

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
*Katedra farmaceutické technologie*

**STUDIUM VLIVU PLASTIFIKÁTORŮ NA LIBERACI**  
**ACIKLOVIRU Z POLYMERNÍCH NOSIČŮ**

*Rigorózní práce*

**Hradec Králové, září, 2005**

**Mgr. TRČKOVÁ Kateřina**

Děkuji paní *PharmDr. Evě Šnejdové, Ph. D.* za odbornou pomoc, ochotu a trpělivý přístup při zpracování této rigorózní práce.

Mgr. Kateřina Trčková

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>6</b>
<b>3. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>7</b>
<b>4. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
4. 1. Polymerní systémy .....	8
4. 1. 1. Polymerní systémy pro řízené uvolňování léčiv .....	8
4. 1. 2. Polymerní systémy pro cílený transport léčiv .....	10
4. 1. 3. Polymerní systémy pro genovou terapii .....	11
4. 1. 4. Polymery pro konstrukci implantátů do centrálního nervového systému .....	11
4. 2. Orální systémy s řízeným uvolňováním léčiv .....	11
4. 2. 1. Vstřebávání léčiv z ústní dutiny .....	11
4. 2. 2. Bioadhezivní polymerní systémy .....	12
4. 3. Systémy pro aplikaci do parodontální kapsy .....	13
4. 3. 1. Parodont .....	13
4. 3. 2. Rezervoárové polymerní systémy .....	14
4. 4. Biodegradabilní polyesterové systémy .....	15
4. 4. 1. Polymery kyseliny mléčné a glykolové .....	15
4. 5. Herpetické viry .....	18
4. 5. 1. Virus Herpes simplex 1 a 2 .....	18
4. 6. Virostatika, antivirotika, antivirová terapie .....	19
4. 6. 1. Antivirotika používaná k terapii herpetických onemocnění .....	20
4. 6. 2. Aciklovir .....	20
4. 6. 3. Antivirotika používaná k terapii chřipkových onemocnění .....	25
4. 6. 4. Antivirotika používaná k terapii retrovirových infekcí .....	25
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>26</b>
5. 1. Přístroje .....	26
5. 2. Suroviny .....	26
5. 3. Oligoesterový nosič .....	26
5. 4. Pracovní postup .....	27
5. 4. 1. Příprava pufru o pH 6,0 .....	27
5. 4. 2. Kalibrační přímka .....	27
5. 4. 3. Příprava matric .....	29
5. 4. 4. Výpočet uvolněného acikloviru .....	29
<b>6. VÝSLEDKY</b> .....	<b>31</b>
6. 1. Tabulky .....	31
6. 2. Grafy .....	52

<b>7. DISKUZE</b> .....	<b>61</b>
7. 1. Vliv oligoesterového nosiče na liberaci acikloviru .....	62
7. 2. Vliv methyلسalicilátu na liberaci acikloviru .....	63
7. 3. Vliv ethyلسalicylátu na liberaci acikloviru .....	63
7. 4. Vliv hexyلسalicylátu na liberaci acikloviru.....	64
7. 5. Liberace acikloviru z matric plastifikovaných 10% plastifikátorů .....	64
<b>8. ZÁVĚR</b> .....	<b>66</b>
<b>9. SOUHRN</b> .....	<b>67</b>
<b>10. LITERATURA</b> .....	<b>69</b>

# 1. ÚVOD

Mezi hlavní oblasti vědecko–výzkumné aktivity patří hledání nových terapeutických systémů s řízeným uvolňováním léčivé látky a aplikačních forem pro cílený transport do určitých konkrétních lokalit v lidském těle (mozek, tlusté střevo), zkoumání mechanismu transportu léčivých látek polymerními membránami, využití nových polymerních nosičů a zjištění kinetiky liberace léčivých látek z těchto nosičů.

Předložená rigorózní práce navazuje na poznatky získané v předchozích pracích na toto téma realizovaných na katedře farmaceutické technologie, zejména na moji diplomovou práci s názvem Studium biodegradabilních systémů s aciklovirem II. Stejně jako v diplomové práci byla sledována liberace acikloviru z oligoesterových nosičů, nosičem acikloviru byl však zvolen terpolymer kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a mannitolu, pracovně označený 5M, ve funkci plastifikátoru byly testovány methylsalicylát, ethylsalicylát a hexylsalicylát v různých koncentracích. Stanovení množství uvolněného acikloviru bylo provedeno spektrofotometricky (stejně jako v diplomové práci) a paralelně ještě fluorimetricky. Fluorimetrické stanovení acikloviru v disolučním médiu, které představuje složitý komplex obsahující kromě léčiva a složek pufru produkty degradace oligoesteru a plastifikátor, mělo umožnit citlivější detekci uvolněného acikloviru. Bohužel však naměřené výsledky nebylo možno v této práci použít, jelikož se extrémně lišily od hodnot naměřených na spektrofotometru a byly teoreticky nemožné. Je pravděpodobné, že extrémní hodnoty, zjištěné fluorimetrickou metodou, byly způsobeny právě přítomností plastifikátoru a degradačních produktů oligoesteru v měřeném médiu a citlivost metody měření se v tomto případě neukázala jako výhoda, ale naopak jako nevýhoda.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo studium liberace acikloviru z oligoesterového nosiče, pracovně označeného 5M. Jedná se o terpolymer kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a 5% mannitolu (LA/GA/M). Nosič byl plastifikovaný methylsalicylátem v koncentracích 10%, 20% a 30%, nebo ethylsalicylátem v koncentracích 10%, 20%, 30%, 40% a 50%, nebo hexylsalicylátem v koncentracích 10%, 20% a 30%. Byl sledován vliv typu a koncentrace plastifikátoru na liberaci acikloviru z nosiče.

Úkol rigorózní práce je možné rozdělit do následujících dílčích kroků:

1. Příprava matric o hmotnosti 150,0 mg z oligoesterového nosiče 5M, 4% acikloviru a zvoleného plastifikátoru (methylsalicylát v koncentracích 10%, 20%, 30%, ethylsalicylát v koncentracích 10%, 20%, 30%, 40%, 50% a hexylsalicylát v koncentracích 10%, 20%, 30%). Matrice připravit duplicitně.
2. Příprava placebo matric tvořených pouze plastifikovaným nosičem (bez léčiva).
3. Realizace modifikovaného statického disolučního testu při 37°C za použití fosfát-citrátového pufru pH 6,0 jako disolučního média. Odebírání vzorků disolučního média ve vhodně stanovených časových intervalech, v počátku liberace v kratších intervalech, později v delších s ohledem na průběh liberace.
4. Stanovení množství uvolněného acikloviru spektrofotometricky měřením absorpance při vlnové délce 256 nm.
5. Zjištění vlivu typu použitého plastifikátoru a jeho koncentrace na množství uvolněného acikloviru.

### 3. SEZNAM ZKRATEK

5M – pracovní označení terpolymeru kys. mléčné, glykolové a mannitolu

ACV – aciklovir

CMV – Cytomegalovirus

CNS – centrální nervový systém

DNA – deoxyribonucleotid acid (deoxyribonukleová kyselina)

HS – hexylsalicylát

MS – methylsalicylát

ES – ethylsalicylát

FL – fluorescence

HBV – virus hepatitidy B

HEMA – poly(2hydroxyethylmethakrylát)

HIV – Human Immunodeficiency Virus (virus způsobující poruchu lidské imunity)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HSV – Herpes Simplex Virus

MTEM – poly(2-hydroxyethylmethakrylát-co-2-methylthioethyl-methakrylát)

PGA – polyglycolic acid (kyselina polyglykolová)

PLA – polylactic acid (kyselina polymléčná)

PLGA – polylactic – glycolic acid (kopolymer kyseliny glykolové a mléčné)

RNA – ribonucleotid acid (ribonukleová kyselina)

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4. 1. Polymerní systémy

Na začátku minulého století přišel Paul Ehrlich s představou tzv. ideálního léčiva. Takové léčivo mělo být specificky dopraveno z místa, do kterého bylo aplikováno, do místa, kde byl požadován jeho léčebný efekt, a to v neaktivní (tělu neškodné) formě. V cílovém místě se pak měla uvolňovat jeho aktivní forma takovou rychlostí a tak dlouho, dokud by nebylo dosaženo maximálního terapeutického účinku.

Přestože se tato představa zdá být poměrně jednoduchá, k realizaci došlo teprve v 90. letech minulého století, kdy rozvoj makromolekulární chemie, biologie a biochemie umožnil přípravu nových systémů, označovaných jako „controlled drug release systems“ nebo „controlled drug delivery systems“, tedy systémy pro řízené uvolňování léčiva nebo systémy s cíleným transportem. Většina těchto systémů je založena na použití přírodních nebo syntetických polymerů, jejichž vlastnosti jsou určující jak pro zamýšlený způsob použití, tak pro výsledné vlastnosti polymerního systému, schopného léčivo postupně uvolňovat.

Byla studována celá řada makromolekulárních látek nejen přírodního charakteru (albumin, kolagen, dextransy a další polysacharidy), ale především polymery syntetického původu. Výhodou syntetických polymerů, nejen jako nosičů léčiv, je zejména možnost modifikace jejich vlastností (lineární a zesíťované polymery, lipofilní a hydrofilní, biodegradovatelné i v organismu nedegradovatelné). Některé polymerní systémy, z hlediska přípravy jednodušší, splňují pouze požadavek na řízené uvolňování léčiva v organismu. Jiné, které jsou často mnohem složitější, vyhovují požadavkům nejen na řízené uvolňování léčiva v místě požadovaného účinku, ale také na jeho cílený transport.

#### 4. 1. 1. Polymerní systémy pro řízené uvolňování léčiv

##### Klasifikace

1. Podle místa aplikace (např. transdermální systémy, perorální, subkutánní, aplikované na sliznici)
2. Podle struktury a funkce:



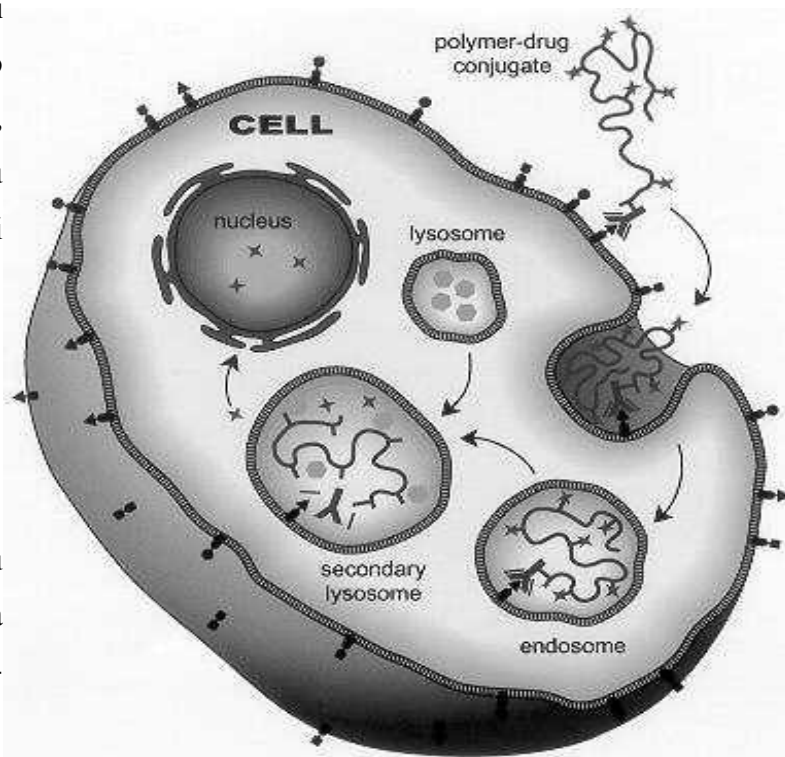
- a) Olejové kapky nebo masti, ve kterých je léčivo dispergováno a rychlost uvolňování léčiva je řízena rychlostí jeho difúze z polymerního materiálu do okolního prostředí.
- b) Polymerní tablety s léčivem, popřípadě tablety potažené vrstvou rozpustného polymeru. Rychlost uvolňování léčiva je v tomto případě řízena rychlostí, jakou se polymer, tvořící tabletu nebo obal tablety, rozpouští.
- c) Matricové systémy, degradovatelné i nedegradovatelné, u nichž je rychlost, jakou se léčivo uvolňuje, ovlivněna difúzí, biodegradací polymerní matrice, nebo kombinací obou těchto procesů. Tyto systémy mohou v závislosti na složitosti vytvořené formy řídit rychlost uvolňování léčiva podle podnětů, které přicházejí z organismu (např. změna teploty, změna koncentrace glukosy v krvi atd.), nebo z vnějšího prostředí (např. magnetické pole, ultrazvuk atd.)
- d) Membránové systémy, u kterých je rychlost uvolňování léčiva řízena propustností polymerní membrány. Tyto systémy se mohou kombinovat s matricovými.
- e) Sférické polymerní částice (mikročástice a nanočástice) jsou složitější, ale dokonalejší systémy, které umožňují jak cílený transport, tak řízené uvolňování léčiv. Mohou být selektivně dopravovány do určitých částí organismu v závislosti na jejich velikosti, na vloženém vnějším poli (magnetickém) nebo po povrchové modifikaci biologicky aktivními molekulami (protilátkami). Podle povahy použitého polymeru se léčivo uvolňuje buď difúzí, nebo biodegradací částic.
- f) Micely, připravené jako blokové kopolymery, obsahující hydrofilní a hydrofobní sekvence. Léčivo se uvolní po rozpadu micely na polymerní nebo nízkomolekulární produkt. Cílenou distribuci v organismu je možné ovlivnit vhodnou chemickou modifikací micel.
- g) Liposomy, sférické částice tvořené amfifilními látkami, obsahují léčivo rozpuštěné v hydrofilní dutině, které se uvolní po rozpadu liposomu. Cílený transport umožní povrchová modifikace biologicky aktivními látkami.
- h) Polymerní konjugáty léčiv, díky nimž je možné změnit nejen rozpustnost léčiva, ale také významně ovlivnit jeho farmakodynamiku a farmakokinetiku. Používají se pro přípravu polymerních systémů uvolňující kancerostatika (doxorubicin, daunomycin, melphalan), antibiotika a imunomodulátory. Protirakovinná a imunosupresivní aktivita konjugátu je doprovázena výrazným snížením (u imunomodulátorů až vymizením) nežádoucích (toxických) účinků použitých léčiv<sup>1</sup>.

#### 4. 1. 2. Polymerní systémy pro cílený transport léčiv

Výzkumné projekty jsou zaměřeny na studium vztahu mezi strukturou a fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi rozpustných polymerních léčiv. Zvláštní pozornost je věnována vývoji polymerních systémů s protinádorovými léčivy, umožňujících cíleně dopravit neaktivní cytostatikum k nádoru či nádorovým buňkám a v těchto buňkách cytostatikum řízeně aktivovat. Syntéza těchto látek je založena na konjugaci vodorozpustných polymerů s protilátkami a cytostatiky. V současné době jsou studovány následující systémy:

- **hydrofilní polymerní systémy**, obsahující léčivo a směřující protilátku, připojené k polymernímu nosiči biodegradovatelnými oligopeptidovými sekvencemi;

- **hvězdicovité makromolekuly**, obsahující ve svém středu směřující protilátku a řetězce poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu] nesoucí léčivo ve vnější části molekuly;



Obr. č. 1: Komplex léčivo – polymer pro cílený transport<sup>2</sup>

- **biodegradovatelné polymerní systémy**, založené na nosičích léčiv tvořených bloky poly(ethylenglykolu), spojených degradovatelnými oligopeptidovými sekvencemi do vysokomolekulárního útvaru.

V rámci výše uvedeného projektu jsou studovány a vyvíjeny hydrofilní polymerní systémy umožňující použití enzymů a biologicky aktivních proteinů pro terapeutické účely.

### **4. 1. 3. Polymerní systémy pro genovou terapii**

Jsou studovány polymerní nosiče vhodné pro transport genové informace do živočišné buňky *in vivo*. Tyto nosičové systémy jsou konstruovány jako komplexy DNA či plasmidů s polykationty, jejich blokovými a roubovanými kopolymery a dalšími biologicky účinnými molekulami. Cílem tohoto studia je vývoj nových léčiv umožňujících genovou terapii vybraných typů onemocnění u člověka<sup>2</sup>.

### **4. 1. 4. Polymery pro konstrukci implantátů do centrálního nervového systému**

Výběr vhodného polymeru, který by vyhověl náročným podmínkám použití v případě poškození buněk CNS, je výsledkem dlouhodobého komplexního studia široké škály materiálů. Byly připraveny vzorky řídké síťovaného kopolymeru poly(2-hydroxyethylmethakrylát-*co*-2-methylthioethyl-methakrylát) (MTEM) a implantovány do podkoží a mozkové tkáně pokusných zvířat krys.

Výsledky vyhodnocení povrchů vzorků explantovaných po 4 týdnech byly velmi příznivé. Sledované hydrogely MTEM byly oproti referenčnímu poly(2-hydroxyethylmethakrylátu) (HEMA) kolonizovány jen velmi malým množstvím makrofágů a nepatrným množstvím velkých mnohjaderných buněk z cizích těles, zatímco v dalších sledovaných parametrech byly oba polymery srovnatelné.

Podkožní i mozková biokompatibilita hydrogelu MTEM se ukázala podstatně lepší oproti polymeru HEMA. Tato skutečnost by mohla být využita při přípravě nosičů léčiv, respektive konstrukci implantátů pro CNS<sup>3 4</sup>.

## **4. 2. Orální systémy s řízeným uvolňováním léčiv**

### **4. 2. 1. Vstřebávání léčiv z ústní dutiny**

Ústní dutina je vhodné místo pro aplikaci léčiva nejen díky snadnému podání, ale také díky tomu, že při vstřebání léčiva ústy se zamezí jeho degradaci v gastrointestinálním traktu a first-pass efektu. Jsou možné čtyři způsoby aplikace léčiva do ústní dutiny, a to bukální, sublinguální, palatální (týkající se horního patra) a gingivální. Bukální aplikace může být použita jak pro lokální působení léčiva, tak pro systémový účinek. Mezi nevýhody této aplikace patří malá absorpční plocha, krátká doba kontaktu léčiva se sliznicí a bariéra, kterou tvoří sama sliznice<sup>5</sup>.

Absorpce je závislá na dávce léčiva. Doporučuje se denní dávka 25 mg a méně.

Příčinou lokálních a časových výkyvů ve vstřebávání léčiva je zejména produkce slin, tvořených mucinem (skupina glykoproteinů) ze slinných žláz<sup>6</sup>. Sliny sice neobsahují žádné proteázy, je v nich však malé množství esteráz, karbohydráz a fosfatáz, jež mohou způsobit rozklad některých léčiv<sup>7</sup>.

Existují dvě možné cesty průniku léčiva sliznicí v závislosti na jeho hydrofilitě, respektive hydrofobitě. Hydrofobní léčiva prostupují zejména lipofilnější transcelulární cestou (přes buňky epitelu), zatímco hydrofilní léčiva méně lipofilní paracelulární cestou (mezi buňkami)<sup>5</sup>. Lépe se vstřebávají lipofilnější léčiva. Chemickou modifikací lipofility léčiva můžeme tedy dosáhnout toho, že se bude léčivo rychleji a lépe vstřebávat přes buňkami sliznicí transcelulární cestou.

Propustnost léčiv iontového charakteru závisí na pH prostředí, ze kterého a do kterého se léčivo vstřebává. Vstřebání probíhá pasivní difúzí<sup>8</sup>. Zvýšení neionizovaných frakcí ionizujícího léčiva může příznivě ovlivnit průnik transcelulární cestou<sup>9</sup>.

Vstřebávání léčiva mohou různými způsoby ovlivnit také patologické a fyziologické procesy, jako je slinění (zvýšené slinění podporují kyselé látky), tloušťka vrstvy epitelu (hyperplazie, atrofie), popřípadě jeho celkové poškození (ulcerace)<sup>5</sup>.

Průchod léčiva buňkami sliznicí mohou usnadnit také speciální látky, které jsou právě k tomuto účely využívány. Mezi ně patří soli žlučových kyselin, mastné kyseliny, laurylsíran sodný nebo chitosan<sup>10</sup>.

#### **4. 2. 2. Bioadhezivní polymerní systémy**

Výhodou pro použití bioadhezivních systémů v ústní dutině je hladký, relativně nepohyblivý a snadno přístupný povrch. Bioadhezivní systémy prodlouží dobu kontaktu léčiva se sliznicí, a tím zvýší vstřebávání léčiva v konkrétní oblasti ústní dutiny<sup>11</sup>.

Interakce mezi sliznicí a bioadhezivními polymery je výsledkem fyzikálních interakcí a následného spojení pomocí vodíkových můstků a van der Waalsových sil. Síla interakcí závisí na chemické struktuře polymerů. Mezi vhodné funkční skupiny polymerů patří hydroxyl, karboxyl, amin a amid. Bioadhezivní polymer musí mít vhodnou molekulovou hmotnost a délku řetězce<sup>11</sup>.

Obvykle jsou preferovány anionické polymery, jejichž fyzikální vlastnosti (např. stupeň hydratace, reologické vlastnosti atd.) mají největší vliv na bioadhezivitu a následně také na rychlost degradace<sup>12</sup>.

K adhezi dojde po hydrataci systému. Vazby však nejsou příliš silné a pokud je hydratace nadměrná, může vzniknout neadhezivní gel. Z toho vyplývá, že síla adheze je

maximální pouze při určitém stupni hydratace, který je ovlivněn strukturou polymeru. Bioadhezivní vlastnosti mají jak některé přírodní polymery (chitosan, alginát sodný), tak syntetické polymery (deriváty celulosy, polyakryláty, polyvinylpyrolidon a polyvinylalkohol)<sup>13</sup>. Kromě toho je bioadhezivita ovlivněna také vnějšími faktory, jakými jsou např. sekrece slin, příjem jídla, nebo místní pH.

Příkladem adhezivních systémů mohou být filmy a náplasti různých typů a rozměrů pro bukální aplikaci, ale také bioadhezivní tablety (v dutině ústní se tvoří hydrogel, ze kterého se uvolňuje účinná látka – např. triamcinolon acetonid, nifedipin, propranolol)<sup>14 15 16</sup>.

### 4. 3. Systémy pro aplikaci do parodontální kapsy

#### 4. 3. 1. Parodont

Termínem parodont se rozumí závěsný aparát zubu, jehož součástí je dásěň, ozubice, zubní cement, kostěné zubní lůžko a dásňový žlábek.

Dásěň (*gingiva*) je tvořena slizniční tkání. Ta límcovitě obepíná zub při okraji zubní korunky, mezi zuby vybíhá v sedlovité výběžky (*papily*) a směrem ke kořenům zubů přechází do sliznice dutiny ústní. Zdravá dásěň má růžovobílou barvu, je tužší konzistence a při jemné sondáži nekrvácí.

Periodoncium zajišťuje pevné a pružné spojení zubu s kostí zubního lůžka. Skládá se ze systému závěsných vazů.

Zubní cement pokrývá v tenké vrstvě povrch zubního kořene od místa, kde končí sklovina, tj. v místě, kde korunka zubu přechází v zubí kořen. Stavbou se podobá kosti, neobsahuje však nervy ani cévy.

Kost zubního lůžka kopíruje přesně tvar kořenů jednotlivých zubů. Mezi zubem a kostěným lůžkem je štěrbina, kterou vyplňují vazivová vlákna ozubice.

Dásňový žlábek (*gingivální sulcus*). Prostor mezi dásní a zubem samotným je vyplněný tzv. spojovacím epitelem. U zdravého jedince bývá hluboký asi 0,5 mm. Pokud dojde k akutnímu nebo chronickému dráždění v tomto citlivém místě, narušuje se spojovací epitel, tento prostor se rozšiřuje a postupně se zhoršuje ukotvení zubu v kosti. Dochází k narušení a úbytku vazů závěsného aparátu a k resorpci kostěného lůžka. Vzniká hluboká "kapsa", která se označuje jako parodontální chobot<sup>17</sup>.

Dásňový žlábek je spoře osídlen bakteriemi a mikroflórou, která je tvořena zejména aerobními gram – pozitivními bakteriemi<sup>18 19</sup>. Tyto bakterie jsou kompatibilní se zdravou tkání a předpokládá se, že existují v rovnováze s mnoha obrannými mechanismy. Pokud však

dojde k velkému nárůstu počtu nebo ke změně složení přirozené mikroflóry, projeví se to okamžitě v rozvoji zánětlivých parodontálních onemocnění. Cílem léčby je pak především zklidnění zánětlivé reakce, eliminace bakterií a redukce parodontální kapsy.

#### **4. 3. 2. Rezervoárové polymerní systémy**

Jsou tvořeny matricí s dispergovaným léčivem. Léčivo se uvolňuje z matrice buď pouze difúzí – v tomto případě se jako matrice používá nedegradabilní ve vodě nerozpustný polymer, nebo difúzí spojenou s erozí, popřípadě disolucí matrice za použití ve vodě rozpustných nebo biodegradabilních polymerů v matrici. Nevýhodou v použití nedegradabilních matric je, že musí být po skončení léčebného procesu odstraněny, aby nedošlo k zánětlivé reakci.

##### **1. Nedegradabilní matricové systémy**

- a) Polyethylmethakrylátové filmy
- b) Ethylcelulózové filmy
- c) Ethylenvinylacetátová vlákna
- d) Eudragit RL (filmy)

##### **2. Biodegradabilní matricové systémy**

Na rozdíl od nedegradabilních matricových systémů není požadováno jejich odstranění po erozi nebo disoluci v dásňové štěrbině. K uvolňování léčiva dochází kombinací několika mechanismů (eroze, nebo disoluce matrice a difúze léčiva matricí), přičemž podíl každého z těchto mechanismů na celkovém uvolňovacím procesu závisí na jejich relativních poměrech. Celkově může být prodloužené uvolňování ovlivněno zpracováním erozních a disolučních charakteristik distribučního systému.

- a) Hydroxypropylcelulózové filmy
- b) Bioabsorbovatelné zubní materiály – hemostatická gáza tvořená oxidovanou regenerovanou celulózu (Surcigel<sup>®</sup>), kolagenovým obvazem (CollaCote<sup>®</sup>) a fibrinovým těsnícím materiálem (Tissel<sup>®</sup>)
- c) Zesíťovaný kolagen a proteinová vlákna
- d) Biodegradabilní polyestérové preparáty:
  - kopolymer hydroxypropylcelulózy (film) a methakrylové kyseliny (dispergované částice)

- polymery a kopolymery kyseliny polyhydroxymáselné, polyhydroxyvalerové a polymléčné
- vlákna tvořená poly( $\epsilon$ -kaprolakton)em, hydroxypropylcelulózou a polyethylenglykolem
- mikrokapsle tvořené kopolymery kyseliny mléčné a glykolové
- mikrokapsle tvořené poly(glykolid – co – DL – laktid)em
- gel tvořený směsí glycerol monooleátu a sezamového oleje
- kopolymery kyseliny methakrylové a methylmethakrylátu (filmy) – Eudragit L<sup>®</sup>, Eudragit S<sup>®20</sup>

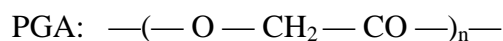
#### 4. 4. Biodegradabilní polyesterové systémy

Nízkomolekulární polyestery ( $M_w < 5000$ ) mohou být syntetizovány polykondenzací hydroxykyselin, vysokomolekulární polyestery však přímou kondenzací připravit nelze. Tyto polyestery jsou syntetizovány otevřením kruhu (*ring-opening*) cyklických laktonů a dilaktonů, které vznikly polykondenzační reakcí a následným štěpením a formování 6 – členných cyklů za vysokých teplot<sup>21 22</sup>.

- 1) **poly( $\alpha$  - estery)** – kys. polyglykolová, kys. polymléčná, jejich kopolymery
- 2) **poly( $\beta$  – estery)** – poly(3 – hydroxybutanoát), poly(3 – hydroxyvalerát), jejich kopolymery
- 3) **poly( $\gamma$  – estery)** – poly(4 – hydroxybutanoát)
- 4) **další polyestery a polylaktony** - poly( $\epsilon$ -kaprolakton), polyvalerolakton<sup>23</sup>

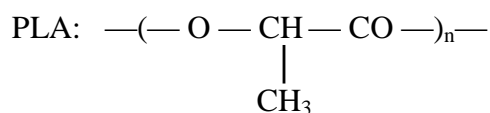
##### 4. 4. 1. Polymery kyseliny mléčné a glykolové

Běžně se připravují polymerací za otevření kruhu cyklických diesterových dimerů, glykolidu a laktidu. Molární hmotnost vznikajícího polymeru je řízena koncentrací iniciátoru. Polymerace probíhá v uzavřených, suchých nádobách za sníženého tlaku a vysoké teploty. Používá se celá řada iniciátorů reakce jako jsou organokovové sloučeniny cínu, zinku, hliníku (tetrafenyl cínu, oktanoát cínu, isopropanol hlinitý) nebo anionické katalyzátory (methoxid draselný, butoxid draselný, butyllithium).



Vlastnosti PGA jsou dány jejich molekulovou hmotností, podílem krystalické fáze a skutečností, že se jedná o polyester s nejvyšší hydrofilitou. Má vysoký bod tání a mnohem vyšší teplotu skelného přechodu než poly( $\beta$ -estery). Další vlastnosti:

- nepolární methylenová skupina, relativně polární esterová skupina
- nerozpustná ve většině organických rozpouštědel
- krystalinita v rozmezí 35 – 75 %)
- teplota tání ( $T_m$ ) cca 225°C
- teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) cca 35°C
- vysoká pevnost a modul elasticity
- biodegradace hydrolýzou nestabilních esterových vazeb (doba závisí na fyzikálně – chemických vlastnostech polymeru a prostředí)<sup>21</sup>



Methylová skupina na  $\alpha$  – uhlíku je příčinou odlišných fyzikálních, chemických a mechanických vlastností než má PGA. Chirální centrum umožňuje existenci několika izomerů s odlišnými vlastnostmi. V praxi jsou využívány především L-PLA, DL-PLA (racemická směs L(-) a D (+) izomeru). PLA je hydrolyticky stabilnější než PGA (esterová skupina je stericly chráněna methylovou skupinou)<sup>24</sup>. Konformace monomerů (kyseliny mléčné i dilaktidu) pro syntézu kyseliny polymléčné ovlivňuje výslednou takticitu polymeru. Přírodní kyselina mléčná je LLA a čisté enantiomerní polymery (PDLA a PLLA) jsou semikrystalické.

L – PLA:

- semikrystalická (krystalinita okolo 35 %)<sup>25</sup>
- teplota tání ( $T_m$ ) cca 175°C
- teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) cca 65°C
- rozpustná ve většině organických rozpouštědel
- velká pevnost

DL – PLA:

- amorfni struktura  $\rightarrow$  rychlejší degradace než L - PLA



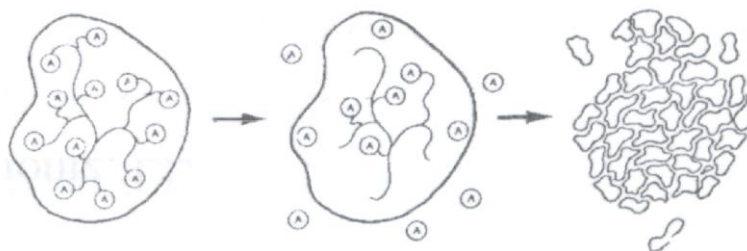
- teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) cca  $57^\circ\text{C}$
- velmi malá pevnost a modul elasticity<sup>24</sup>

Degradace kopolymeru PLGA při kontaktu s vodou probíhá jako hydrolytické štěpení esterových vazeb náhodně v řetězci. Tímto způsobem vznikají nové koncové karboxylové skupiny, které mohou katalyzovat štěpení dalších esterových vazeb. Tak nastává homogenní degradace.<sup>26</sup> Klesá molekulová hmotnost polymeru, částečně degradované makromolekuly se stanou rozpustnými ve vodě, nastává difúze v celém objemu matrice. Tento proces, kombinující 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 je však oproti karboxylovým skupinám uvnitř matrice malý. V prostředí pufru dochází navíc k neutralizaci povrchových karboxylů. To vše vede ke snížení stupně povrchové degradace.<sup>27</sup>

PGA i PLA podléhají v podmínkách *in vitro* a *in vivo* degradaci ve srovnatelné míře. Hydrolytické štěpení PLA probíhá o něco pomaleji než u hydrofilnější PGA. Amorfni DL-PLA degraduje rychleji než semikrystalická L-PLA. Pro lékařské účely jsou syntetizovány různé kopolymery kyseliny glykolové a mléčné. Ty jsou obecně více amorfni než čisté polymery a více odolávají hydrolýze, zvláště obsahují-li vyšší podíl jednoho z polymerů. Biodegradace kopolymerů je rychlejší než u homopolymerů, neboť kopolymery jsou oproti homopolymerům amorfni.

Celková doba degračního procesu závisí na molekulové hmotnosti, stupni krystalinity, fyzikální geometrii a fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí<sup>21</sup>. Může být řádově od několika dnů po několik let. Nejrychlejší degradaci vykazují kopolymery s nízkou molekulovou hmotností a poměrem kyseliny glykolové a mléčné 50:50<sup>28</sup>.

Obr. č. 2: Biodegradace kopolymeru PLGA<sup>29</sup>



Kopolymery PLGA se pro lékařské účely upravují nejčastěji do forem mikročástic, implantátů nebo injekcí in situ, aby mohly být použity jako terapeutické systémy s řízeným uvolňováním léčivé látky.

## **4. 5. Herpetické viry**

Viry ze skupiny herpesvirů mají společnou strukturu, způsob replikace i schopnost navodit celoživotní infekci, která se reaktivuje na podnět spouštěcího faktoru (imunita oslabená stresem, chorobou, horečkou, menstruací, emoční nerovnováhou nebo UV zářením).

Rozeznáváme 8 typů lidských herpetických virů:

1. virus herpes simplex 1
2. virus herpes simplex 2
3. virus varicela – zoster
4. virus Epstein – Barrové
5. cytomegalovirus
6. virus herpes hominis 1
7. virus herpes hominis 2
8. herpes virus Kaposiho sarcina

Herpetické viry jsou ve vnějším prostředí inaktivovány tukovými rozpouštědly a detergenty, jsou citlivé ke kyselému pH a vyschnutí. Přenášejí se přímou kontaminací tělesnou tekutinou, ve které je virus obsažen (určitou výjimkou je virus varicela – zoster, který se do určité vzdálenosti od zdroje může šířit také vzduchem). Do organismu pak pronikají prostřednictvím sliznice (dutiny ústní, genitální, anální, spojivky, dýchacích cest) a krevním řečištěm. Neporušenou kůží nepronikají.

### **4. 5. 1. Virus Herpes simplex 1 a 2**

HSV je neurotropní virus, který vstupuje do zakončení nervových vláken v infikovaných buňkách a virová dědičná informace v bílkovinném obalu se šíří axony do některých neuronů regionálních sensorických ganglií, kde virová DNA latentně perzistuje.

Infekce vyvolané typem 1 jsou většinou lokalizovány na obličeji, v ústech a v CNS; typ 2 se projevuje jako perigenitální infekce. K primární infekci HSV – 1 dochází zpravidla již v dětském věku a její průběh je často symptomatický. Klinicky se může projevit jako herpetická gingivostomatitida a lokální lymfadenopatie u malých dětí, u větších dětí a dospělých pak jako katar dýchacích cest nebo keratokonjunktivitida provázená korneálním

vředem (ten se často vrací, vede k jizvení rohovky a poruše vidění). Opakovaná infekce se projevuje po prodromech (místní bolest a svědění) jako exantém s puchýřky nejčastěji na přechodu sliznice v kůži (rty, ústní dutina, brada, nos), ale může to být také na kterémkoliv místě inervovaném postiženým neuronem.

Vzácně může virus proniknout do CNS, kde vyvolá herpetickou encefalitidu. Ta se projevuje jako horečka a nevolnost, po kterých následuje bolest hlavy, změny chování a může skončit až ochrnutím.

Infekce vyvolané typem HSV – 2 patří k nejčastějším pohlavním nákazám. Projevují se jako puchýřky na penisu, vagině, vulvě i perianálně, které rychle vředovají. Primární infekce probíhá většinou závažněji a je provázená horečkami, nevolností a lymfadenopatií, někdy uretritidou a výtokem. Trvá 3 – 4 týdny a v jednom roce se může opakovat až 6krát v mírnější formě<sup>30</sup>.

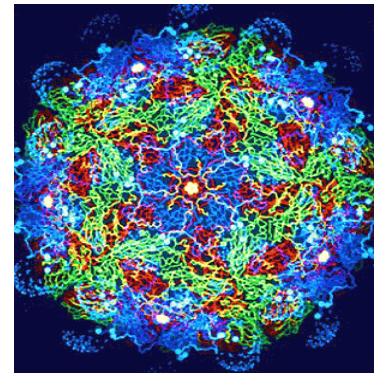
#### 4. 6. Virostatika, antivirotika, antivirová terapie

Léčba virových onemocnění je velice obtížná. Preventivním zákrokem je očkování, teprve ve druhé řadě, pokud se tělo nedokáže samo s atakem viru vypořádat, je nutné nasadit léčiva s přímým protivirovým účinkem.

Antivirotika jsou většinou nové látky, které zasahují na různých úrovních virové infekce, tzn. od vstupu virionu do buňky přes replikaci v jádře až k tvorbě nových virionů, které jsou z buňky vyplavovány.

Léčiva by měla selektivně ovlivňovat virus a neměla by poškozovat metabolismus infikovaných buněk nebo ostatních zdravých buněk hostitelského organismu. Dostupná léčiva zasahují inhibičně do procesu množení virů. Virové geny, které pronikly do buněk a perzistují zde v klidovém stavu, nejsou ovlivnitelné.

Stejně jako u ostatních původců infekce se také u virů může vyvinout rezistence proti virostatikům.



##### Mechanismus účinku antivirových látek:

- zábrana penetrace viru do buňky a/nebo následného odpláštění (amantadin)
- selektivní inhibice enzymů, které jsou specifické pro virovou genomovou replikaci (virostatické antimetaboly: aciklovir, ganciklovir, zidovudin)
- inhibitory HIV – proteázy (indavir)
- inhibice translace virové mRNA (interferony)

#### Přirozené protivirové mechanismy:

- cytotoxické T-lymfocyty (rozpoznají a ničí buňky produkující viry)
- protilátky (neutralizují virus a brání v adsorpci na vnímavé buňky)
- interferony (druhově specifické glykoproteiny, které se uvolňují z buněk infikovaných virem a v sousedních buňkách potlačují translaci virové mRNA)

#### Imunoprophylaxe virových onemocnění:

aplikace vakcín = aktivní imunizace

aplikace imunního séra = pasivní imunizace

### **4. 6. 1. Antivirotika používaná k terapii herpetických onemocnění**

Herpetické viry obsahují dvojitou DNA kódující mimo jiné enzymy specifické pro virus, které jsou esenciální pro replikaci DNA a které mohou být využity jako cílová místa účinku antiherpetik.

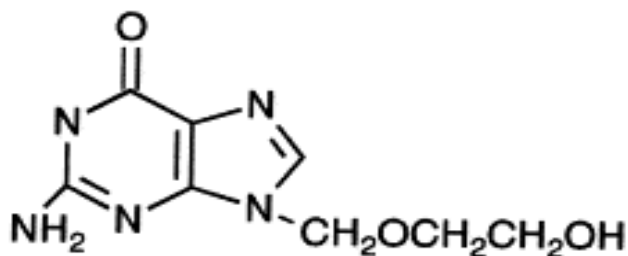
Nukleosidové analogy (antimetabolity) mají změněnou buď bázi, nebo cukerný (deoxyribózový) podíl. Trifosforylací se převádějí na aktivní formu. Pokud dojde k připojení antimetabolitu, který obsahuje nenormální fosforylovanou deoxyribózu (nemá k dispozici vazebné místo pro další prodloužení řetězce), inhibuje se syntéza nukleových kyselin<sup>31</sup>. Mezi zástupce patří aciklovir a jeho prolečivo valaciklovir, dále ganciklovir, penciklovir (používá se při léčbě infekcí vyvolaných aciklovir – rezistentními kmeny herpes labialis) a jeho p.o. forma famciklovir<sup>30</sup>.

Pokud je naproti tomu nenormální složkou báze (idoxuridin), je antimetabolit zabudován do řetězce DNA, která však nemůže fungovat jako matrice.

Dále dochází k inhibici enzymové aktivity, vyvolané falešnými substráty.

### **4. 6. 2. Aciklovir**

Obr. č. 3: Strukturální vzorec acikloviru



Aciklovir je syntetický analog guanosinu (2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-on), který se vyznačuje vysokým stupněm specifity a dobrou snášenlivostí, neboť prodělává bioaktivaci pouze v infikovaných buňkách, kde je konvertován na účinný trifosforylovaný derivát. První fosforylační krok umožňuje pouze thymidinkináza, která je kódována virem herpes simplex a varicella – zoster. Zbylé fosfátové skupiny jsou připojeny pomocí kináz hostitelské buňky. Aciklovir trifosfát nemůže vzhledem k polaritě prostoupit buněčnou membránou z buňky, hromadí se tedy uvnitř ní a stává se preferovaným substrátem virové DNA – polymerázy, čímž inhibuje její aktivitu (30 – 100krát více než polymerázu hostitelské buňky<sup>32 33</sup>. Pokud se inkorporuje do virové DNA, přerušuje tím syntézu řetězce<sup>32</sup>. Thymidinkináza zdravých, neinfikovaných buněk nevyužívá aciklovir jako substrát, proto je toxicita vůči lidským hostitelským buňkám nízká<sup>34</sup>.

### Farmakokinetika acikloviru

Pro každou ze tří hlavních aplikačních cest podání acikloviru (i. v., p. o., lokální) byly provedeny farmakokinetické studie, které umožnily určit vhodné dávkování. Mnoho údajů ohledně farmakokinetiky antivirových látek však stále ještě chybí. Je to způsobeno neustálým vývojem této skupiny léčiv.

Biologická dostupnost perorálně aplikovaného acikloviru je omezena (15% až 30%). Prostupnost acikloviru při topické aplikaci do hlouběji uložených tkání je ovlivněna zejména vlastnostmi pomocných látek a vehikula. Systematická absorpce při topické aplikaci nebyla detekována.

Nezanedbatelná intraokulární penetrace je prokázána po mnohočetné aplikaci 3% masti každých pět hodin.

Při léčbě vysokými dávkami intravenózně aplikovaným aciklovirem se léčivo hromadí v ledvinách, plicích, nervové tkáni, játrech a srdci. Léčivo přestupuje do tělních tekutin jako jsou sliny a slzy po perorální terapii, do cerebrospinální tekutiny a kožních vehikul po intravenózní terapii, také přes placentu a do mateřského mléka.

Aciklovir se vylučuje převážně ledvinami, a to jak glomerulární filtrací, tak tubulární sekrecí. V závislosti na očišťovací schopnosti ledvin až 80% z podané dávky léčiva je vyloučeno v nezměněné formě močí (zbývající 20% je přeměněno na neaktivní metabolity). Eliminační poločas u dospělých osob s normální renální funkcí je 2 až 3 hodiny. Změna v dávkování je pak vyžadována u pacientů v poslední fázi renálního onemocnění, kteří mají eliminační poločas prodloužen na 20 hodin

a vrchol plazmatické koncentrace se u nich zvyšuje přibližně dvakrát, stejně jako u dětí s nedostatečně vyvinutým renálním systémem<sup>35</sup>.

### Nežádoucí účinky při léčbě aciklovirem

Toxicita acikloviru je minimální. Při lokální aplikaci se může objevit svědění, pálení a kopřivka; po perorálním podání se objevuje gastrointestinální intolerance (nauzea, zvracení), po intravenózní aplikaci mohou vznikat flebitidy. Po vyšších dávkách se pak mohou vyskytnout centrální nežádoucí účinky jako tremor nebo halucinace.

Výsledky testů mutagenity in vitro a in vivo ukazují, že aciklovir u člověka nezpůsobuje genetické změny. V dlouhodobých studiích prováděných na potkanech a myších nebyla prokázána karcinogenita acikloviru. U potkanů, králíků ani u myší neměl aciklovir žádné embryotoxické ani teratogenní účinky<sup>36</sup>.

### Použití acikloviru

Aciklovir je velmi účinný při léčbě lehkých i těžkých infekcí, vyvolaných HSV typu 1 a 2 (keratokonjunktivitida, encefalitida, generalizované infekce) a infekcí, vyvolaných virem varicella–zoster (těžký pásový opar), méně pak proti viru Epstein – Barrové a výjimečně proti CMV<sup>37</sup>.

In vitro je aciklovir dobře účinný také proti HBV. Jeho rozpustnost a distribuce v játrech je však nízká, proto byla klinická aplikace acikloviru v léčbě hepatitidy B omezena. Z tohoto důvodu byl syntetizován konjugát dextranu s aciklovirem (Schiffova báze), který je 12krát rozpustnější než volný aciklovir a jeho distribuce v játrech je také vyšší<sup>38</sup>.

### Způsob podání acikloviru

Podávání je možné třemi způsoby. Intravenózně, lokálně i perorálně. Po perorálním podání však není absorpce ze střeva kompletní (biologická dostupnost je vylepšena u jeho derivátu - esteru s valinem - valacikloviru)<sup>39</sup>.

Intravenózně se podává profylakticky u sérologicky pozitivních pacientů při transplantaci kostní dřeně.

### Vliv acikloviru na inkubační dobu a recidivy

Experimentální testy in vivo odhalily, že aciklovir může zpomalit nástup inkubační doby, pokud je podán ve vysoké dávce a co nejdříve po naočkování virem. Pokud se však

začne s léčbou pozdě, tento efekt se ztratí. Nedávné studie na myších infikovaných HSV srovnávaly účinnost prekurzorů acikloviru a pencikloviru – valacikloviru a famcikloviru. Jako efektivnější se ukázal famciklovir, a to jak ve snížení hladiny infekčního viru na okrajových částech a uvnitř mozkového kmene, tak v prodlevě mezi naočkováním a započatím léčby (přičemž si zachovává svou účinnost). Klinické údaje, které se týkají účinnosti léčby aciklovirem na recidivy, jsou sporné. V případě famcikloviru nejsou podobné údaje dosud žádné.

Recidivy jsou způsobené reaktivací viru, usídleného v sensorických neuronech, které inervují místo primární infekce viru. Existuje velké množství stimulů, které mohou virus reaktivovat a vyvolat propuknutí nemoci. Uměle se reaktivace vyvolá např. UV – zářením, podrážděním nervů nebo hypertermickým stresem. Existuje velký výběr zvířecích modelů (tzv. myší model, model myšího ucha), které se využívají pro zkoumání jevů souvisejících s nástupem a udržováním inkubační doby na buněčné nebo molekulární úrovni a virové reaktivace.

#### Stanovení acikloviru v plazmě

Pro stanovení acikloviru v plazmě je možné použít více metod, např. radioimunoanalýzu (RIA), enzymově vázanou imunosorbentní analýzu (ELISA) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Ačkoliv se zdají být imunologické techniky citlivější, mají mnoho podstatných nevýhod, zahrnujících např. časovou náročnost (cca 24 hod), potřebnou k získání konečných kvantitativních výsledků, velký počet kroků v průběhu procesu a potřebu vyvinout antisérum nebo monoklonální protilátky. Z tohoto důvodu je obecně užívána technika HPLC, především ve zkoumání farmakokinetiky, stejně jako pro monitorování lékových hladin. Nicméně HPLC metody určují aciklovir s kvantitativním limitem koncentrace  $\geq 100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , ve farmakokinetickém výzkumu proto nejsou schopné stanovit aciklovir v plazmě po podání jednotlivé standardní dávky s dostačující citlivostí. Existují však HPLC metody se dvěma reverzními fázemi, u kterých se detekce provádí pomocí fluorescence a u nichž je kvantitativní limit od  $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  do  $30 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Ačkoliv farmakokinetika po požití tablet nebo roztoků s aciklovirem je dobře prozkoumána, pro výzkum farmakokinetiky acikloviru po jeho požití ve formě suspenze byla použita HPLC analýza se spektrofluorimetrickou detekcí, založenou na fluorescenci léčiva v kyselém prostředí<sup>39</sup>.

### Spektrofluorimetrická detekce acikloviru

Fluorescence acikloviru (FL ACV) je pravděpodobně způsobena protonací molekuly v kyselém prostředí. Nedávno byla úspěšně použita micelově vázaná fluorimetrická detekce acikloviru v biologickém materiálu spolu s metodou HPLC. Micelární medium nejen že zvýšilo fluorescenci acikloviru, ale také zajistilo dobré oddělení acikloviru od ostatních složek séra a zachovalo si optimální podmínky mobilní fáze. Zkoumal se také vliv různých činidel obsažených v mobilní fázi na fluorescenci acikloviru. Stejně jako vhodné standardy pro kvantitativní stanovení acikloviru pomocí nově vyvinuté techniky HPLC – FL. Mezi vhodné látky, zvyšující fluorescenci acikloviru patří např. dodecylsulfát sodný. Je to způsobeno vyšší viskozitou uvnitř micel ve srovnání s okolním prostředím. Zvýšená viskozita omezuje volný pohyb molekul, což umocňuje výsledný efekt. Osvědčilo se také použití anorganického pufru ve srovnání s organickým. Pro výraznější intenzitu fluorescence je také důležité kyselé prostředí (pH 1,5 – 2,5). Pro kvantitativní stanovení acikloviru je nezbytné použití vnitřního standardu. Pro tento případ byl zvolen adenosin, a to díky své struktuře, která se podobá acikloviru. Jeho excitace a emisní spektrum v kombinaci s dodecylsulfátem sodným v prostředí fosfátového pufru byly při 282 nm ( $\alpha_{ex}$ ) a 380 nm ( $\alpha_{em}$ )<sup>40</sup>.

### Léčivé přípravky s aciklovirem registrované v ČR<sup>30</sup>

- Aciklovir AL Krém drm. crm. 1x2 g/100 mg
- Acyclostad Galmed drm. crm. 1x5 g/250 mg
- Herpesin 200 (400) tbl. 25x250 (400) mg
- Herpesin 250 inj. sicc. 10x250 mg
- Herpesin krém crm. 1x2 (5) g 5%
- Provirsan tbl. 30x200 mg
- Ranvir 200 (400) tbl. 25x200 (400) mg
- Virolex crm. 1x5 g 50 mg/g
- Virolex inj. sicc. 5x250 mg
- Virolex tbl. 20x200 mg
- Virolex ung. opht. 1x4,5 g 3%
- Zovirax 200 (400) mg por. tbl. nob. 25x200 mg (70x400 mg)
- Zovirax drm. crm. 1x2 g/100 mg (tuba, pumpa)
- Zovirax ung. opht. 1x4,5 g



#### 4. 6. 3. Antivirotika používaná k terapii chřipkových onemocnění

Dědičnou informaci chřipkového viru tvoří 8 genů zapsaných do molekul ribonukleové kyseliny, které se neustále mění náhodnými mutacemi. Klíčové jsou 2 z nich. Jeden kóduje bílkovinu hemaglutinin (H), která slouží viru k pronikání do buňky hostitele, podle druhého se vyrábí enzym neuraminidáza (N), pomocí kterého se namnožený virus uvolní z infikované buňky. Vzájemné intenzivní kombinace těchto genů jsou typické pro chřipkové viry typu A, které putují mezi člověkem a některými druhy zvířat (např. prase, kuň, kachna, slepice). Řada nebezpečných virů, způsobujících smrtelné, vysoce nakažlivé onemocnění, vzniká spontánně, náhodnými změnami v genetické informaci a kombinací lidských a ptačích virů<sup>41</sup>.

Méně rozšířené jsou chřipkové viry B, málo nebezpečné jsou pak viry chřipky C.

K profylaxi a terapii chřipky typu A a B se používají selektivní inhibitory neuraminidázy: zanamivir (Relenza<sup>®</sup>) – inhalační aplikace, oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>) – p.o. podání a peramivir, u něhož byly studie zastaveny z důvodu injekční aplikace. Amantadin, který se tradičně používá k léčbě Parkinsonovy choroby, inhibuje replikaci viru tím, že brání odpláštění viru (*uncoating*) a uvolnění nukleové kyseliny. Jeho strukturním analogem je rimantadin<sup>31 41</sup>.

#### 4. 6. 4. Antivirotika používaná k terapii retrovirových infekcí

Používá se kombinovaná terapie, dva analogy nukleosidů s jedním inhibitorem proteázy (zidovudin, lamivudin, indavir). Žadná léčba není kurativní, často vzniká rezistence.

- Inhibitory reverzní transkriptázy (zidovudin, stavudin, nevirapin, efavirenz)
- Inhibitory HIV – proteáz (ritonavir, sakvinavir, indavir)<sup>31</sup>

## **5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **5. 1. Přístroje**

Analytické digitální váhy AND HR-120, A&D Company

Analytické digitální váhy AND HM-202, A&D Company

Biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha

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

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

Digitální potenciometr s pH metrem MV 870

Horkovzdušná sušárna HS 61

Spektrofotometr HELIOS GAMA (UV/VIS), Unicam

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10 P

### **5. 2. Suroviny**

Aceton p.a., (Penta Chrudim)

Aciklovir mikronizovaný (Pliva Lachema)

Azid sodný p.a., (Fluka)

Destilovaná voda (FaF UK Hradec Králové)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a., (Lachema Neratovice)

Kyselina citronová, ČL 97 (Lachema Neratovice)

Plastifikátory a modifikátory: Ethylsalicylát p.a., (Fluka)

Hexylsalicylát p.a., (Fluka)

Methylsalicylát p.a., (Fluka)

### **5. 3. Oligoesterový nosič**

Byl použit oligoesterový nosič syntetizovaný na katedře farmaceutické technologie FaF UK, pracovně označený 5M. Jeho charakteristiky uvádí tabulka č. 1.

Tab.1: Charakterizace terpolymeru kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a mannitolu (LA/GA/M)

Označení polymeru	Poměr LA/GA/M (%)	$M_n$	$M_w$	$M_w/M_n$
5M	47,5/47,5/5,0	1600	2200	1,36

$M_n$  ..... číselně střední molekulová hmotnost

$M_w$  ..... hmotnostně střední molekulová hmotnost

$M_w/M_n$  ..... stupeň polydisperzity

## 5. 4. Pracovní postup

### 5. 4. 1. Příprava pufru o pH 6,0

Pro uvolňování acikloviru z matric byl stejně jako v Diplomové práci zvolen fosfát citrátový pufr o pH 6,0. Pufr byl připraven podle chemických tabulek <sup>42</sup>. Bylo připraveno 5000 ml pufru o pH 6,0 smísením roztoku A a roztoku B. Roztok A vznikl rozpuštěním 39,29 g monohydrátu kyseliny citronové v 1870 ml destilované vody. Roztok B rozpuštěním 224,23 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného v 3130 ml destilované vody. Jako antimikrobní přísada byl přidán 1,0 g azidu sodného (jeho výsledná koncentrace byla 0,02%) . Hodnota pH byla zkontrolována digitálním pH metrem a odchylky upraveny malým přidavkem kyseliny citronové nebo hydrogenfosforečnanu disodného.

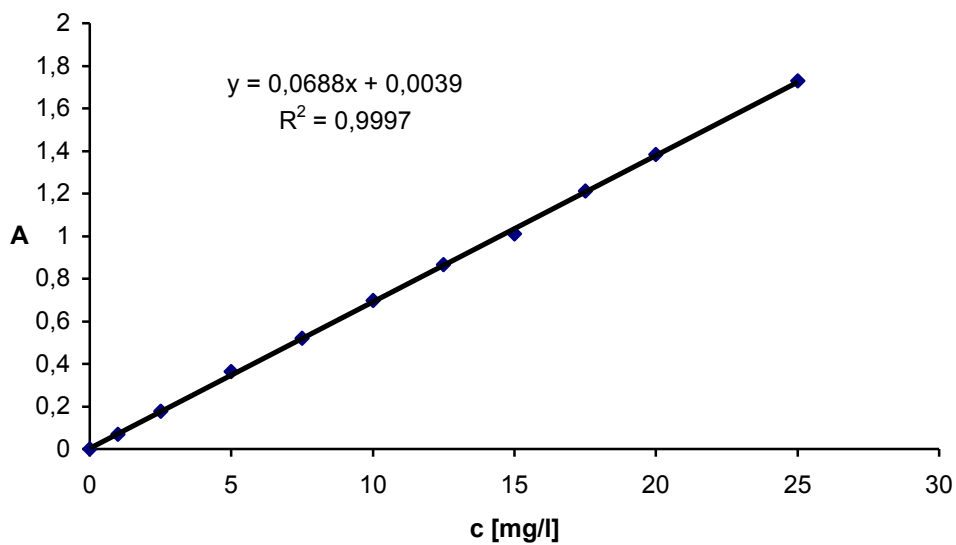
### 5. 4. 2. Kalibrační přímka

Bylo připraveno deset roztoků o klesající koncentraci acikloviru (25 mg/l – 1 mg/l). Po úplném rozpuštění acikloviru pomocí ultrazvukové lázně byla měřena jejich absorbance na spektrofotometru proti fosfát citrátovému pufru. Absorpční maximum acikloviru ve fosfát citrátovém pufru pH 6,0 je při 256 nm. Tato vlnová délka byla používána během celého studia. Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační přímka, zjištěna její rovnice a hodnota korelačního koeficientu .

Tab. 2: Absorbance roztoků acikloviru o klesající koncentraci

Koncentrace roztoku acikloviru (mg/l)	Absorbance A
25	1,728
20	1,384
17,5	1,212
15	1,011
12,5	0,865
10	0,698
7,5	0,519
5	0,363
2,5	0,176
1	0,069

Obr. 3: Kalibrační přímka



Rovnice kalibrační křivky:  $y = a \cdot x + b$   
 y .....absorbance  
 x .....koncentrace acikloviru (mg/l)  
 a .....směrnice kalibrační přímky  
 b .....absolutní člen  
 R .....korelační koeficient

### 5. 4. 3. Příprava matric

Byly připraveny 3 série matric o hmotnosti 150,0 mg tvořené nosičem 5M, aciklovirem (ACV), jehož koncentrace byla ve všech vzorcích 4% (6 mg acikloviru). Jve funkci plastifikátoru byly použity methyalsalicylát (1. série), ethylsalicylát (2. série) a hexylsalicylát (3. série). Předpokládala se příprava vzorků s různou koncentrací plastifikátorů (10% - 60%) podobně, jako tomu bylo v diplomové práci. Při přípravě matric však došlo k nepředvídatelným komplikacím, které způsobila omezená mísitelnost polymeru s plastifikátorem. První série byla tvořena matricemi s koncentrací MS 10% - 30%, druhá série matricemi s koncentrací MS 10%-50% a třetí série matricemi s koncentrací HS 10%-30%. Každá matrice daného složení byla připravena duplicitně, navíc byly připraveny placebo matrice (bez léčivé látky).

Pro přípravu každé trojice matric (2 vzorky s aciklovirem + placebo) byl do kádinky navážen oligoester a plastifikátor (celkově asi 1g). Po roztavení v horkovzdušné sušárně a důkladné homogenizaci, bylo do scintilační lahvičky odváženo přibližně 150,0 mg polymeru plastifikovaného daným typem a koncentrací plastifikátoru. Tento první placebo vzorek neobsahoval žádnou léčivou látkou. Poté bylo do zbylého množství dováženo vypočtené množství acikloviru tak, aby tvořilo 4% polymerní směsi, a do dvou scintilačních lahviček odváženo vždy 150 mg této zhomogenizované směsi.

Tímto způsobem byly připraveny 3 série vzorků, které byly přelity 15,0 ml fosfát citrátového pufru pH 6,0. Scintilační lahvičky byly umístěny do termostatu o teplotě 37 °C. Ve stanovených časových intervalech byly odebírány vzorky disoluční tekutiny a měřena absorbance proti fosfát citrátovému pufru a proti placebo při vlnové délce 256 nm.

### 5. 4. 4. Výpočet uvolněného acikloviru

Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace uvolněného acikloviru v mg/l ( $x_1$ ). Vypočtená koncentrace mg/l byla převedena na koncentraci ACV v 15 ml disoluční tekutiny ( $x_2$ ). Byl zjištěn procentuální podíl uvolněného ACV ( $x_0$ ) z celkového množství ACV v matrici. V průběhu liberace byly počítána kumulativní procenta uvolněného ACV.

$$x_1 = \frac{y - 0,0039}{0,0688}$$

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

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

$x_1$ ..... množství uvolněného ACV (mg/l)

$x_2$ ..... množství uvolněného ACV (mg/15 ml)

$x\%$  ..... procentuální podíl uvolněného ACV

$y$  ..... hodnota naměřené absorbance

$z$  ..... množství ACV v matrici

$D$  ..... ředění vzorku

## 6. VÝSLEDKY

### 6. 1. Tabulky

Tab. č. 3: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 10% MS – měřeno proti pufru

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,283	1	0,061	1,00	0,83	0,83
	0,186	1	0,039	0,65		
0,25	0,392	1	0,084	1,40	1,82	2,65
	0,623	1	0,135	2,24		
1	0,368	10	0,791	13,14	10,21	12,86
	0,207	10	0,439	7,28		
2	0,134	20	0,558	9,26	8,64	21,50
	0,117	20	0,484	8,02		
3	0,255	10	0,544	9,03	7,46	28,96
	0,169	10	0,356	5,90		
4	0,209	10	0,443	7,36	6,81	35,77
	0,179	10	0,378	6,26		
5	0,273	10	0,583	9,68	7,86	43,64
	0,173	10	0,364	6,04		
6	0,265	10	0,566	9,39	9,79	53,43
	0,287	10	0,614	10,19		
7	0,380	5	0,409	6,79	7,08	60,51
	0,413	5	0,445	7,38		
8	0,167	10	0,351	5,83	6,76	67,27
	0,218	10	0,463	7,68		
9	0,322	10	0,691	11,47	10,64	77,91
	0,277	10	0,592	9,82		
10	0,321	5	0,344	5,71	5,46	83,37
	0,293	5	0,314	5,20		
11	0,788	5	0,856	14,20	11,65	95,02
	0,508	5	0,549	9,11		
14	0,678	5	0,735	12,20	12,79	107,81
	0,743	5	0,806	13,38		
16	0,252	5	0,269	4,46	4,65	112,46
	0,273	5	0,292	4,84		

Tab. č. 4: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 10% MS – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,185	1	0,039	0,65	0,47	0,47
	0,087	1	0,018	0,29		
0,25	0,174	1	0,037	0,61	1,02	1,49
	0,403	1	0,087	1,44		
1	0,330	10	0,708	11,76	8,79	10,29
	0,167	10	0,351	5,83		
2	0,113	20	0,466	7,74	7,15	17,44
	0,097	20	0,396	6,57		
3	0,185	10	0,391	6,49	4,87	22,30
	0,096	10	0,196	3,25		
4	0,172	10	0,362	6,01	5,45	27,75
	0,141	10	0,294	4,88		
5	0,252	10	0,537	8,92	7,12	34,87
	0,153	10	0,321	5,32		
6	0,248	10	0,529	8,78	9,15	44,02
	0,269	10	0,575	9,53		
7	0,348	5	0,374	6,21	6,51	50,54
	0,382	5	0,411	6,82		
8	0,157	10	0,329	5,47	6,39	56,93
	0,208	10	0,441	7,32		
9	0,164	10	0,345	5,72	6,21	63,14
	0,191	10	0,404	6,70		
10	0,162	5	0,170	2,82	2,48	65,62
	0,124	5	0,129	2,13		
11	0,322	5	0,345	5,73	5,29	70,90
	0,273	5	0,292	4,84		
14	0,493	5	0,533	8,83	9,53	80,44
	0,570	5	0,617	10,23		
16	0,225	5	0,239	3,97	4,16	84,59
	0,246	5	0,262	4,35		



Tab. č. 5: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 20% MS – měřeno proti pufru

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,844	1	0,183	3,04	2,24	2,24
	0,405	1	0,087	1,45		
0,25	0,392	10	0,844	14,01	10,41	12,65
	0,194	10	0,410	6,81		
1	0,723	10	1,569	26,04	22,56	35,22
	0,532	10	1,151	19,09		
2	0,182	20	0,768	12,75	13,29	48,51
	0,197	20	0,834	13,83		
3	0,276	10	0,590	9,79	10,88	59,39
	0,336	10	0,721	11,97		
4	0,231	10	0,491	8,16	7,72	67,11
	0,207	10	0,439	7,28		
5	0,294	5	0,315	5,21	5,25	72,35
	0,297	5	0,318	5,28		
6	1,000	1	0,218	3,61	4,43	76,79
	0,296	5	0,317	5,26		
7	0,784	1	0,170	2,83	3,00	79,78
	0,878	1	0,191	3,17		
8	0,783	1	0,170	2,82	3,20	82,98
	0,990	1	0,215	3,57		
9	0,168	10	0,353	5,86	5,19	88,17
	0,131	10	0,272	4,53		
10	0,171	5	0,180	2,99	2,81	90,99
	0,152	5	0,159	2,64		
11	0,293	5	0,314	5,21	4,78	95,76
	0,246	5	0,262	4,35		
14	0,457	5	0,493	8,19	7,74	103,50
	0,408	5	0,439	7,29		
16	0,242	5	0,258	4,28	4,51	108,01
	0,268	5	0,286	4,75		
21	0,231	5	0,246	4,08	4,30	112,32
	0,256	5	0,273	4,53		

Tab. č. 6: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 20% MS – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,548	1	0,119	1,96	1,15	1,15
	0,101	1	0,021	0,34		
0,25	0,355	10	0,763	12,66	9,06	10,22
	0,157	10	0,329	5,46		
1	0,709	10	1,538	25,53	21,95	32,16
	0,512	10	1,107	18,36		
2	0,146	20	0,611	10,13	10,57	42,73
	0,158	20	0,663	11,00		
3	0,202	10	0,428	7,10	8,19	50,92
	0,262	10	0,559	9,28		
4	0,170	10	0,358	5,94	5,48	56,41
	0,145	10	0,303	5,03		
5	0,225	5	0,239	3,97	4,00	60,40
	0,228	5	0,242	4,02		
6	0,712	1	0,154	2,56	3,38	63,78
	0,238	5	0,253	4,21		
7	0,490	1	0,106	1,76	1,93	65,72
	0,586	1	0,127	2,10		
8	0,575	1	0,124	2,07	2,44	68,16
	0,782	1	0,170	2,82		
9	0,874	1	0,190	3,15	2,53	70,69
	0,532	1	0,115	1,91		
10	0,291	1	0,062	1,03	0,88	71,57
	0,209	1	0,044	0,74		
11	0,096	5	0,098	1,62	1,33	72,90
	0,064	5	0,063	1,04		
14	0,158	5	0,166	2,75	2,57	75,47
	0,138	5	0,144	2,39		
16	0,186	5	0,196	3,26	3,50	78,98
	0,213	5	0,226	3,75		
21	0,202	5	0,214	3,55	3,78	82,75
	0,227	5	0,241	4,00		

Tab. č. 7: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 30% MS – měreno proti pufu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,615	10	1,332	22,31	20,22	20,22
	0,502	10	1,085	18,13		
0,25	0,875	10	1,902	31,57	32,19	52,41
	0,910	10	1,978	32,82		
1	0,888	10	1,930	32,04	28,31	80,72
	0,683	10	1,481	24,57		
2	0,729	10	1,582	26,26	28,96	109,67
	0,878	10	1,908	31,66		
3	0,102	10	0,209	3,47	3,58	113,25
	0,108	10	0,222	3,68		
4	0,923	1	0,201	3,33	3,47	116,72
	1,000	1	0,218	3,61		
5	0,672	1	0,146	2,44	2,74	119,46
	0,840	1	0,182	3,05		
6	0,598	1	0,130	2,15	2,12	121,58
	0,582	1	0,126	2,09		
7	0,509	1	0,110	1,83	1,73	123,32
	0,459	1	0,099	1,64		
8	0,418	1	0,090	1,50	1,36	124,68
	0,343	1	0,074	1,22		
9	0,338	1	0,073	1,20	1,14	125,82
	0,302	1	0,065	1,07		
10	0,291	1	0,062	1,03	0,94	126,76
	0,241	1	0,051	0,85		
11	0,203	5	0,215	3,57	3,41	130,16
	0,185	5	0,195	3,24		
14	0,310	1	0,066	1,10	1,02	131,19
	0,265	1	0,057	0,94		
16	0,488	1	0,105	1,75	1,46	132,65
	0,331	1	0,071	1,18		
21	0,342	1	0,073	1,22	0,96	133,61
	0,202	1	0,043	0,71		

Tab. č. 8: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 30% MS – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,579	10	1,253	20,99	18,77	18,77
	0,459	10	0,991	16,56		
0,25	0,828	10	1,799	29,86	30,48	49,26
	0,863	10	1,875	31,11		
1	0,855	10	1,858	30,84	27,03	76,29
	0,646	10	1,400	23,23		
2	0,219	10	0,465	7,72	9,72	86,01
	0,329	10	0,706	11,71		
5	0,084	1	0,017	0,28	0,58	86,34
	0,250	1	0,053	0,88		

Pzn. Hodnoty naměřené v dalších dnech nejsou uvedeny, neboť absorbance zjištěná u placebo matric byla vyšší než u testovaného vzorku s léčivem.

Tab. č.9: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 10% ES - měřeno proti puftru

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,304	1	0,065	1,09	0,90	0,90
	0,200	1	0,042	0,71		
0,25	0,410	1	0,088	1,47	2,09	2,99
	0,750	1	0,163	2,71		
1	0,180	10	0,380	6,33	11,15	14,14
	0,444	10	0,958	15,97		
2	0,261	10	0,557	9,28	9,80	23,94
	0,289	10	0,618	10,31		
3	0,278	10	0,594	9,91	8,87	32,81
	0,221	10	0,469	7,83		
4	0,265	10	0,566	9,43	9,42	42,22
	0,264	10	0,564	9,40		
5	0,303	10	0,649	10,82	10,04	52,26
	0,260	10	0,555	9,25		
6	0,343	10	0,737	12,28	10,40	62,66
	0,240	10	0,511	8,52		
7	0,241	10	0,513	8,55	8,06	70,72
	0,214	10	0,454	7,57		
11	0,890	10	1,934	32,24	28,34	99,07
	0,676	10	1,466	24,45		
18	0,614	5	0,665	11,08	9,37	108,44
	0,426	5	0,459	7,66		
25	0,721	1	0,156	2,61	2,21	110,65
	0,503	1	0,109	1,81		

Tab. č. 10: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 10% ES – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,117	1	0,024	0,40	0,20	0,20
	0,007	1	0,000	0,00		
0,25	0,289	1	0,062	1,03	1,65	1,85
	0,626	1	0,136	2,26		
1	0,158	10	0,332	5,53	10,28	12,12
	0,418	10	0,901	15,02		
2	0,221	10	0,470	7,83	8,56	20,68
	0,261	10	0,557	9,29		
3	0,257	10	0,548	9,14	8,12	28,80
	0,201	10	0,426	7,10		
4	0,237	10	0,505	8,41	8,38	37,18
	0,235	10	0,500	8,34		
5	0,266	10	0,568	9,47	8,74	45,92
	0,226	10	0,480	8,01		
6	0,302	10	0,647	10,78	8,92	54,84
	0,200	10	0,424	7,06		
7	0,215	10	0,456	7,61	7,12	61,95
	0,188	10	0,397	6,62		
11	0,848	10	1,842	30,71	26,79	88,75
	0,633	10	1,372	22,88		
18	0,560	5	0,606	10,10	8,39	97,13
	0,372	5	0,400	6,67		
25	0,443	1	0,096	1,59	1,19	98,33
	0,224	1	0,048	0,79		

Tab. č. 11: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 20% ES – měreno proti pufu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,498	5	0,538	8,95	8,05	8,05
	0,203	10	0,430	7,15		
0,25	0,637	5	0,690	11,50	7,49	15,55
	0,102	10	0,209	3,48		
1	0,821	10	1,783	29,72	38,25	53,79
	0,647	20	2,805	46,78		
2	0,808	10	1,755	29,25	29,17	82,96
	0,803	10	1,744	29,09		
3	0,324	10	0,695	11,58	7,49	90,45
	0,938	1	0,204	3,40		
4	0,267	10	0,570	9,50	5,72	96,18
	0,539	1	0,117	1,94		
5	0,769	1	0,167	2,78	2,41	98,59
	0,566	1	0,122	2,04		
6	0,482	1	0,104	1,74	1,38	99,96
	0,287	1	0,061	1,02		
11	0,730	1	0,158	2,64	2,08	102,05
	0,423	1	0,091	1,52		

Tab. č. 12: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 20% ES – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,225	5	0,239	3,98	8,86	8,86
	0,761	5	0,826	13,74		
0,25	0,577	5	0,625	10,41	13,48	22,34
	0,913	5	0,992	16,55		
1	0,797	10	1,731	28,85	37,01	59,35
	0,625	20	2,708	45,17		
2	0,767	10	1,665	27,75	27,56	86,91
	0,756	10	1,641	27,37		
3	0,300	10	0,642	10,71	6,59	93,50
	0,684	1	0,148	2,47		
4	0,229	10	0,487	8,12	4,32	97,82
	0,149	1	0,031	0,52		
5	0,401	1	0,086	1,44	1,07	98,88
	0,196	1	0,041	0,69		
6	0,175	1	0,037	0,61	0,26	99,14
	-0,019	1	-0,006	-0,09		
11	0,350	1	0,075	1,25	0,68	99,82
	0,035	1	0,006	0,10		



Tab. č. 13: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 30% ES – měřeno proti puftru

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,307	10	0,658	11,02	11,12	11,12
	0,316	10	0,678	11,22		
0,25	0,570	10	1,234	20,56	22,72	33,85
	0,688	10	1,492	24,89		
1	0,508	20	2,196	36,60	37,49	71,33
	0,532	20	2,301	38,38		
2	0,607	10	1,315	21,91	16,90	88,23
	0,332	10	0,713	11,88		
3	0,531	2	0,230	3,83	4,46	92,69
	0,703	2	0,305	5,09		
4	0,593	1	0,128	2,14	2,40	95,09
	0,734	1	0,159	2,66		
5	0,580	1	0,126	2,10	2,57	97,66
	0,844	1	0,183	3,04		
6	0,380	1	0,082	1,36	1,61	99,27
	0,516	1	0,112	1,86		
11	0,471	1	0,102	1,69	1,84	101,11
	0,550	1	0,119	1,98		

Tab. č. 14: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 30% ES - měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,265	10	0,566	9,48	9,66	9,66
	0,278	10	0,594	9,85		
0,25	0,539	10	1,166	19,43	21,50	31,16
	0,652	10	1,413	23,57		
1	0,495	20	2,139	35,65	36,25	67,41
	0,511	20	2,209	36,84		
2	0,537	10	1,161	19,36	14,29	81,70
	0,259	10	0,553	9,22		
3	0,795	1	0,173	2,88	3,35	85,05
	0,531	2	0,230	3,83		
4	0,228	1	0,048	0,81	1,06	86,11
	0,367	1	0,079	1,32		
5	0,064	1	0,013	0,21	0,70	86,81
	0,330	1	0,071	1,18		
6	0,080	1	0,016	0,27	0,49	87,29
	0,200	1	0,042	0,70		
11	0,089	1	0,018	0,30	0,43	87,72
	0,160	1	0,034	0,56		

Tab. č. 15: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 40% ES – měřeno proti puftru

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,256	10	0,546	9,15	8,94	8,94
	0,247	10	0,526	8,72		
0,25	0,641	10	1,389	23,15	23,95	32,88
	0,684	10	1,483	24,74		
1	0,577	20	2,498	41,64	43,37	76,25
	0,624	20	2,704	45,10		
2	0,306	10	0,656	10,93	9,65	85,90
	0,236	10	0,502	8,38		
3	0,603	1	0,131	2,18	2,16	88,06
	0,596	1	0,129	2,15		
4	0,565	1	0,122	2,04	2,38	90,44
	0,750	1	0,163	2,71		
5	0,500	1	0,108	1,81	2,14	92,59
	0,690	1	0,150	2,48		
6	0,456	1	0,098	1,64	1,97	94,55
	0,634	1	0,137	2,29		
11	0,500	1	0,108	1,80	1,98	96,54
	0,600	1	0,130	2,17		

Tab. č. 16: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 40% ES – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,181	10	0,382	6,40	6,31	6,31
	0,178	10	0,375	6,22		
0,25	0,571	10	1,236	20,60	21,37	27,68
	0,613	10	1,328	22,15		
1	0,540	20	2,336	38,93	40,85	68,53
	0,592	20	2,564	42,76		
2	0,216	10	0,459	7,64	6,26	74,78
	0,140	10	0,292	4,87		
3	0,021	1	0,003	0,05	0,04	74,82
	0,012	1	0,001	0,02		
4	0,085	1	0,017	0,29	0,30	75,12
	0,092	1	0,019	0,31		
5	0,049	1	0,009	0,15	0,31	75,43
	0,135	1	0,028	0,47		
6	-0,019	1	-0,006	-0,09	0,21	75,64
	0,150	1	0,031	0,52		
11	0,144	1	0,030	0,50	0,67	76,31
	0,234	1	0,050	0,83		

Tab. č. 17: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 50% ES – měřeno proti pufu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,478	10	1,032	17,30	16,58	16,58
	0,444	10	0,958	15,87		
0,25	0,838	10	1,821	30,34	30,86	47,45
	0,866	10	1,882	31,39		
1	0,631	20	2,735	45,58	47,02	94,46
	0,670	20	2,905	48,46		
2	0,183	10	0,386	6,44	6,18	100,65
	0,169	10	0,356	5,93		
3	0,884	1	0,192	3,20	2,86	103,50
	0,694	1	0,151	2,51		
4	0,665	1	0,144	2,40	2,61	106,12
	0,779	1	0,169	2,82		
5	0,493	1	0,107	1,78	2,08	108,20
	0,662	1	0,144	2,39		
6	0,344	1	0,074	1,24	1,66	109,86
	0,579	1	0,125	2,08		

Tab. č. 18: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 50% ES – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,383	10	0,824	13,81	13,03	13,03
	0,344	10	0,739	12,24		
0,25	0,771	10	1,674	27,90	28,36	41,39
	0,796	10	1,729	28,83		
1	0,580	20	2,511	41,85	43,29	84,68
	0,619	20	2,682	44,73		
2	0,109	10	0,224	3,74	3,43	88,11
	0,092	10	0,187	3,12		
3	0,372	1	0,080	1,33	1,00	89,11
	0,190	1	0,040	0,67		
4	0,189	1	0,040	0,67	0,87	89,98
	0,300	1	0,064	1,07		
5	0,095	1	0,019	0,32	0,63	90,61
	0,264	1	0,056	0,94		
6	0,054	1	0,010	0,17	0,59	91,20
	0,283	1	0,061	1,00		

Tab. č. 19: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 10% HS – měřeno proti pufro

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,159	1	0,033	0,55	0,46	0,46
	0,113	1	0,023	0,38		
0,25	0,105	1	0,022	0,35	0,51	0,97
	0,191	1	0,040	0,66		
1	0,231	5	0,246	4,02	4,18	5,15
	0,248	5	0,264	4,34		
2	0,291	5	0,311	5,10	5,11	10,27
	0,292	5	0,312	5,13		
3	0,148	10	0,310	5,07	5,06	15,32
	0,147	10	0,307	5,05		
4	0,151	10	0,316	5,18	5,20	20,53
	0,152	10	0,318	5,23		
5	0,146	10	0,305	5,00	5,36	25,89
	0,166	10	0,349	5,73		
6	0,128	10	0,266	4,35	5,33	31,22
	0,182	10	0,384	6,30		
7	0,388	5	0,418	6,84	8,05	39,27
	0,522	5	0,564	9,26		
8	0,545	5	0,589	9,65	8,06	47,32
	0,366	5	0,394	6,46		
9	0,761	5	0,826	13,56	12,06	59,38
	0,594	5	0,643	10,56		
12	0,996	5	1,083	17,78	15,09	74,47
	0,696	5	0,755	12,39		
15	0,321	5	0,344	5,65	5,16	79,62
	0,266	5	0,284	4,66		

Tab. č. 20: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 10% HS – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,117	1	0,024	0,40	0,31	0,31
	0,069	1	0,014	0,22		
0,25	0,080	1	0,016	0,26	0,41	0,72
	0,163	1	0,034	0,56		
1	0,181	5	0,191	3,13	3,29	4,01
	0,199	5	0,211	3,46		
2	0,264	5	0,282	4,61	4,64	8,65
	0,266	5	0,284	4,66		
3	0,137	10	0,286	4,67	4,63	13,28
	0,134	10	0,279	4,58		
4	0,148	10	0,310	5,07	5,08	18,36
	0,148	10	0,310	5,08		
5	0,143	10	0,299	4,89	5,26	23,61
	0,163	10	0,342	5,62		
6	0,126	10	0,261	4,28	5,27	28,89
	0,181	10	0,382	6,27		
7	0,474	3	0,307	5,03	5,93	34,82
	0,641	3	0,417	6,84		
8	0,389	5	0,419	6,85	5,04	39,86
	0,186	5	0,196	3,22		
9	0,668	5	0,724	11,86	10,16	46,73
	0,478	5	0,516	8,47		
12	0,806	5	0,875	14,33	12,81	59,54
	0,635	5	0,688	11,29		
15	0,312	5	0,334	5,47	5,03	67,87
	0,262	5	0,280	4,59		

Tab. č. 21: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 20% HS – měřeno proti pufro

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,133	1	0,028	0,46	0,57	0,57
	0,198	1	0,042	0,69		
0,25	0,155	1	0,032	0,53	0,44	1,02
	0,106	1	0,022	0,36		
1	0,319	1	0,068	1,12	1,20	2,22
	0,364	1	0,078	1,28		
2	0,352	1	0,076	1,24	1,40	3,62
	0,440	1	0,095	1,56		
3	0,270	1	0,058	0,94	1,28	4,90
	0,456	1	0,098	1,62		
4	0,442	1	0,095	1,56	1,78	6,67
	0,560	1	0,121	1,99		
5	0,657	1	0,142	2,35	2,67	9,34
	0,839	1	0,182	2,99		
6	0,170	10	0,358	5,86	5,38	14,72
	0,143	10	0,299	4,90		
7	0,644	3	0,419	6,86	6,79	21,51
	0,630	3	0,410	6,72		
8	0,325	5	0,349	5,74	6,78	28,29
	0,442	5	0,477	7,82		
9	0,455	5	0,491	8,04	7,22	35,51
	0,363	5	0,390	6,41		
12	0,570	10	1,234	20,20	21,11	56,61
	0,619	10	1,341	22,01		
15	0,285	5	0,305	4,99	4,72	61,33
	0,254	5	0,271	4,45		



Tab. č. 22: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 20% HS – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,102	1	0,021	0,34	0,45	0,45
	0,162	1	0,034	0,56		
0,25	0,094	1	0,019	0,31	0,22	0,67
	0,043	1	0,008	0,13		
1	0,282	1	0,060	0,99	1,09	1,76
	0,336	1	0,072	1,18		
2	0,328	1	0,070	1,15	1,31	3,07
	0,415	1	0,089	1,47		
3	0,200	1	0,042	0,69	1,03	4,10
	0,386	1	0,083	1,36		
4	0,407	1	0,088	1,44	1,64	5,74
	0,520	1	0,112	1,85		
5	0,586	1	0,127	2,08	2,40	8,14
	0,766	1	0,166	2,73		
6	0,165	10	0,347	5,71	5,18	13,32
	0,136	10	0,283	4,65		
7	0,595	3	0,387	6,33	6,06	19,38
	0,544	3	0,353	5,80		
8	0,250	5	0,266	4,36	4,57	23,95
	0,272	5	0,291	4,77		
9	0,234	5	0,249	4,08	4,06	28,01
	0,232	5	0,247	4,05		
12	0,401	10	0,864	14,22	15,27	43,28
	0,461	10	0,995	16,31		
15	0,280	5	0,299	4,90	4,62	47,90
	0,248	5	0,264	4,34		

Tab. č. 23: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 30% HS – měřeno proti pufro

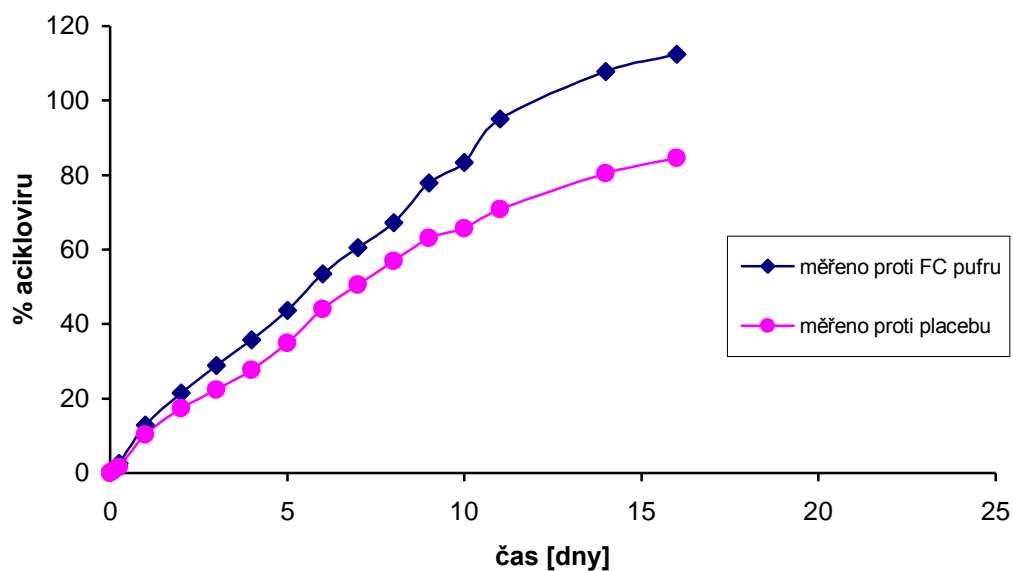
čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,265	1	0,057	0,93	0,97	0,97
	0,286	1	0,061	1,02		
0,25	0,222	1	0,047	0,77	0,72	1,69
	0,190	1	0,040	0,66		
1	0,161	5	0,169	2,77	2,92	4,61
	0,178	5	0,188	3,08		
2	0,170	5	0,179	2,93	3,74	8,35
	0,260	5	0,277	4,55		
3	0,544	1	0,118	1,93	2,13	10,49
	0,658	1	0,143	2,34		
4	0,692	1	0,150	2,46	2,67	13,16
	0,808	1	0,175	2,88		
5	0,142	10	0,296	4,87	5,08	18,24
	0,152	10	0,318	5,29		
6	0,265	10	0,566	9,26	9,94	28,18
	0,302	10	0,647	10,62		
7	0,867	10	1,884	30,85	25,26	53,44
	0,554	10	1,199	19,68		
8	0,737	5	0,800	13,14	12,07	65,51
	0,612	5	0,663	11,00		
9	0,857	5	0,931	15,24	14,83	80,35
	0,809	5	0,879	14,42		
12	0,559	5	0,605	9,90	11,81	92,16
	0,770	5	0,836	13,72		
15	0,694	1	0,151	2,46	2,93	95,09
	0,954	1	0,207	3,41		

Tab. č. 24: Liberace acikloviru z nosiče plastifikovaného 30% HS – měřeno proti placebu

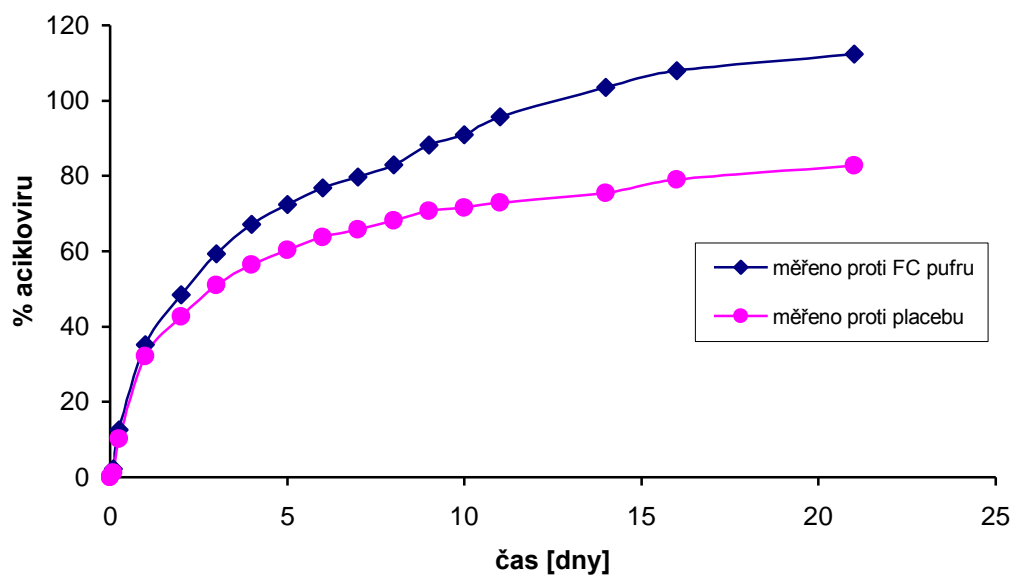
čas	A	ředění	ACV [mg]	ACV[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,227	1	0,048	0,79	0,82	0,82
	0,242	1	0,052	0,86		
0,25	0,193	1	0,041	0,67	0,61	1,43
	0,158	1	0,033	0,54		
1	0,120	5	0,124	2,03	2,17	3,60
	0,135	5	0,141	2,31		
2	0,133	5	0,138	2,27	3,04	6,64
	0,219	5	0,233	3,82		
3	0,518	1	0,112	1,83	2,04	8,69
	0,633	1	0,137	2,25		
4	0,660	1	0,143	2,34	2,55	11,24
	0,774	1	0,168	2,76		
5	0,135	10	0,281	4,60	4,81	16,04
	0,146	10	0,305	5,01		
6	0,245	10	0,522	8,58	9,24	25,28
	0,279	10	0,596	9,90		
7	0,851	10	1,849	30,27	24,79	50,08
	0,544	10	1,177	19,32		
8	0,596	5	0,645	10,57	9,52	59,60
	0,478	5	0,516	8,47		
9	0,270	5	0,288	4,72	5,53	65,12
	0,359	5	0,386	6,33		
12	0,403	5	0,434	7,13	9,51	74,64
	0,661	5	0,716	11,89		
15	0,667	1	0,145	2,37	2,83	77,47
	0,925	1	0,201	3,30		

## 6. 2. Grafy

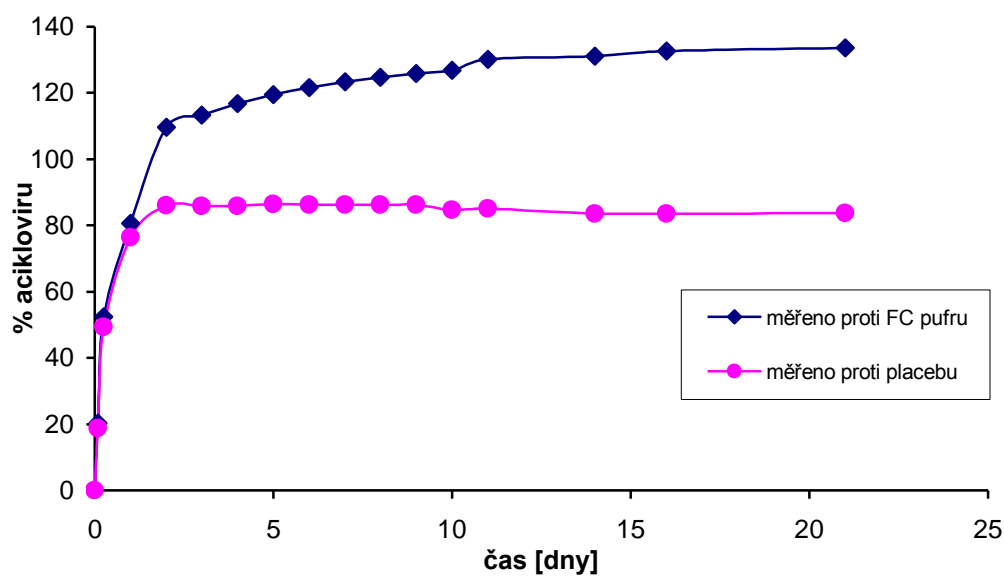
Obr. 4: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 10% MS



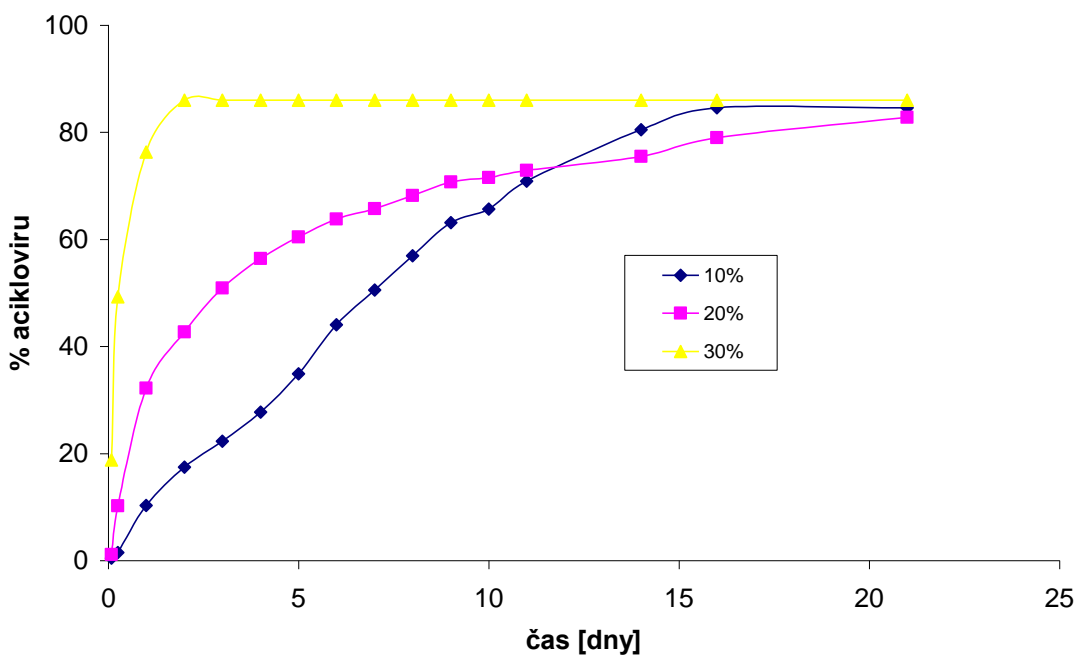
Obr. 5: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 20% MS



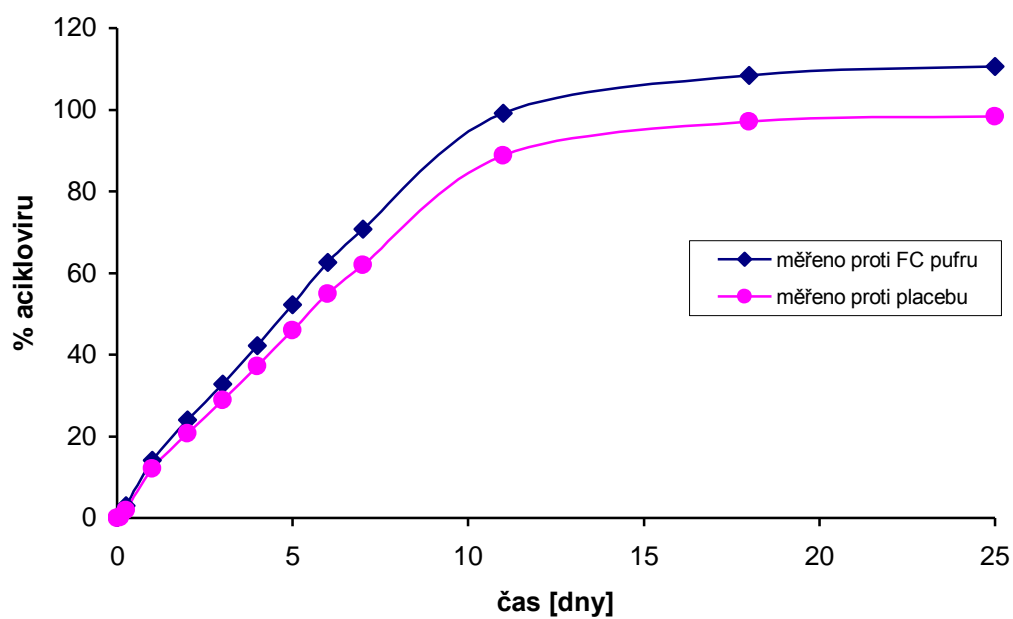
Obr. 6: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 30% MS



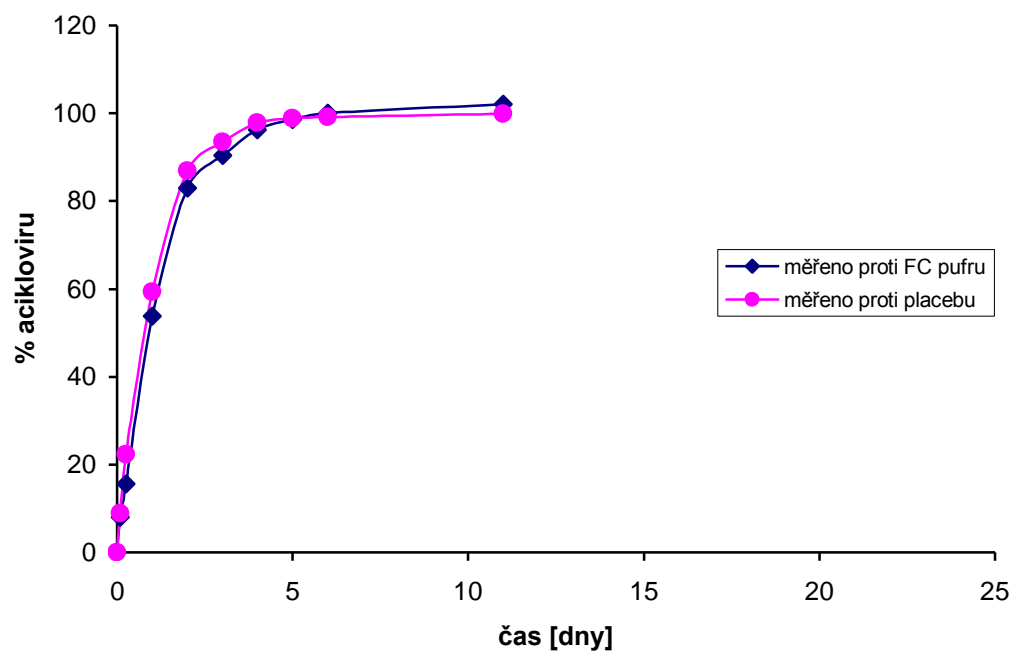
Obr.7: Vliv koncentrace methyalsalicylátu na liberaci acikloviru



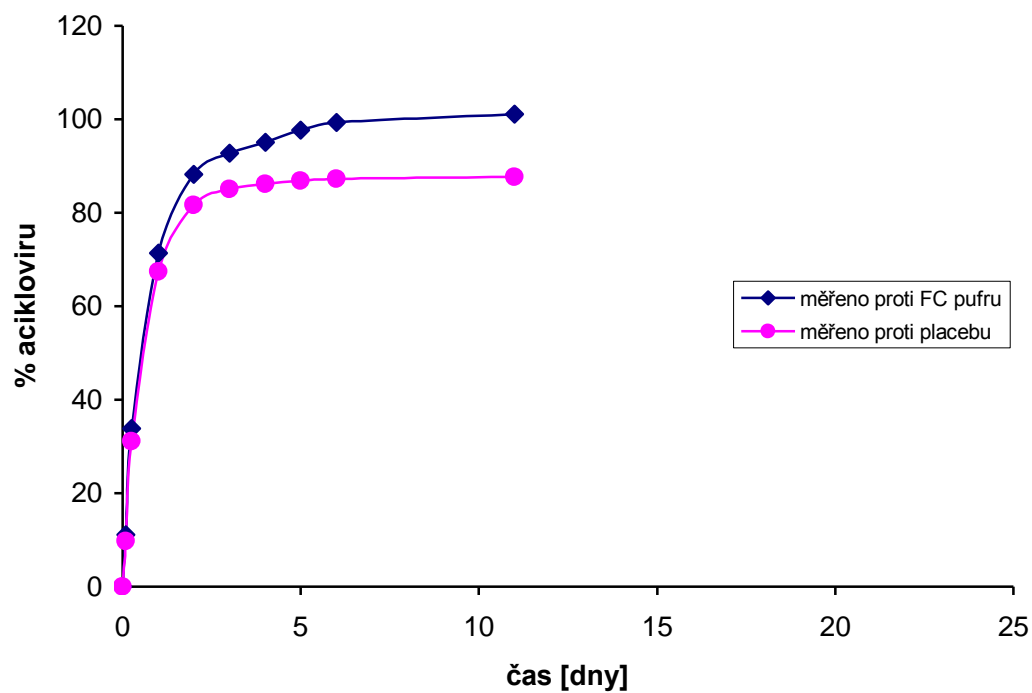
Obr. 8: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 10% ES



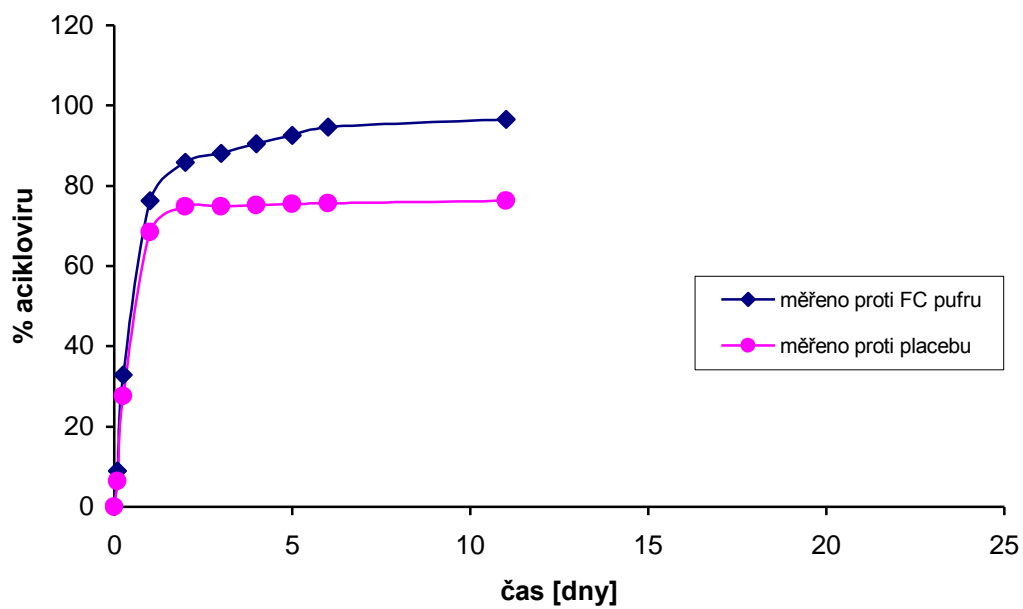
Obr. 9: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 20% ES



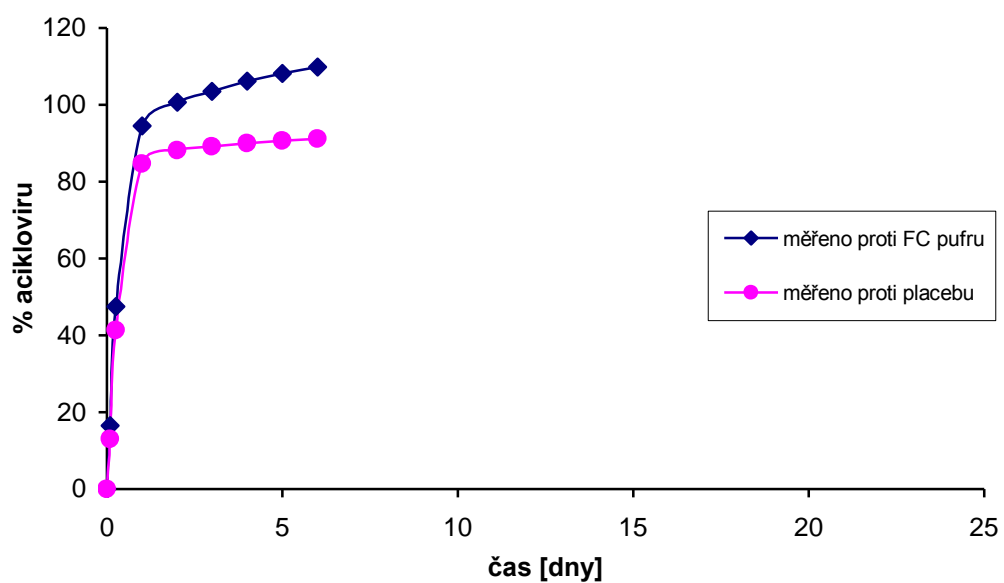
Obr. 10: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 30% ES



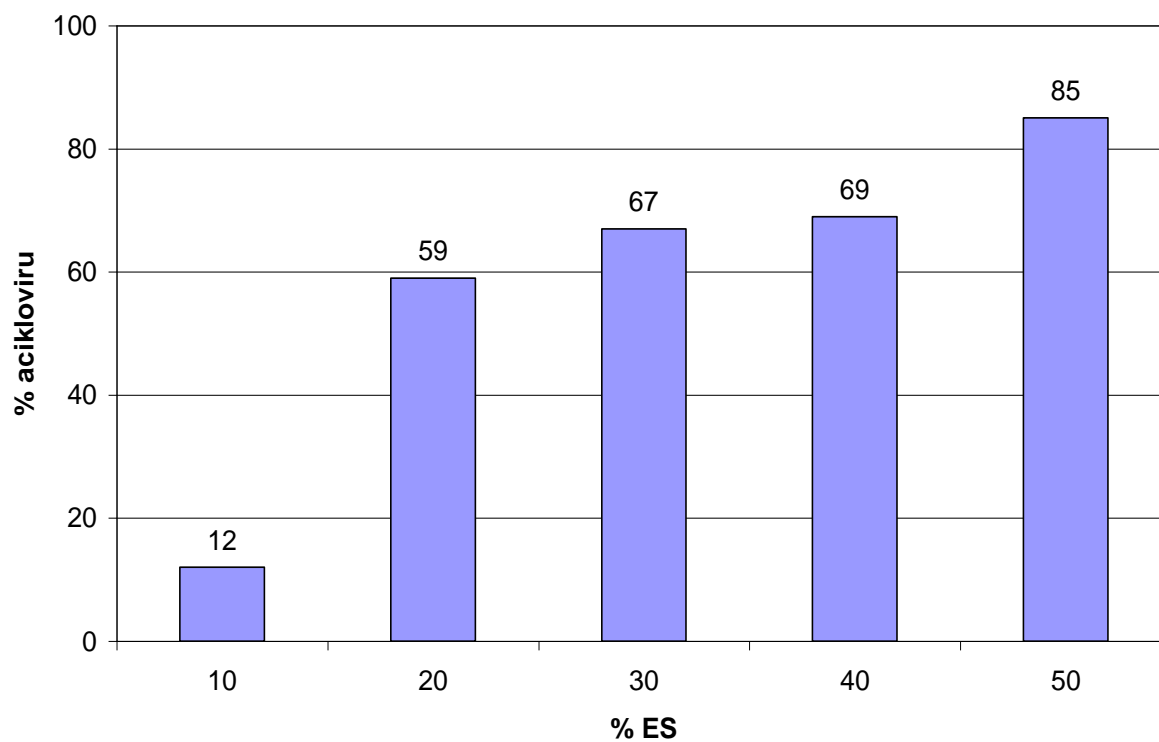
Obr. 11: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 40% ES



Obr. 12: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 50% ES

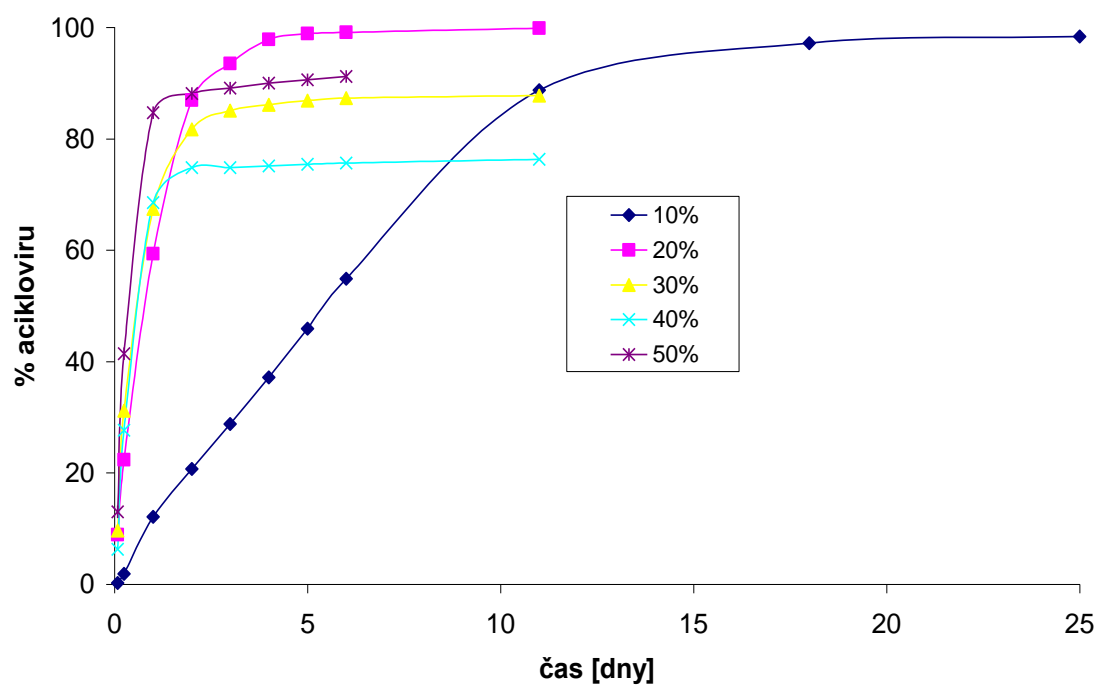


Obr. 13: Vliv ethylsalicylátu na množství uvolněného acikloviru za 24 hodin

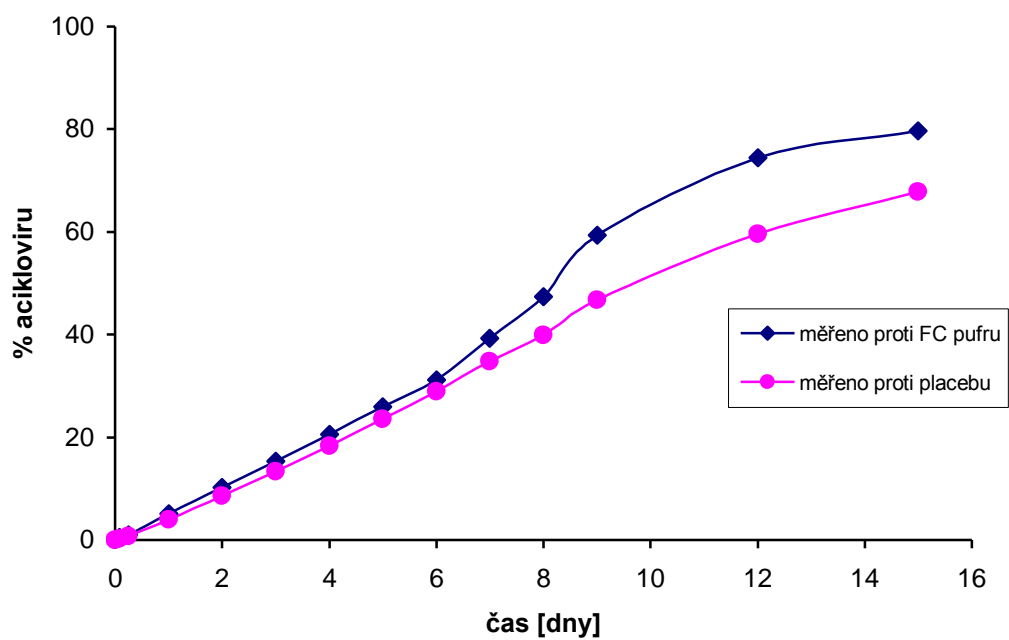




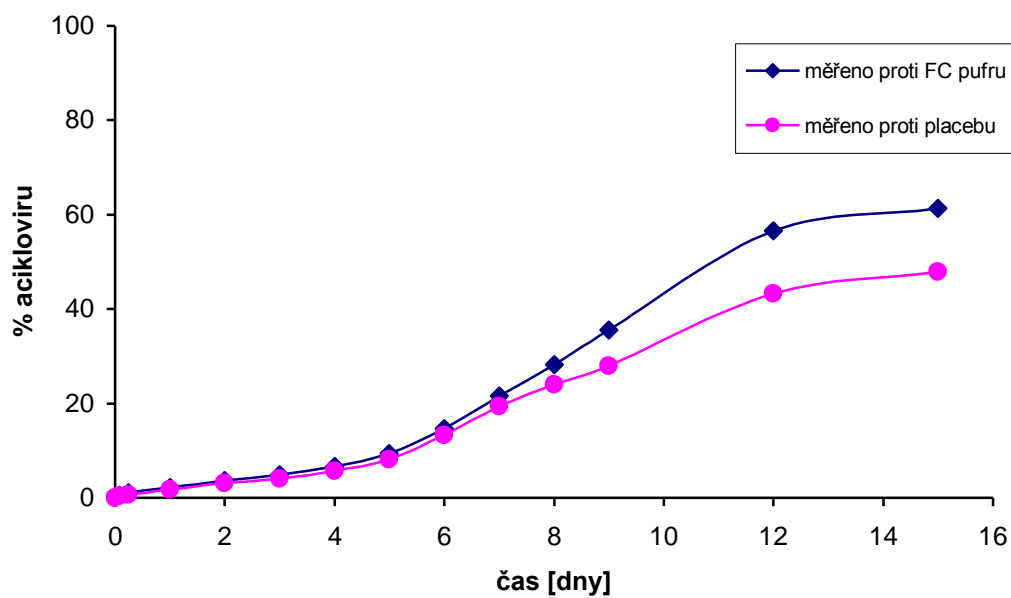
Obr.14: Vliv koncentrace ethylsalicylátu na liberaci acikloviru



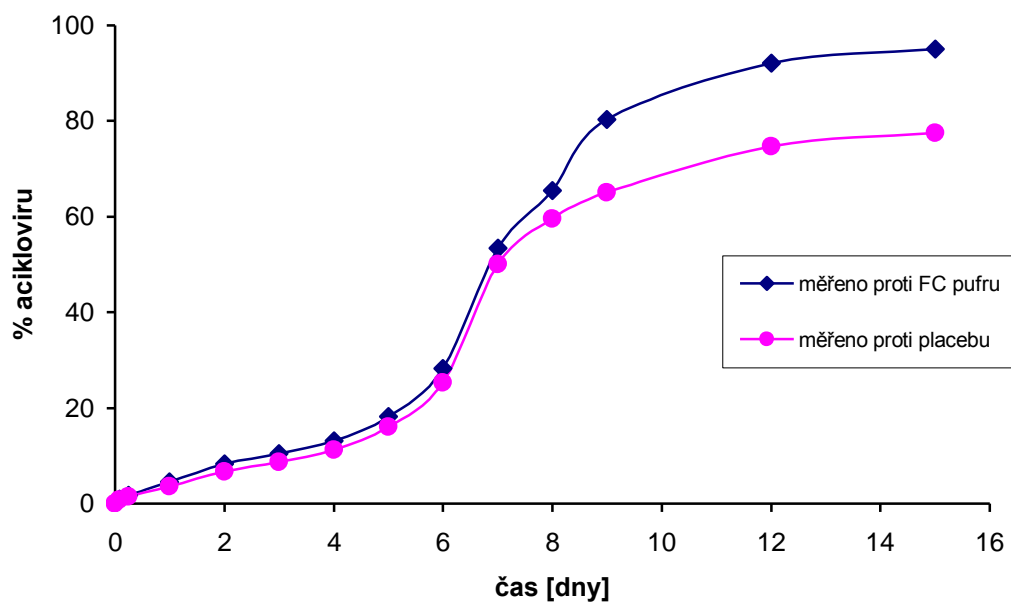
Obr. 15: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 10% HS



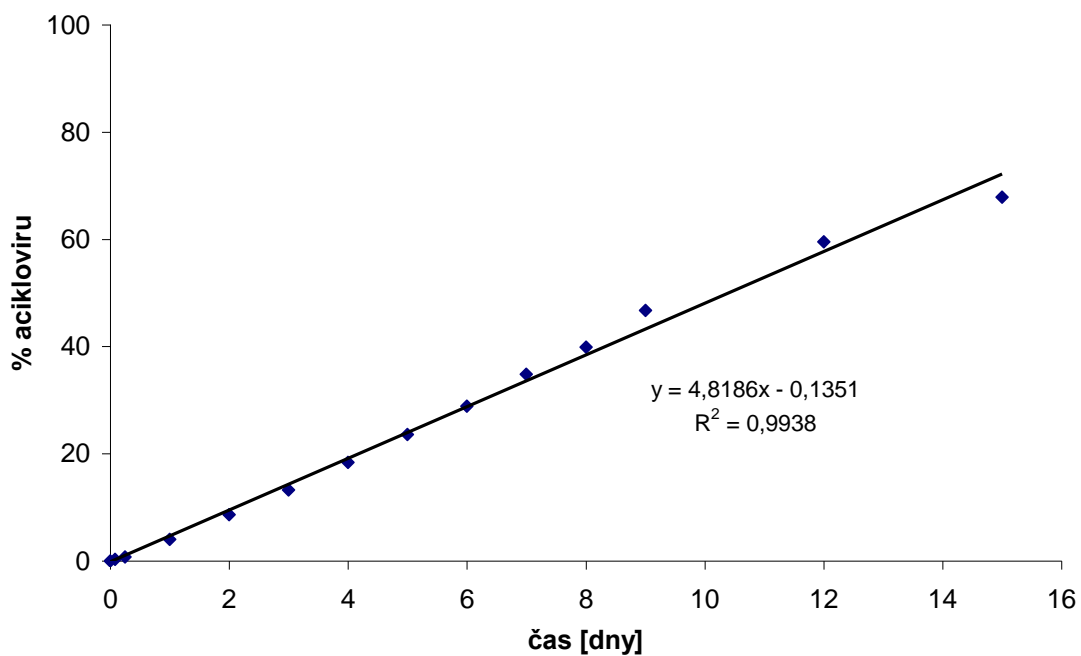
Obr. 16: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 20% HS



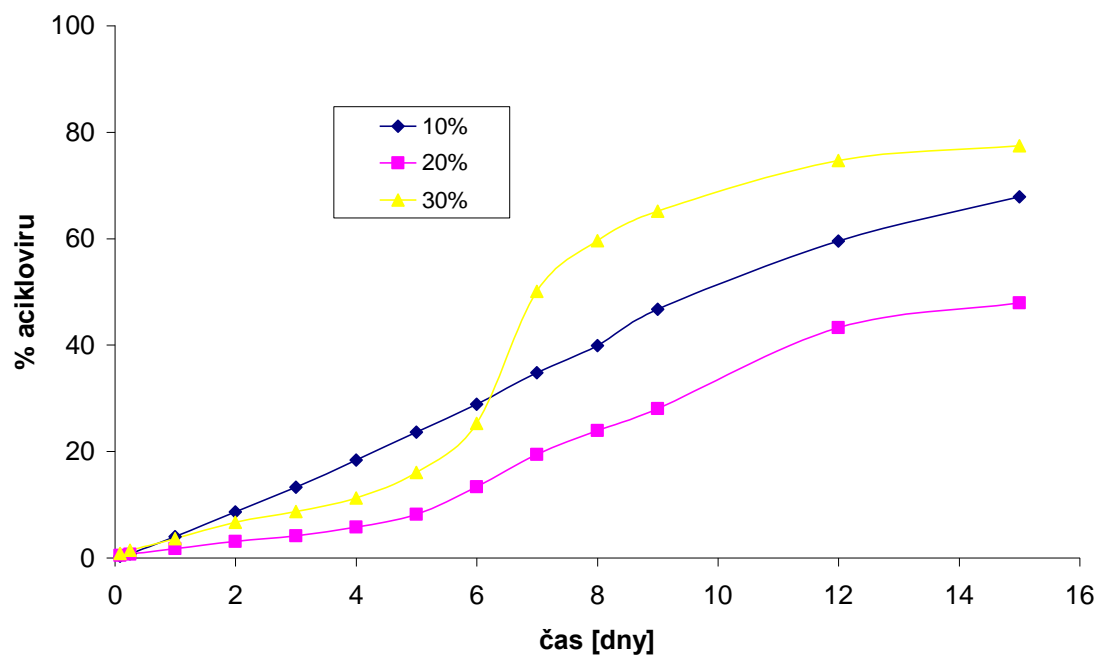
Obr. 17: Liberace ACV z nosiče plastifikovaného 30% HS



Obr. 18: Linearizace průběhu uvolňování acikloviru z matric plastifikovaných 10% hexylsalicylátu



Obr.19: Vliv koncentrace hexylsalicylátu na liberaci acikloviru



## 7. DISKUZE

Předložená diplomová práce tématicky navazuje na řešení problematiky diplomové práce<sup>43</sup>. Léčivou látkou byl opět zvolen aciklovir. K přípravě matric z biodegradabilního materiálu a léčivé látky bylo zapotřebí zvolit vhodný polymerní nosič. Na základě výsledků předešlých prací<sup>44</sup> byl ke studiu liberace acikloviru vybrán biodegradabilní terpolymer kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a mannitolu s pracovním označením 5M (viz tab.1).

Oligoesterový nosič byl syntetizován polykondenzační reakcí na katedře farmaceutické technologie. Jedná se o plasticky deformovatelnou soustavu s kontinuální degradací bez fragmentace. Systém si zachovává svoji integritu díky nízkému stupni bobtnání. Rychlá degradace je způsobena vysokým podílem kyseliny glykolové. V molekule je zabudován mannitol ve funkci centrální molekuly, která vytváří předpoklad pro vznik větvené struktury.

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

## 7. 1. Vliv oligoesterového nosiče na liberaci acikloviru

Liberace léčiva je ovlivněna charakterem zvoleného oligoesterového nosiče, především jeho molekulovou hmotností a větvením. Na katedře farmaceutické technologie byla syntetizována řada terpolymerů kyseliny mléčné, glykolové a mannitolu, které byly použity jako nosiče léčiv.

Typ polymeru ovlivňuje počátek, průběh i celkové uvolněné množství léčivé látky. Počátek liberace lze charakterizovat burst efektem. Burst efekt byl určen jako koncentrace acikloviru liberovaného za 24 hodin. Z doposud testovaných nosičů<sup>45 46</sup> vykazoval nejvyšší burst efekt (80%) terpolymer kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a mannitolu v poměru 48,55% : 48,55% : 2,9% o hmotnostně střední molekulové hmotnosti  $M_w = 2700$  g/mol (pracovní označení polymer 71). Naopak zpoždění v liberaci acikloviru bylo zjištěno u nosiče tvořeného pouze kyselinou poly(D,L-mléčnou) s  $M_w = 9750$  g/mol, u kterého byl zaznamenán 8-denní lag-time. Oba tyto oligoestery nejsou z důvodu nevhodného průběhu počátku liberace jako nosiče acikloviru použitelné.

Pro předkládanou rigorózní práci byl jako nosič zvolen oligoester použitý v předešlých pracích pro terbinafin a flukonazol<sup>44</sup>. Jedná se o terpolymer kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a mannitolu v poměru 47,5% : 47,5% : 5,0% o  $M_w = 2200$  g/mol. Nosič byl plastifikován methylsalicylátem v koncentraci 10%, 20%, 30% nebo ethylsalicylátem v koncentraci 10%, 20%, 30%, 40%, 50% nebo hexylsalicylátem v koncentraci 10%, 20%, 30%. Liberace acikloviru probíhala do fosfát citrátového pufru pH 6,0. Množství uvolněného acikloviru bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 256 nm. Do disolučního média se kromě acikloviru uvolňuje rovněž plastifikátor a degradační produkty nosiče, což může zkreslovat výsledky měření absorbance acikloviru. Proto byly paralelně s matricemi s aciklovirem připraveny placebo matrice tvořené pouze nosičem a plastifikátorem, bez acikloviru. Byly podrobeny stejnému disolučnímu testu jako matrice s léčivem. V daných časových intervalech byly odebírány vzorky disolučního média placebo matric a použity jako slepý vzorek pro měření absorbance acikloviru. Zároveň byla měřena absorbance i proti fosfát citrátovému pufru pH 6,0.

Liberace acikloviru probíhala kontinuálně s různě vysokým 24-hodinovým burstem v závislosti na kvalitě a množství použitého plastifikátoru. Celková doba liberace byla rovněž ovlivněna plastifikátorem a trvala 5 až 25 dnů.

## 7. 2. Vliv methyalsalicilátu na liberaci acikloviru

Byl studován vliv methyalsalicylátu (MS) na liberaci acikloviru (ACV) z nosiče 5M. Koncentrace plastifikátoru v systému byla 10%, 20% a 30%. Průběh uvolňování ACV z nosiče plastifikovaného různým množstvím MS uvádějí obr. 4-6. V grafech jsou vyneseny dvě liberační křivky: množství uvolněného ACV stanovené měřením absorbance proti pufru a množství uvolněného ACV stanovené měřením absorbance proti disolučnímu médiu z placebo matric. Do 6 hodin od počátku liberace jsou obě hodnoty stejné. Je tedy měřen skutečně ACV. Od 6. hodiny se křivky rozcházejí, přičemž vyšší hodnoty byly zjištěny při měření proti pufru. Do disolučního média se postupně uvolňuje plastifikátor a degradační produkty nosiče, což způsobuje vyšší hodnoty absorbance při měření proti pufru.

Na obr.7 je porovnána liberace ACV z nosičů plastifikovaných různým množstvím methyalsalicylátu. Na počátku liberace je patrný různě vysoký burst. Při plastifikaci 10% MS se za 24 hodin uvolnilo 10% ACV, při koncentraci MS 20% to bylo 32% ACV a při použití 30% MS byl 24-hodinový burst 76%. Celková doba liberace z nosičů plastifikovaných MS byla 21 dnů a uvolnilo se asi 85% inkorporovaného acikloviru. Nejvhodnější průběh liberace ACV byl zjištěn při plastifikaci 10% MS. Od 2. dne do 11. dne probíhala liberace kinetikou 0. řádu dle rovnice:  $y = 6,4925 x + 2,8636$  při  $R^2 = 0,9911$ .

## 7. 3. Vliv ethyalsalicylátu na liberaci acikloviru

Liberace acikloviru z matric s 10% ethyalsalicylátu (ES) (obr.8) měla velmi výhodný průběh. Po mírném burstu na počátku liberace (12% ACV za 24 hod) došlo v časovém úseku od 1. dne do 11. dne k lineární liberaci acikloviru podle rovnice:  $y = 8,142x + 3,0095$  při  $R^2 = 0,9991$ . Uvolnilo se 88% acikloviru obsaženého v matricích. Zbylé množství se uvolnilo do 25. dne.

Z matric s 20% ES (obr.9) se aciklovir uvolňoval podstatně rychleji. Za 24 hodin se uvolnilo více než 50% acikloviru a za 48 hodin bylo množství uvolněného acikloviru vyšší než 80%. Poté se liberace zpomalila a zbylých asi 20% se uvolnilo do 11. dne od počátku liberace. Liberace acikloviru z matric s 30% ES probíhala do 2. dne podobně jako při koncentraci ES 20%. Poté se liberace výrazně zpomalila a celkově se za 11 dnů uvolnilo pouze 87% acikloviru (obr.10). Při koncentraci ES 40% se za 24 hodin uvolnilo 68%, za 72 hodin 75%, ale dále liberace neprobíhala. Jedná se o nejnižší celkové množství ACV uvolněné z matric plastifikovaných ES. Zároveň byl při této koncentraci ES zjištěn největší rozdíl mezi hodnotami absorbance ACV měřené proti pufru a proti placebo médiu (obr.11).

Matrice plastifikované 50% ES vykazovaly nejvyšší burst (85%). Za 2 dny se celkově uvolnilo 88% ACV a poté do 6. dne od počátku probíhala liberace lineárně dle rovnice:  $y = 0,768x + 86,83$ ,  $R^2 = 0,9862$ . Celkově se uvolnilo 91% ACV (obr.12).

S rostoucí koncentrací ES rostlo množství acikloviru uvolněného za 24 hodin. Matrice obsahující více než 10% vykazovaly příliš vysoký jednodenní burst (obr.13).

Průběh liberace ACV z matric plastifikovaných různou koncentrací ES je dobře patrný z obr.14. Celková doba liberace byla ovlivněna množstvím ES. Nejdéle se uvolňoval ACV z matric s 10% ES (25 dnů) a uvolnilo se veškeré množství inkorporovaného ACV. Nejkratší dobu se ACV uvolňoval z matric plastifikovaných 50% ES (6 dnů) a uvolnilo se celkově 91%. Při 20%, 30% nebo 40% koncentraci ES byla doba liberace 11 dnů, ale pouze při koncentraci 20% se uvolnil všechno ACV.

#### **7. 4. Vliv hexylsalicylátu na liberaci acikloviru**

Byla studována liberace ACV z matric plastifikovaných 10%, 20% nebo 30% hexylsalicylátu (obr.15-17). Při koncentraci 10% probíhala liberace kinetikou 0. řádu podle rovnice:  $y = 4,8186x - 0,1351$ ,  $R^2 = 0,9938$  (obr.18). Liberace acikloviru z matric plastifikovaných 20% probíhala ve třech fázích. Od počátku do 5. dne liberace probíhala lineárně podle rovnice:  $y = 1,4874x + 0,1404$ ,  $R^2 = 0,983$ . Uvolnilo se pouze 8% acikloviru. Od 5. dne došlo k akceleraci v uvolňování acikloviru. V intervalu od 5. do 9. dne se uvolnilo 20% acikloviru. Poté došlo ke zpomalení liberace, přičemž celkově se uvolnilo za 15 dní pouze 35% acikloviru. Obdobný průběh liberace acikloviru byl zaznamenán při použití 30% hexylsalicylátu. V první fázi (do 5. dne) se však uvolnilo dvojnásobné množství acikloviru – 16%. Od 5. dne došlo k podstatně vyšší akceleraci v uvolňování. Množství uvolněného acikloviru 9. den od počátku liberace bylo 65%. Celkově se za 15 dní uvolnilo 77% acikloviru.

Vliv koncentrace HS na průběh liberace ACV je porovnán na obr.19.

#### **7. 5. Liberace acikloviru z matric plastifikovaných 10% plastifikátorů**

Použité plastifikátory (methylsalicylát, ethylsalicylát a hexylsalicylát) vykazovaly různou mísitelnost s nosičem. Termodynamicky nejlepším rozpouštědlem použitého nosiče byl ethylsalicylát, proto mohl být použit i koncentraci 40% a 50%. Methylsalicylát a hexylsalicylát byly použity pouze v koncentracích 10%, 20% a 30%.

Liberační testy ukázaly, že nejlepší průběh liberace acikloviru byl při použití 10% plastifikátorů. Při vyšší koncentraci MS a ES byl vysoký 24-hodinový burst, při vyšší



koncentraci HS byla liberace naopak zpomalena a celkové množství uvolněného ACV bylo nízké. Porovnání průběhu liberace z matric při 10% plastifikaci methylsalicylátem, ethylsalicylátem a hexylsalicylátem ukazuje obr.20. Na křivkách je patrný poměrně nízký burst. Následuje lineární fáze liberace do 11. dne, kdy se uvolní téměř všechen aciklovir z matric s ES, 70% ACV z matric s MS a pouze 60% ACV z matric s HS.

Zjištěné skutečnosti týkající se mísitelnosti plastifikátorů s nosičem by bylo vhodné ověřit reologickým hodnocením plastifikovaných nosičů nebo systémů včetně inkorporovaného léčiva.

## 8. ZÁVĚR

Z výsledků předložené rigorózní práce lze učinit tyto závěry:

1. Liberace acikloviru z testovaného terpolymeru kyseliny mléčné, kyseliny glykolové a 5,0% mannitolu probíhala kontinuálně s různě vysokým 24-hodinovým burstem v závislosti na kvalitě a množství použitého plastifikátoru. Celková doba liberace byla rovněž ovlivněna plastifikátorem a trvala 5 až 25 dnů.
2. Při použití methylsalicylátu ve funkci plastifikátoru byl nejvhodnější průběh liberace ACV zjištěn při koncentraci 10%. Za 24 hodin se uvolnilo 10% ACV, od 2. dne do 11. dne probíhala liberace kinetikou 0. řádu dle rovnice:  $y = 6,4925 x + 2,8636$  při  $R^2=0,9911$ . Celková doba liberace byla 16 dnů a uvolnilo se asi 85% inkorporovaného acikloviru.
3. Při použití ethylsalicylátu měla velmi výhodný průběh liberace acikloviru z matric s 10% tohoto plastifikátoru. Po mírném burstu na počátku liberace (12% ACV za 24 hod) došlo v časovém úseku od 1. dne do 11. dne k lineární liberaci acikloviru podle rovnice:  $y = 8,142x + 3,0095$  při  $R^2 = 0,9991$ . Za tuto dobu se uvolnilo 88% acikloviru obsaženého v matricích. Zbylé množství se uvolnilo do 25. dne.
4. Rovněž při použití hexylsalicylátu byl nejvhodnější průběh liberace acikloviru při koncentraci 10%. Liberace probíhala kinetikou 0. řádu podle rovnice:  $y = 4,8186 x - 0,1351$ ,  $R^2 = 0,9938$ . Za 15 dnů se však uvolnilo pouze 68% inkorporovaného léčiva.

## 9. SOUHRN

Teoretická část je oproti teoretické části mé diplomové práce soustředěna především na polymerní systémy, používané pro řízené uvolňování léčiv a cílený transport léčiv v lidském organismu, na složení těchto systémů a na aplikaci v ústní dutině. Dále jsou zde shrnuty základní poznatky o herpetických virech, chorobách, které způsobují, a možných způsobech terapie, včetně nejdůležitějších zástupců.

Na teoretickou část navazuje část experimentální. Pro průběh experimentu byly připraveny matrice o hmotnosti cca 150,0 mg, které byly tvořeny oligoesterovým nosičem, pracovním označeným 5M, jehož charakteristiku uvádí tabulka č.1, aciklovirem (4%) a plastifikátorem. Zvolenými plastifikátory byly methylsalicylát, ethylsalicylát a hexylsalicylát. Předpokládané procentuální zastoupení v matrici mělo být u všech plastifikátorů stejné, a to 10% - 60%. Vzhledem k mísitelnosti plastifikátorů s oligoesterovým nosičem, zjištěné při přípravě matric, se však podařilo připravit vzorky matric v procentuálním zastoupení plastifikátoru 10% - 60% pouze v případě ethylsalicylátu. Plastifikátory methylsalicylát a hexylsalicylát byly s nosičem mnohem méně mísitelné, podařilo se tedy připravit vzorky matric pouze v koncentracích 10%, 20% a 30%.

Liberace acikloviru probíhala do fosfát citrátového pufru o pH 6,0

Vzorky byly odebírány v pravidelných intervalech, které byly ze začátku kratší a se snižujícím se množstvím uvolňovaného acikloviru se prodlužovaly. Detekce acikloviru v disolučním mediu byla spektrofotometrická při vlnové délce 256 nm. Vzhledem k možnému riziku liberace degradačních produktů nosiče a plastifikátoru do disolučního media spolu s aciklovirem byly vytvořeny placebo matrice bez léčiva. Všechny vytvořené matrice byly podrobeny stejnému disolučnímu testu. Absorbance acikloviru byla měřena jak proti fosfát citrátovému pufru, tak proti placebo matricím, aby byla přesnost měření co nejvyšší. Naměřené výsledky byly průběžně zaznamenávány a z nich byla postupně vytvářena křivka množství uvolněného acikloviru v čase.

Liberace acikloviru probíhala kontinuálně s různě vysokým burst efektem. Nejlepší průběh liberace byl zjištěn při plastifikaci 10%, a to u všech použitých plastifikátorů. Čím vyšší byla koncentrace plastifikátoru MS a ES, tím větší bylo množství uvolněného acikloviru během prvních 24 hodin. Při použití HS se naopak s rostoucí koncentrací plastifikátoru množství uvolněného acikloviru snižovalo. Na všech křivkách je patrná lineární fáze liberace acikloviru s kinetikou 0. řádu.

Nejvhodnějším plastifikátorem se při porovnání všech sledovaných parametrů (burst efekt, fáze lineární liberace acikloviru, celková délka a množství uvolněné léčivé látky) zdá být ethylsalicylát v koncentraci 10%.

## 10. LITERATURA

---

1. Ulbrich, K.; Polymerní systémy pro řízené uvolňování léčiv, Bulletin České společnosti chemické, 25, 1994, 3
2. Prof. Ing. Ulbrich, K., DrSc.; Odd. biolékařských polymerů, Ústav Makromolekulární chemie AV ČR, <http://material.imc.cas.cz>
3. Příkladný, M., Petrovický, P., Froňková, V., Vacík, J., Smetana, K.; Evaluation of biocompatibility of the copolymer of hydroxyethyl methacrylate with methylthioethyl methacrylate., J.Mater.Sci, Mater.Med., in press
4. Smetana, K., Vacík, J., Bartůňková, J., Lukáš, J., Michálek, J., Dvořánková, B., Palečková, V.; Molecular mechanismus of biocompatibility, International Conference "Skelet 99", Abstracts, 1999, 56-57
5. Rathbone, M. J.; Oral Mucosal Drug Delivery; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1996
6. Gandhi, R. B., Robinson, J. R.; Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery, Adv. Drug Del. Rev., 13 (1 – 2), 1994, 43 – 74
7. Robinson, J. R., Yang, X.; Absorption enhancers, In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 18, 1999, 1 – 27
8. Veuillez, F.; Kalia, Y. N., Jacques, Y., Deshusses, J., Buri, P.; Factors and strategies for improving buccal Absorption of peptides, Eur. J. Pharm. Biopharm., 51 (2), 2001, 93 – 109
9. Okamoto, H., Taguchi, H., Iida, K., Danjo, K.; Development of polymer film dosage forms of lidocaine for buccal administration, I. Penetration rate and release rate, J. Contr. Rel., 77 (3), 2001, 253 – 260
10. Senel, S., Hincal, A. A.; Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. J. Contr. Rel., 72 (1 – 3), 2001, 133 – 144
11. Mathiowitz, E., Chickering, D. E., III., Lehr, C. M.; Bioadhesive Drug Delivery Systems: Fundamentals, Novel Approaches and Development; Marcel Dekker, Inc.: N. Y., 1999
12. Eouani, C., Piccerelle, P., Prinderre, P., Bourret, P., Joachim, J.; In vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films, Eur. J. Pharm. Biopharm., 52 (1), 2001, 45 – 55
13. Khanvilkar, K., Donovan, M. D., Flanagan, D. R.; Drug transfer through mucus, Adv. Drug Del. Rev., 48 (2 – 3), 2001, 173 – 193

- 
14. Kamimori, G. H., et al.; The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus Capsules to normal healthy volunteers, *Int. J. Pharm.*, 234 (1 – 2), 2002, 159 – 167
  15. Voorspoels, J., Remon, J. P., Eechaute, W., DeSy, W.; Buccal absorption of testosterone and its esters using a bioadhesive tablet in dogs, *Pharm. Res.*, 13 (8), 1996, 1228 – 1232
  16. Nagai, T., Machida, Y.; Buccal delivery systems using hydrogels, *Adv. Drug Del. Rev.*, 11 (1 – 2), 1993, 179 – 191
  17. [www.zuby.cz](http://www.zuby.cz), Onemocnění dásní a závěsného aparátu zubu, 2000
  18. Slots, J.; Subgingival microflora and periodontal disease, *J. Clin. Periodontal*, 6, 1979, 351 – 382
  19. Loesche, W. J., Syed, S. A., Schmidt, E. and Morrison, E. C.; Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis, *J. Periodontal*, 56, 1985, 447 – 456
  20. Medlicott, N. J., Rathbone M. J., Tucker I. G., Holborow, D. W.; Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket, *Adv. Drug Deliv. Rew.*, 13, 1994, 181 – 203
  21. Ginde, R. M., Gupta, R. K.; *J. Appl. Polym. Sci.*, 33, 1987, 2411 - 2429
  22. Schoberl, A. and Wiehler, C.; Über die Dehydratisierung von Thioglykolsäure, deren Kondensationspolymere und über Dithioglykolid. *Liebigs Ann. Chem.*, 595, 1955, 112 - 118
  23. Amass, W., Amass, A., Tighe, B.; *Polym.Int.*, 47, 1998, 89
  24. Schnidler, A., Jeffcoat, R. et al.; *Contemporary Topics in Polymer Science*, Plenum Press, New York, 2, 1977, 251 - 289
  25. Gogolewski, S., Pennings, A. J.; *J. Appl. Polym. Sci.*, 28, 1983, 1045 – 1061
  26. Pitt, C.G., Gratzel, M.M., Kimmel, G.L., Surles, J., Schindler, A.; *Biometrics*, 2, 1981, 215-220
  27. Li, S.M., Garreau, H., Vert, M.; *J.Mater.Sci.Mater.Med.*, 1, 1990, 123-130
  28. 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
  29. Ježková, K., *Studium biodegradabilních systémů s aciklovirem*, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2004
  30. PharmDr. Fričová, V., Herpetické viry, *Folia Phoenix*, 10, 2005, 8 - 11
  31. <http://camelot.lfhk.cuni.cz/farmakol/cz/antivirove.doc>

- 
32. Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Bieger, D.; Barevný atlas farmakologie, 284 - 286
  33. Partitt, K., The Complete Drug Reference, Martindale, The Pharmaceutical Press, Massachusetts, 32, 1999
  34. <http://www.sukl.cz/download/SPC/SPC49114.doc>
  35. O'Brien, J.J., Campoli-Richards, D.M.; Acyclovir: An Updated Review of its Antiviral Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy, Drugs, 37, 1989, 233-309
  36. Fletcher, C., Bean, B.; Evaluation of acyclovir therapy, Drug Intelligence and Clinical Pharmacy 19, 1985, 518 – 524
  37. Fletcher, C., Bean, B.; Evaluation of acyclovir therapy, Drug Intelligence and Clinical Pharmacy, 19, 1985, 518 - 524
  38. Drug Development and Industrial Pharmacy, 30/9, 2004, 959 – 965
  39. Jankowski, A., Jankowska A. L., Lamparczyk H.; Determination and pharmacokinetics of acyclovir after ingestion of suspension form, J. Pharm. Biomed. Anal., 18, 1998, 249 - 254
  40. Zhao, Y., Baeyens, W. R. G., Van der Weken, G. And Garcia – Campaña, A. M.; Fluorimetric study of acyclovir in acidic micellar media, Biomed. Chromatogr., 13, 1999, 143 – 144
  41. PhDr. Koukal, M., Mgr. Janda, M., Mgr. Růžková, I.: Prohrajeme boj s ptačí chřipkou?, 21. století extra, 2, 2005, 12 – 15
  42. Merck, Tables for the laboratory, [B. r. ], 57 - 59
  43. Trčková, K.; Studium biodegradabilních systémů s aciklovirem II, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2005
  44. Mrázek, D.; Biodegradabilní systémy s protimikrobními léčivy, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2005
  45. Žižka, R.; Biodegradabilní systémy s aciklovirem, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2003
  46. Žižka, R.; Studium liberace acikloviru z biodegradabilních systémů, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2003