vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1, 1987, 19 – 39.
 38. <http://www.gate2biotech.cz/stehy-z-kyseliny-mlecn/> (16. 8. 2009)
 39. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aciclovir> (13. 8. 2009)
 40. Lincová, D., Farghali H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, 2002, 473 – 482.
 41. AISLP – SPC u Herpesinu. (11. 6. 2009)
 42. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fluconazol> (13. 8. 2009)
 43. AISLP – SPC u Mycomaxu. (11. 6. 2009)
 44. Zhang, L., Ling, Y., Du, M.: Synthesis, crystal structures and in vitro anti-fungal activities of two silver(I) coordination polymers with fluconazole. *Inorganica Chimica Acta* 360, 2007, 3182 – 3188.

-
45. Seidman, L., Skokos, C.: An evaluation of butoconazole nitrate 2 % site release vaginal cream (Gynazole-1) compared to fluconazole 150 mg tablets (Diflucan) in the time to relief of symptoms in patients with vulvovaginal Candidiasis. *Inf. Dis. Obst. Gyn.* 13, 2005, 197 – 206.
 46. Champan, R. L.: Prevention and treatment of candida infections in neonates. *Semin. Perinatol.* 31, 2007, 39 – 46.
 47. Bachhav, Y. G., Patravale, V. B.: Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 365, 2009, 179 – 179.
 48. <http://www.zwick-roell.cz> (28. 2. 2008)
 49. <http://www.vitrum.cz/sterilizace/index.php?action=produkty&cat=749> (5. 5. 2009)
 50. Podzimek, Š.: Charakterizace větvených oligoesterů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem. *Synpo Pardubice*, 2006, 3.
 51. Ljungberg, N., Wesslén, B.: The effect of Plasticizers on Dynamic Mechanical and Thermal properties of Poly(Lactic Acid). *J. Appl. Polym. Sci.*, 2002, 86, 1227 – 1234.
 52. Labrecque, L. V., Kumar, R. R., Davé, V., Gross, R. A., McCarthy, S. P.: Citrate as Plasticizers for Poly(lactic acid). *J. Appl. Polym. Sci.*, 1997, 66, 1507 – 1513.
 53. Podzimková, Š.: Adhezivní vlastnosti oligoesterů větvených pentaerythritolem a tripentaerythritolem. Rigorózní práce, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 2008, 60.