

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

LIBERACE LÉČIV Z OLIGOESTEROVÝCH NOSIČŮ

Rigorózní práce

Hradec Králové 2006

Mgr. Olga Tichopadová

Děkuji PharmDr. Evě Šnejdové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a poskytnuté rady při zpracování rigorózní práce.

Mgr. Olga Tichopadová

Obsah

1	Úvod	5
2	Seznam zkratk	6
3	Cíl práce	7
4	Teoretická část	8
4.1	Řízené uvolňování léčiv.....	8
4.1.1	Principy řízeného uvolňování	9
4.2	Biodegradabilní polyestery kyseliny glykolové a kyseliny mléčné....	14
4.2.1	Syntéza PGA, PLA, PLGA.....	14
4.2.2	Vlastnosti polyglykolové a polymléčné kyseliny	16
4.2.3	Mechanismy degradace.....	17
4.2.4	Implantáty tvořené PLGA.....	17
4.3	Kopolymery z PLA, PLGA polymerů a dalších materiálů.....	20
4.3.1	Kopolymery s poly(ethylenglykolem) a poly(ethylenoxidem).....	20
4.3.2	Kopolymery s ϵ – kaprolaktonem	20
4.4	Nové polymery ve farmacii	21
4.5	Mykotické infekce	24
4.6	Antimykotika	26
4.6.1	Azolová antimykotika.....	26
4.6.2	Allylaminová antimykotika – terbinafin.....	29
5	Experimentální část	32
5.1	Použité přístroje	32
5.2	Použité suroviny	32
5.3	Oligoesterové nosiče.....	32
5.4	Postup práce.....	33
5.4.1	Liberační médium	33
5.4.2	Kalibrační přímka	33
5.4.3	Příprava matric.....	36
5.4.4	Stanovení liberovaných léčiv.....	36
6	Výsledky	Chyba! Záložka není definována.
6.1	Tabulky	Chyba! Záložka není definována.

6.2	Grafy	Chyba! Záložka není definována.
7	Diskuze.....	68
8	Závěr.....	71
9	Souhrn.....	72
10	Literatura	73

1 Úvod

Součástí výzkumu a vývoje lékových forem je i studium biodegradabilních polymerů a uvolňování léčivé látky z těchto systémů. Při užití biodegradabilních polymerů s léčivem je polymer enzymaticky či hydrolyticky odbourán a vzniklé degradační produkty jsou neškodné a z těla se snadno vyloučí. Z organismu není tedy potřeba tento polymer chirurgicky odstraňovat, protože je tělem absorbován a posléze vyloučen. Výhodou tohoto systému je rovněž možnost různého dávkování léčiva v závislosti na čase volbou vhodných polymerů a relativně snadné začlenění léčivé látky do biodegradabilního systému. Jedná se tedy o polymerní systémy pro cílený transport a řízené uvolňování léčiv a jiných biologicky aktivních látek v živém organismu.

Jako nosiče léčivých látek se nejčastěji používají polyestery alifatických hydroxykyselin, hlavně kyseliny mléčné, kyseliny glykolové a jejich kopolymery. U těchto polyesterů alifatických hydroxykyselin je předností jejich netoxicity a biokompatibilita, jsou to sloučeniny biodegradabilní a relativně dostupné. Do těchto polymerů lze začlenit léčivé látky o různých fyzikálních, chemických a biologických vlastnostech.

Lékové formy s řízeným uvolňováním mají řadu výhod, které zahrnují zvýšení účinnosti léčby či snížení výskytu nežádoucích účinků, také méně častou, bezpečnější a pohodlnější aplikaci a tím zvýšení kvality života a compliance pacientů.

Znalost vlastností a struktury polymeru i léčivé látky je nutná pro vytvoření nejvhodnější lékové formy, aby při aplikaci těchto systémů s postupným uvolňováním léčiv odpovídala degradace nosiče a liberace léčiva procesům v organismu.

2 Seznam zkratek

D..... dipentaerythritol

Flu flukonazol

GA..... kyselina glykolová

LA kyselina mléčná

M..... mannitol

PDLA poly(DL – mléčná kyselina)

PEG... polyethylenglykol

PEO ... polyethylenoxid

PGA... kyselina polyglykolová

PLA ... kyselina polymléčná

PLGA kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

Ter terbinafin

3 Cíl práce

Cílem rigorózní práce bylo studium liberace flukonazolu a terbinafinu z oligoesterových nosičů, pracovně označených 3D a 5M. Jedná se o terpolymery kyseliny D,L – mléčné, kyseliny glykolové a 3% dipentaerythritolu nebo 5% mannitolu. Nosiče byly plastifikovány ethylpyruvátem v koncentracích 10%, 20%, 30%. Byl sledován vliv typu nosiče a koncentrace plastifikátoru na liberaci flukonazolu nebo terbinafinu z matric.

Úkol rigorózní práce je možno rozdělit do následujících dílčích kroků:

1. Příprava matric o hmotnosti 150,0 mg složených z oligoesterového nosiče 3D nebo 5M, flukonazolu nebo terbinafinu v koncentraci 4% a plastifikátoru. Jako plastifikátor byl zvolen ethylpyruvát v koncentracích 10%, 20%, 30%.
2. Příprava placebo matric tvořených pouze plastifikovaným nosičem (bez léčiva).
3. Modifikovaný statický disoluční test při 37°C za použití destilované vody jako disolučního média. Odběry 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 léčiva spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 261 nm pro flukonazol a 283 nm pro terbinafin.
5. Zjištění vlivu typu použitého nosiče a koncentrace plastifikátoru na množství uvolněného flukonazolu, resp. terbinafinu.

4 Teoretická část

4.1 Řízené uvolňování léčiv

V Českém lékopise 2002 v oddíle Obecné články lékových forem jsou definovány tyto druhy lékových forem:¹

1. Lékové formy s neřízeným uvolňováním (Conventional – release dosage forms)

Lékové formy s neřízeným uvolňováním jsou léčivé přípravky, které nemají záměrně upravené uvolňování léčivé látky (léčivých látek) zvláštním složením a/nebo výrobními postupy. V případě pevných lékových forem závisí disoluční profil léčivé látky hlavně na jejích vnitřních vlastnostech.

2. Lékové formy s řízeným uvolňováním (Modified – release dosage forms)

Lékové formy s řízeným uvolňováním jsou léčivé přípravky, kde rychlost a/nebo místo uvolňování léčivé látky (léčivých látek), jsou odlišné od lékové formy s neřízeným uvolňováním při podání stejným způsobem. Tohoto záměru je dosaženo speciální úpravou složení a/nebo výrobních postupů. Lékové formy s řízeným uvolňováním zahrnují lékové formy s prodlouženým uvolňováním, lékové formy se zpožděným uvolňováním a lékové formy s pulzním uvolňováním.

3. Lékové formy s prodlouženým uvolňováním (Prolonged – release dosage forms)

Lékové formy s prodlouženým uvolňováním jsou lékové formy s řízeným uvolňováním, které uvolňují léčivou látku (léčivé látky) pomaleji než lékové formy s neřízeným uvolňováním při podání stejným způsobem. Tohoto záměru je dosaženo speciální úpravou složení a/nebo výrobních postupů. Lékové formy se zpožděným uvolňováním zahrnují enterosolventní (acidorezistentní) léčivé přípravky.

4. Lékové formy s pulzním uvolňováním (Pulsatile – release dosage forms)

Lékové formy s pulzním uvolňováním jsou lékové formy s řízeným uvolňováním, které uvolňují léčivou látku (léčivé látky) po částech. Tohoto záměru je dosaženo speciální úpravou složení a/nebo výrobních postupů.

4.1.1 Principy řízeného uvolňování

Řízeného (modifikovaného) uvolňování léčiv lze dosáhnout buď chemickou modifikací léčiva, to znamená vytvořením proléčiva, nebo formulací léčiva do struktury, která zajistí kontrolované uvolňování léčivé látky.

Principy modifikovaného uvolňování léčiva zahrnují základní fyzikálně chemické procesy jako rozpouštění a difúze (také bobtnání, deaglomerace, deagregace), dále biochemické procesy, to znamená hydrolýza enzymatická či neenzymatická, mikrobiologické procesy a rovněž lze využít elektroforézu, sonoforézu nebo magnetoforézu. Důležitý je taky vliv pH.

Výhodou modifikovaného uvolňování léčiva oproti léčivým přípravkům s neřízeným (tedy krátkodobým) uvolňováním jsou výhodnější hladiny léčiva a lepší využití léčiva, to znamená, že je potřeba několikanásobně méně léčiva než u „klasických“ léčivých přípravků. Rovněž tím dochází ke snížení toxicity. Další předností těchto systémů je uvolňování léčiva v blízkosti místa účinku, z čehož vyplývá, že stačí nižší dávky léčivé látky. V neposlední řadě je výhodou snížení frekvence aplikací.

K systémům s řízeným uvolňováním patří i topicky aplikované přípravky – výhodou topicky aplikovaných polymerních nosičů s léčivem je možnost dávkování léčiva podle výběru vhodného polymerního materiálu, snadná aplikace, netoxicity, biokompatibilita.

Při použití systémů s modifikovaným uvolňováním léčiva mohou nastat biokinetické problémy, například jiný než hepatální first pass efekt (dermální), dále nízká koncentrace léčiva, která nestačí nasycit metabolizující enzymy, a cirkadiální rytmy, kde by mohlo být řešením využití pulzní liberace.²

4.1.1.1 Targeting

Jedná se o cílený transport léčiva spolu s nosičem na místo jeho působení (např. orgán či tkáň). Léčivo tvoří spolu s nosičem integrovaný celek, který má společnou absorpci a distribuci.

Cílenou distribucí léčiva se dosáhne vysoké místní koncentrace léčiva, a tak se zmírní jeho potencionální vedlejší účinky. Proto je targeting vhodný zejména pro vysoce toxická léčiva a pro léčiva mající úzký terapeutický index.

Cílenou distribucí se dosáhne zvýšení dostupnosti léčiva v místě působení nebo v místě aplikace a současně je sníženo toxické působení léčiva. K dosažení optimálního targetingu je nutné respektovat farmakokinetické vlastnosti léčiva i odpovídajícího proléčiva. Proléčivo by mělo být přednostně doručováno a aktivováno v místě působení, léčivo by mělo být adekvátně zadrženo v místě jeho účinku. Důležité je vzít v úvahu stav organismu (nemoci, etiologie, transport přes membrány a další metabolické vlastnosti využitelné při cílenou distribuci léčiva).

Kvantitativně lze targeting vyjádřit pomocí zavedených parametrů jako je terapeutický index (TI). Ten je dán poměrem mezi dávkou letální nebo toxickou a dávkou efektivní a vyjadřuje poměr mezi účinností a nebezpečím podané látky.³ Po podání léčiva bez cílené distribuce se určí hodnota TI a obdobně po podání léčiva s cílenou distribucí je určena hodnota TI'. Targeting lze realizovat v případě, že poměr TI'/TI je větší než jedna.

Targeting může být rovněž popsán pomocí DTI (parametru drug targeting index). Jestliže plochy pod křivkami závislosti koncentrace na čase (AUC) odpovídají účinku a toxicitě léčiva, může být DTI definováno následovně:

$$DTI = \frac{AUC_{R-t\ arg\ et} / AUC_{T-t\ arg\ et}}{AUC_{R-nont\ arg\ et} / AUC_{T-nont\ arg\ et}} \quad (1)$$

$AUC_{R. target}$, $AUC_{T. target}$, $AUC_{R. nontarget}$, $AUC_{T. nontarget}$ vyjadřují plochy pod křivkami terapeutických (R) a toxických (T) hladin léčiva s targetinem a léčiva bez targetingu.

DTI může být rovněž definováno pomocí ustálené koncentrace (C_{ss}) léčiva v místě účinku a v místě toxického působení po podání léčiva s cílenou distribucí a léčiva bez cílené distribuce.

$$DTI = \frac{C_{R-SS-t\ arg\ et} / C_{T-SS-t\ arg\ et}}{C_{R-SS-nont\ arg\ et} / C_{T-SS-nont\ arg\ et}} \quad (2)$$

Ačkoli DTI dává více přesné informace o targetingu než poměr terapeutických indexů, neposkytuje informace ohledně jednotlivých farmakokinetických parametrů.⁴

4.1.1.2 Proléčiva

Proléčiva jsou studována a vytvářena s cílem obejít biologické bariéry, například v případě nízké gastrointestinální permeability nebo významného first pass efektu, aby se zlepšila distribuce léčiva v organismu. Vznikla domněnka, že zvýšená hladina léčiva v systému bude mít za následek silnější odpověď organismu, a tím i silnější farmakologickou odpověď a potencionálně nižší požadavky na dávkování léčiva. Hlavní nevýhodou je kromě zvýšení hladiny léčiva v místě účinku také potencionální zvýšení toxicity léčiva. Tento typ neselektivního proléčiva je vhodný zejména pro vysoce polární léčiva, která jsou podávána lokálně. Výsledkem je vznik méně polárního proléčiva. Příkladem takovéto aplikace je dipivaloylového derivátu epinefrinu, dipivefrinu, který je snadno enzymaticky rozštěpen v oku⁵ a který je mnohem více terapeuticky účinný a méně kardiotoxický než epinefrin.⁶

Při výzkumu poléčiv pro cílenou distribuci je důležité si uvědomit, že fyzikálně chemické vlastnosti proléčiva vyžadovány pro optimální aktivitu in vitro, nemusí odpovídat fyzikálně chemickým vlastnostem proléčiva vyžadovaných pro optimální účinek léčiva in vivo. Důvodem je formulace do požadované lékové formy. Dobrým příkladem rozdílů mezi daty pro in vitro a in vivo jsou studie s proléčivy s protinádorovými látkami, jedná se například o doxorubicinový derivát s aminokyselinami.⁷ Byla vyslovena hypotéza, že podstatně zvýšené hladiny aktivátorů plasminogenu v mnoha nádorových buňkách vytvořily zvýšenou hladinu proteolytického enzymu plasminu, což vede k selektivní aktivaci proléčiva v místě nádoru. In vitro vykazují tato proléčiva selektivní aktivaci a zvýšení cytotoxicity, zatímco in vivo zvýšená protinádorová aktivita chyběla. Existují dva důvody: tyto proléčiva představují příliš polární substrát pro enzymy aktivní v nádorových buňkách a/nebo bioaktivace těchto proléčiv nastane v místě s vysokou aktivitou proteázových enzymů (například nespecifické esterázy v játrech).

1. Farmakokinetické důvody

Targetingu může být dosaženo kombinací dvou procesů: cíleným transportem do místa účinku a aktivací v místě účinku. Použitím cíleného transportu může být léčivo farmakologicky nebo toxikologicky aktivní na různých místech v organismu, ale díky vlastnostem proléčiva je toto proléčivo přednostně transportováno k místu účinku či odpovědi. Při specifické aktivaci v místě účinku může být léčivo volně distribuováno v organismu, ale je přednostně aktivováno v místě působení. Z terapeutického hlediska je pro optimální targeting důležité, aby po konverzi proléčiva bylo léčivo přiměřeně zadrženo v místě působení tak, aby zajistilo optimální farmakologický efekt.⁴

2. Příklady

Targeting antivirotik

Jeden z nejlepších a nejjednodušších příkladů targetingu antivirových léčiv pomocí proléčiva je aciklovir. Cílené distribuce léčiva je v tomto případě dosaženo primárně pomocí aktivace v místě účinku. Aciklovir se po vstupu do virem napadené buňky přeměňuje na farmakologicky aktivní trifosfátový ester.⁸ Tato aktivace probíhá za působení virového enzymu thymidinkinázy. Aciklovirtrifosfát brání selektivní inhibicí virové DNA – polymerázy další virové syntéze. Díky této specifické aktivaci má aciklovir vysokou terapeutickou aktivitu proti herpes virům, žádnou aktivitu proti adenovirům, minimální metabolické degradace po systémovém podání a velmi nízkou toxicitu proti neinfikovaným hostitelským buňkám.^{9,10}

Targeting do tlustého střeva

Cílená distribuce léčivých látek do tlustého střeva využívá jak cíleného transportu, tak aktivaci. Proléčiva jsou tvořena spojením léčiva a hydrofilní části, která je přístupná štěpení pomocí enzymů vylučovaných bakteriální mikroflórou gastrointestinálního traktu. Po orálním podání proléčiva je absorpce léčiva v žaludku a tenkém střevě snížena díky polární části, to znamená, že nejvyšších hladin léčiva podaného jako proléčivo je dosaženo v tlustém střevě. Tam enzymy sekretované bakteriemi katalyzují konverzi proléčiva na lipofilnější léčivo, které je takto vhodně uzpůsobené pro absorpci přes membránu tlustého střeva.^{11,12} K proléčivům fungujících na výše popsaném principu patří sulfasalazin, což je salicylový derivát sulfapyridinu.^{13,14} Po orálním podání sulfasalazinu se velké procento takto

modifikovaného léčiva dostane do tlustého střeva, kde je přeměněno za pomoci azo – reduktázy produkované bakteriální mikroflórou. Vzniklá účinná látka, 5 – aminosalicyllová kyselina¹⁵, tak může být absorbována v místě účinku, zatímco absorpce volného sulfapyridinu, který je odpovědný za vedlejší účinky, je v horní části gastrointestinálního traktu snížena. Rovněž probíhají studie glykosidových^{16,17} a glukuronidových^{18,19,20} proléčiv pro látky jako dexamethason, naloxon a menthol, která využívají bakteriální glykosidázu a glukuronidázu.

Targeting protilátek

Monoklonální protilátky mohou být ideální pro cílenou distribuci léčiv do nádorových buněk díky svému vysokému stupni specifity a snadnosti jejich izolace a manipulace. V praxi však existuje několik omezení zahrnující jejich pomalou eliminaci z krve kvůli nízké vaskulární permeabilitě a renální clearance; nízké a heterogenní vychytávání nádorových buněk a zkříženou reaktivitu protilátek i proti normálním buňkám, jelikož mnoho antigenů není nádorově specifických. Některé problémy mohou být vyřešeny pomocí chemické modifikace,²¹ společného podání imunosupresivních látek,²² použitím malých imunokonjugátů nebo protilátek, které mají jak vazebné místo pro antigen, tak pro aktivaci proléčiva.²³

Imunokonjugáty jsou makromolekulární proléčiva, která jsou vytvořena kovalentním spojením cytotoxické látky a monoklonální protilátky reagující s nádorovými antigeny. Po vazbě imunokonjugátu na nádorovou buňku musí být léčivo odštěpeno od protilátky; tento proces probíhá intracelulárně po inkorporaci imunokonjugátu do buňky.²⁴

Další možností je ADEPT (Antibody – Directed Enzyme Prodrug Therapy), který je realizován podáním enzymu spojeného kovalentně s monoklonální protilátkou, která se selektivně váže na antigen na nádorové buňce. Po podání a umístění konjugátu protilátky s enzymem na nádorové buňce je podáno proléčivo, které se po kontaktu s enzymem přemění na účinnou látku. Důležitým faktorem je optimalizovat časový interval mezi podáním konjugátu protilátka – enzym a proléčiva.

Dále rovněž probíhají studie týkající se cílené distribuce do ledvin, jater a mozku.⁴

4.2 Biodegradabilní polyestery kyseliny glykolové a kyseliny mléčné

První syntetické resorbovatelné polymery vytvořené speciálně pro používání jako šicí materiály byly polyglykolidy známé jako poly(glykolové kyseliny).²⁵ Od roku 1970 se v praxi používá vstřebatelný šicí materiál *Dexon*[®]. Současně začal výzkum alifatických polyesterů odvozených od mléčné kyseliny a vedl k prvnímu kopolyměru kyseliny glykolové a mléčné (PLGA) používaného pod názvem *Vicryl*[®].²⁶ Použitím vstřebatelného šicího materiálu odpadá chirurgické odstranění stehů po vyléčení. V současnosti jsou vstřebatelné polyestery široce využívány v ortopedii a chirurgii jako alternativa kovových implantátů (spojovací, podpurný a výplňový materiál).

Výzkum polymerů, kopolymerů, stereopolymerů kyseliny glykolové a mléčné byl rozsáhlý a výsledkem je celá řada systémů s řízeným uvolňováním léčiv, zejména implantačních a injekčních. Uvolňování léčiv z těchto systémů je značně závislé na degradaci polyesterů. Doba degradace a tedy i liberace inkorporovaných léčiv trvá řádově od několika týdnů až rok v závislosti zejména na charakteru kopolymeru.^{27,28}

Akademický i průmyslový výzkum se zaměřil na studium mechanismu biodegradace těchto polymerů a dále na faktory ovlivňující syntézu polyesterů, formulaci terapeutických systémů a možnosti jejich sterilizace.^{27,29}

4.2.1 Syntéza PGA, PLA, PLGA

Existuje několik způsobů syntézy alifatických polyesterů typu PLGA, zejména stupňovitá polymerizace enantiomerů mléčné kyseliny a/nebo glykolové kyseliny, postkondenzace makromonomerů nebo polymerizace za otevření kruhu.

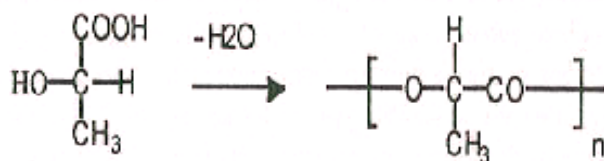
Nízkomolekulární kopolymery o molekulové hmotnosti kolem 10 000 mohou být připraveny řízenou polykondenzací (polyesterifikací) mléčné a glykolové kyseliny.³⁰ za zvýšené teploty (130 – 210°C). Takto vzniknou kopolymery s malou mechanickou pevností a rychlou degradací.³¹

Vysokomolekulární polymery glykolové a mléčné kyseliny (molekulová hmotnost 10 000 až 40 000) nelze připravit přímou kondenzací karboxylových kyselin, proto je polyglykolid a polylaktid připravován polymerizací za otevření kruhu jejich cyklických diesterových dimerů, glykolidu a laktidu. Prvním krokem přípravy monomerů glykolidu a laktidu je kondenzační reakce glykolové nebo mléčné kyseliny

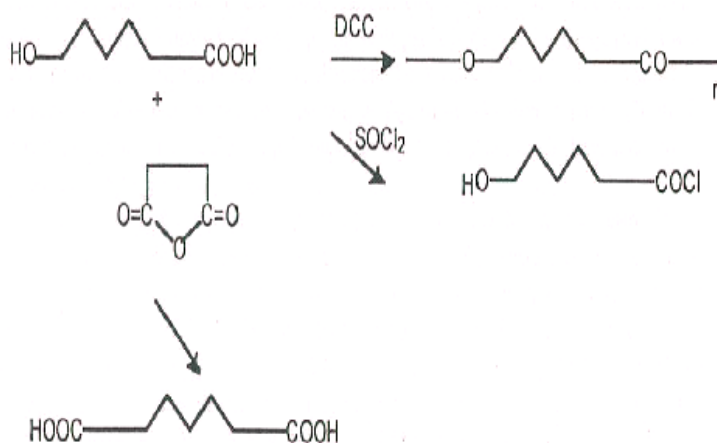
na nízkomolekulární kondenzační polymery. Ty jsou pak termálně štěpeny a formují se šestičlenné cyklické diestery. Krystalické cyklické diestery jsou čištěny destilací nebo rekrystalizací, a potom polymerizovány za otevření kruhu. Polymerizace pokračuje do získání polymeru s požadovanou molekulovou hmotností.³²

Obr. 1: Schéma syntézy

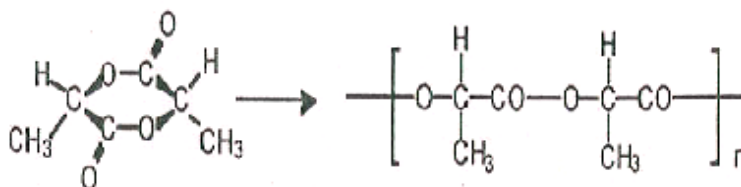
a) polykondenzace (step – growth polymerization)



b) polykondenzace + funkcionalizace + následné reakce



c) polymerizace za otevření kruhu (ring opening polymerization)



4.2.2 Vlastnosti polyglykolové a polymléčné kyseliny

Polyglykolová kyselina (PGA) je biodegradabilní, vysoce krystalický polymer s krystalinitou v rozmezí 35% až 75%. Teplota tání je okolo 225°C a teplota skelného přechodu se pohybuje okolo 35°C. Molekula PGA obsahuje nepolární methylenovou a polární esterovou skupinu. Jedná se tedy o polymer nerozpustný ve většině organických rozpouštědel, má velmi vysokou pevnost a modul elasticity. Biodegradace probíhá hydrolýzou nestabilních esterových vazeb. Doba degradace závisí na molekulové hmotnosti, stupni krystalinity a fyzikálně chemických vlastnostech prostředí.³³

Polymléčné kyseliny (PLA) díky přítomnosti methylové skupiny na alfa – uhlíku má odlišné chemické, fyzikální i mechanické vlastnosti. Díky tomuto chirálnímu uhlíku jsou možné L,D a DL izomery PLA. PLA může tedy existovat buď v opticky aktivní formě L – PLA nebo v opticky inaktivní racemické směsi DL – PLA.³⁴ L – PLA je tvořena z L(-) – laktidu, D – PLA z D(+) – laktidu a DL – PLA z DL – laktidu, který je racemickou směsí L(-) a D(+) izomeru. Nejvíce využívány jsou L – PLA, DL – PLA a jejich kopolymery.

L – PLA je biodegradabilní, semikrystalický polymer s krystalinitou okolo 35%.³⁵ Jedná se o polymer rozpustný ve většině organických rozpouštědel (chloroform), polymer má velkou pevnost, ale nižší modul elasticity. Teplota tání je kolem 175°C a teplota skelného přechodu asi 65°C.³⁶

DL – PLA je amorfní polymer s teplotou skelného přechodu kolem 57°C.³⁶ Tento polymer má malou pevnost i modul elasticity, je ale hydrolyticky stabilnější než PGA, hlavně díky sterickému bránění esterových vazeb methylovou skupinou. Amorfní DL – PLA degraduje rychleji než semikrystalická L – PLA.³⁷

Kopolymery mají různé fyzikální i mechanické vlastnosti i odlišnou rychlost biodegradace.³⁸ Kopolymery s vyšším obsahem PLA jsou méně hydrofilní, absorbují málo vody, a proto i pomaleji degradují.³¹ Výsledný stupeň krystalinity PLGA závisí na poměru GA a LA. Pokud je připraven z L – PLA a PGA vznikne krystalický kopolymer, naopak kombinací DL – PLA a PGA vznikne amorfní kopolymer.³⁹ Teplota skelného přechodu se zvyšuje v závislosti na vzrůstajícím podílu LA v kopolymeru a na zvyšující se molekulové hmotnosti.⁴⁰

4.2.3 Mechanismy degradace

Při kontaktu s vodným médiem nastává penetrace vody do polymeru. Hydratace amorfni části polymeru je rychlejší než části krystalické. Dalším krokem je hydrolytické štěpení esterových vazeb. Každé štěpení esterové vazby vytvoří novou koncovou karboxylovou skupinu, která může katalyzovat hydrolytickou reakci dalších esterových vazeb v případě homogenní degradace. Dochází tedy k redukci kovalentních vazeb, průměrné molekulové hmotnosti polymeru a ke změně jeho fyzikálních vlastností. Nejprve probíhá degradace amorfni, až poté krystalické části. Jakmile je molekulová hmotnost částečně degradovaných makromolekul dostatečně nízká, aby mohlo dojít k rozpuštění ve vodném prostředí, začne difúze v celém objemu polymeru. Tento proces kombinující difúzi, chemickou reakci a rozpouštění vyúsťuje v rozdíly mezi mírou povrchové degradace a objemové degradace.

Posledním stadiem degradace je eliminace, to znamená, že L – laktát vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselin (citrátový cyklus), kde je metabolizován a z těla vyloučen ve formě oxidu uhličitého a vody. Glykolát je buď vyloučen ledvinami v nezměněné formě, nebo je přes citrátový cyklus metabolizován a vyloučen ve formě oxidu uhličitého a vody.

Průběh hydrolytické degradace PLGA určuje zejména: konstantní stupeň hydrolyzy esterové vazby, koeficient difúze vody v matrici, koeficient difúze částí řetězce v matrici polymerů a rozpustnost produktů degradace, hlavně oligomerů, v okolním kapalném médiu. Dalšími ovlivňujícími faktory je například teplota, přísady do polymerní matrice či do okolního média, pH, velikost, tvar a porozita polymerů aj.

4.2.4 Implantáty tvořené PLGA

Implantáty připravené z PLGA polymerů jsou obvykle ve formě vláken, lisovaných tablet, extrudovaných formách nebo filmech.

1. Vlákna

Biodegradabilní vlákna jsou obvykle připravována z kyseliny polymlečné (PLA₁₀₀) technikami víření a mohou být tvořeny jako celistvá vlákna⁴¹ nebo jako dutá vlákna⁴² Tato vlákna mohou být aplikována subkutánně použitím menších jehel, než je zapotřebí u jiných typů implantátů. Léčivé látky jsou inkorporovány do centra dutých

vláken ve formě roztoku a konce těchto vláken jsou poté utěsněny. Rychlost uvolňování léčivé látky je závislá především na struktuře membrány stěny dutého vlákna.

2. Tablety

Častou a běžnou metodou přípravy tablet nebo pelet z PLGA polymerů pro implantaci je přímé lisování založeno na klasických farmaceutických technikách. Tablety připravené lisováním nízkomolekulární poly(DL – mléčné kyseliny) (PDLA) s průměrnou molekulovou hmotností 2000 a méně se používají jako nosiče léčiv s časově závislým uvolňováním pro celou řadu látek (chinin sulfát, propanolol hydrochlorid, kalcitonin, agonista luteinizačního hormonu a další).⁴³ U tablet připravených z výšemolekulární PDLA bylo zaznamenáno zpoždění (lag – time) v degradaci i uvolňování léčivé látky. Jestliže je nosič tvořen jak nízkomolekulární PDLA, tak vysokomolekulární PDLA (např. dvouvrstvé tablety), čas in vivo degradace stoupá z pěti až ke dvaceti týdnům s počátečním časem zpoždění stoupajícím od nuly k deseti týdnům. Tato technika je využita například při přípravě dvouvrstevného implantátu pro doručování insulínu.⁴⁴ Tyto dvě vrstvy se skládají ze samotné tenké vrstvy PLA₅₀ a milimetr tlusté vrstvy PLA a insulínu. Při testování těchto implantátů in vivo byla aktivita pozorována po dobu 15 dní. Provedení těchto implantátů závisí na množství insulínu a přítomnosti druhé vrstvy PLA, stejně jako na tloušťce této PLA vrstvy.

3. Implantáty připravené extruzí

Extrudované matricové nosiče léčivých látek jsou obvykle připravené z koncentrovaného roztoku polymeru v rozpouštědle (aceton), ve kterém je léčivá látka buď dispergována nebo rozpuštěna, nebo použitím pevných materiálů a zvýšených teplot. Tyto tělesa bývají často ve formě válců a mohou být použita jako monolitické matricové systémy uvolňování léčiv nebo obalené vrstvou PLA k dalšímu omezení degradace a následnému uvolňování léčivé látky.^{45,46,47} Z neobalených matric obsahujících 30 – 40% léčiva se léčivo uvolňuje hlavně difúzí, u obalených matric obsahujících 15% a méně léčiva převládá osmoticky řízené uvolňování, jehož okamžitá rychlost je úměrná druhé mocnině času. Neobalené matrice obsahující velmi málo léčiva, 2 – 10%, vykazují určité zpoždění uvolňování následované rychlým uvolněním léčiva.⁴⁷ Zpoždění uvolňování závisí na molekulové hmotnosti použitého polymeru. Nízkomolekulární polymery mají kratší lag – time. Mezi léčiva používaná v těchto

systemech patří albumin, vacomycin hydrochlorid, gentamycin sulfát, isoniazid, testosteron, estradiol a melanotan.⁴⁵⁻⁴⁷

4. Filmy

Filmy z PLGA polymerů obsahující různá léčiva mohou být rovněž připraveny jednoduchým rozpouštěním polymeru ve vhodném rozpouštědle (aceton, chloroform, dichlormethan, etylacetát a další) odlitím roztoku léčiva a polymeru do požadovaného tvaru a odpařením rozpouštědla.

5. Další implantáty

Další implantáty připravené z PLGA polymerů jsou tobolky, které prasknou a uvolní obsah léčivé látky v předem určeném čase⁴⁸ a implantáty in situ.⁴⁹ Tobolky s pulzním uvolňováním léčivé látky se skládají z prázdného válce PLA₅₀, který je jedním koncem pevně uzavřen a na druhém konci je permeabilní membrána PLA_{37,5}GA₂₅. Uvnitř válce je roztok léčiva ve vhodném rozpouštědle. Voda, která projde přes semipermeabilní membránu vytvoří tlak uvnitř tobolky a takto se uvolní léčivo (např. folikuly stimulující hormon) obsažené ve vnitru PLGA válce.

Rovněž jsou studovány možnosti využití polymerů formulujících implantáty po vpichu do podkoží. Důležitá je volba vhodného rozpouštědla (dimethylsulfoxid nebo N – methyl – 2 – pyrrolidin).⁴⁹

4.3 Kopolymery z PLA, PLGA polymerů a dalších materiálů

4.3.1 Kopolymery s poly(ethylen glykolem) a poly(ethylenoxidem)

Jedná se o kopolymery vytvořené kombinací poly(ethylen glykolu) (PEG) nebo poly(ethylenoxidu) (PEO) s PLA nebo PLGA. Struktura PEG a PEO je stejná, PEG se obvykle řadí k polymerům s molekulovou hmotností nižší než 20 000 a PEO k polymerům s vyšší molekulovou hmotností. Snahou je zkombinovat hydrofilní a biokompatibilní vlastnosti PEG s degradabilními vlastnostmi PLGA, aby byly získány kopolymery, jejichž vlastnosti by se měnily od hydrofilních k hydrofobním, od nedegradabilních k degradabilním v závislosti na přesném složení.

Kopolymery s PEG nebo PEO jako centrální částí jsou obvykle připravovány polymerizací. Studie biokompatibility ukazují, že polymery PLA – PEO – PLA mají velmi podobné a minimální nepříznivé reakce v tkáních organismu.

4.3.2 Kopolymery s ϵ – kaprolaktonem

Jedná se o kopolymery PLA nebo PGA s ϵ – kaprolaktonem. Kopolymery s 50% ϵ – kaprolaktonu byly zkoušeny jako implantáty pro regeneraci menisku.⁵⁰ Tyto polymery podléhají objemové degradaci, během které dochází k separaci na krystalickou fázi obsahující hlavně L – laktid a amorfní fázi složenou především z ϵ – kaprolaktonu.

4.4 Nové polymery ve farmacii

1. Polyester – amidy

Polyamidy jsou polymery s amidovými skupinami v hlavním řetězci. Vznikají kondenzací diaminů s dikarboxylovými kyselinami nebo s chloridy dikarboxylových kyselin. Díky pevným vodíkovým vazbám mezi amidovými skupinami jednotlivých řetězců mají lepší mechanické vlastnosti.

Kombinací polyamidů a polyesterů můžeme připravit materiál s vlastnostmi, který by vyhovoval žádanému profilu – dostatečná pevnost a vhodná rychlost odbourávání. Obecně probíhá příprava kopolymerizací dikarboxylových kyselin s dioly a diaminy za vzniku pomalu odbouratelných polyamidů. Ty se používají jako vstřebatelné šicí materiály.⁵¹

2. Polyester – imidy

Polyimidy jsou výhodné pro svou termostabilitu, mechanickou pevnost a dobré elektrické vlastnosti. Nevýhodou je jejich špatná rozpustnost ve většině organických rozpouštědel.

3. Polyester – uretany

Polyuretany se připravují z oligo – nebo polyesterů a polyetherů, kdy jejich koncové hydroxyskupiny reagují s aromatickými diisokyanáty. Vzniklý polymer se skládá z měkkých a tvrdých segmentů. Polyuretany mohou vypadat jako měkká nebo tvrdá pěna, elastomer, termoplast nebo modelovací hmota. Polyuretany podléhají hydrolytické a enzymatické degradaci, dále i oxidativní, teplotní a mechanické degradaci.

4. Polyester – anhydridy

V řetězci polyanhydridů se střídají estrové a anhydridové segmenty. První krok syntézy je kondenzace dikarboxylových kyselin s dioly, v druhém kroku se koncové esterové skupiny převedou na anhydridy pomocí acetanhydridu a poslední krok spojí dílčí části za vzniku polyester – anhydridu. Takto lze připravit polymery o různých vlastnostech. Jsou perspektivní jako nosiče léčiv.

5. Polyether – estery

Polyether – estery jsou tvořeny střídajícími se bloky polyetherů a polyesterů. Jsou to termoplastické elastomery. Spojením polyetylenglykolu a polyetylentereftalátu se zvýší hydrofilita, která zajistí degradaci po několik měsíců. Jejich využití je především v chirurgii⁵². Kopolymerizací polyethylenglykolu s polybutylentereftalátem vzniká polyester s měkkými etherovými a tvrdými aromatickými segmenty.⁵³ Tento polymer byl vyvinut pro několik aplikací jako je kostní endoprotéza⁵⁴ či terapeutické systémy s řízeným uvolňováním.⁵⁵

6. Polyfosfazeny

Mají lineární strukturu tvořenou anorganickým řetězcem, ve kterém se pravidelně střídá atom fosforu a dusíku. Polyfosfazeny jsou díky své hydrolytické nestabilitě, netoxickým rozkladným produktům, snadné přípravě vláken a permeabilitě vhodné pro tvorbu systémů s řízeným uvolňováním léčiv.⁵⁶ Dělí se do dvou skupin podle substituentů. První skupinou jsou aminové polyfosfazeny, substituenty jsou estery aminokyselin a imidazoly. Polyfosfazeny s imidazolovými substituenty degradují rychleji, u aminoesterových derivátů byly snahy zrychlit degradaci zavedením hydrolyticky citlivějších skupin. Druhou skupinu tvoří alkoxy – substituované polyfosfazeny, z nichž některé jsou rovněž biodegradabilní.

7. Polyfosfoestery (PPE)

Polyfosfoestery mají anorganický fosfoesterový základní řetězec lišící se organickými substituenty. Lze je rozdělit podle hydrofility na hydrofobní a hydrofilní polyfosfoestery.

Hydrofobní polyfosfoestery jsou biokompatibilní i biologicky odbouratelné. Byly vyvinuty pro možnou aplikaci léčiv, proteinů nebo plazmidů. Rozsáhlé použití je dáno přítomností pětivazného fosforového atomu. Významný je kopolymer polylaktid – co – ethylfosfát (PLE) vzniklý kopolymerizací s polymerem kyseliny DL – mléčné. Začleněním ethylfosfátu mezi segmenty kyseliny DL – mléčné se zvýší rozpustnost ve vodě a rovněž in vitro degradace probíhá rychleji než u samotné kyseliny DL – mléčné.

Hydrofilní polyfosfoestery jsou ve vodě rozpustné kationické polymery, potenciální nosiče genů. Elektrostatické interakce mezi kationickým polymerem

a záporně nabitou molekulou DNA vytváří komplex nanočástic chráněný proti enzymové degradaci.

8. Polyalkylkyanoakryláty (PACA)

Alkylkyanoakryláty se používají pro své adhezivní vlastnosti jako vstřebatelné krytí ran kůže⁵⁷ či embolizační materiál.⁵⁸ Jedná se o bezbarvé tekutiny o nízké viskozitě. Díky své vysoké reaktivitě mají tendenci ihned polymerovat.

4.5 Mykotické infekce

Mykózy jsou onemocnění, které jsou charakterizovány kolonizací, následnou proliferací a případnou diferenciací a sporulací houby v tkáních nebo v tělních tekutinách hostitele, jež má za následek jeho poškození.

K přenosu houbové nákazy dochází jednak inhalací houby, nejčastěji konidií, dále kontaktem, a to buď přímým s nemocným člověkem, zvířetem či zdravým nosičem, nebo kontaktem nepřímým prostřednictvím infikovaných předmětů. Dále může dojít k přenosu houbové infekce poraněním, to znamená narušením a překonáním přirozené bariéry – kůže nebo sliznice.

Podle anatomické lokalizace lze houbové infekce rozdělit na povrchové, kožní, podkožní a hluboké. Povrchové mykózy jsou lokalizovány v nejsvrchnějších vrstvách kůže a kutikule vlasů. Kožní infekce neboli dermatomykózy jsou infekce, které postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly a nehtové lůžko. Toto onemocnění je doprovázeno imunitní reakcí, projevující se patologickými změnami hlubších partií kůže. Podkožní mykózy jsou podmíněny traumatickou inokulací mykotického agens; postiženy bývají hlubší vrstvy dermis, subkutánní tkáň, někdy i kosti. Onemocnění se projevuje typickými kožními a podkožními lézemi. Podkožní mykózy mají většinou chronický charakter. Hluboké nebo také orgánové či systémové mykózy postihují jeden nebo více orgánů, které mohou diseminovat a přejít do septického stavu, zvláště u imunoalterovaných pacientů.

Mykózy lze také dělit podle rozsahu postižení na lokalizované, kdy je zasažen jeden orgán či určitá anatomická lokalita, nebo mykózy systémové, kdy je postiženo více orgánů.⁵⁹

Rovněž lze rozlišovat primární a sekundární mykózy. Primární jsou způsobeny dimorfními houbami (primárně patogenní houby rodu *Blastomyces* – blastomykóza, *Coccidioides* – kokcidioidomykóza, *Histoplasma* – histoplasmóza), v některých případech kvasinkou *Cryptococcus neoformans* (kryptokokóza).

Kryptokokóza je závažné systémové onemocnění s afinitou k CNS, které postihuje hlavně jedince s imunodeficiencí, ale je rovněž popisováno u zdravých lidí. Vstupní branou nákazy jsou dýchací cesty a většina infekcí má symptomatický průběh, nejčastěji se manifestuje jako kryptokoková meningitida, občas se setkáme s kožní nebo plicní formou. Lékem volby je flukonazol.

Sekundární neboli oportunní mykózy jsou infekce u imunoalterovaných pacientů způsobené oportunními houbami, které pro zdravého, imunokompetentního pacienta nepředstavují reálné nebezpečí. Nejčastěji se s nimi setkáváme jako s nozokomiálními nákazami. Jsou vyvolávány zejména kandidami (*Candida albicans*, také non – *albicans* druhy: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. crusei*), aspergily (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*), kryptokoky a zygomycetami.

Kandidóza je způsobena kvasinkami rodu *Candida*, který je nejčastější původce nozokomiálních mykóz, *Candida albicans* je součástí přirozené mikroflóry člověka, a proto i většina kandidových infekcí je endogenního původu. Rizikovými faktory pro vznik kandidózy je dlouhodobá terapie širokospektrými antibiotiky, krevní malignity, imunosupresivní léčba, diabetes mellitus, imunodeficience a další. U onemocnění převládají slizniční formy – orofaryngeální (sór) a vulvovaginální, dále onychomykóza či keratitida. Terapie závisí na klinické formě a stavu imunity hostitele, ve většině případů je lékem volby flukonazol.^{3,59}

4.6 Antimykotika

4.6.1 Azolová antimykotika

Systemová azolová antimykotika jsou syntetické látky se širokým spektrem účinku mající společný mechanismus fungistatického účinku. Ten spočívá v inhibici enzymů konečné fáze syntézy ergosterolu, který je hlavní strukturální sterol plazmatické membrány hub. K inhibici konverze lanosterolu na ergosterol dochází prostřednictvím enzymu C – 14 – alfa – demetylázy, jehož blokáda je klíčovým krokem účinku azolových antimykotik. Katalytická aktivita tohoto enzymu je závislá na cytochromu P450, což souvisí s výskytem nežádoucích účinků při léčbě těmito antimykotiky.

Antimikrobní spektrum azolových antimykotik zahrnuje *Candida* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Phialophora* spp., dermatofyty (rody *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*). U kryptokokových infekcí, aspergilózy a zygomakózy jsou většinou neúčinné nebo je jejich účinek nestabilní. Účinnost se ale uvádí i u některých grampozitivních bakterií a enterokoků.³

Tab. 1: Farmakokinetické vlastnosti azolových systémových antimykotik

Azolová systémová antimykotika	Vazba na bílkoviny (%)	Distribuční objem V_d (l/kg)	Frakce vyloučená do moči (%/24 h)	Biologický poločas $T_{1/2}$ (h)
Mikonazol	více než 90	2 – 3	15 – 20	23
Ketokonazol	98	1,4	Méně než 5	8
Flukonazol	11	0,8	70 – 90	20 – 30
Itrakonazol	více než 99	?	1	30

Celá skupina systémových azolových antimykotik má principiálně podobný fungistatický až fungicidní účinek, ale u jednotlivých azolových antimykotik jsou popisovány ještě další účinky, např. u itrakonazolu dochází k ovlivnění imunitních mechanismů.

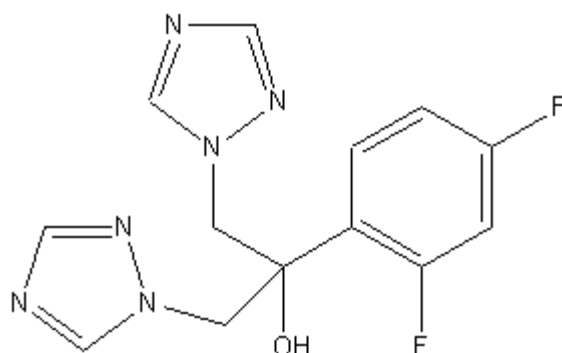
U azolových chemoterapeutik rozlišujeme tři generace – první je zastoupena imidazolovými deriváty jako je mikonazol, ekonazol a klotrimazol, druhá generace zahrnuje ketokonazol, oxikonazol, terkonazol, bifonazol, tiokonazol, isokonazol a další. Průlomem v terapii mykóz bylo zavedení třetí generace triazolových derivátů flukonazolu a itrakonazolu do praxe.^{3,59}

4.6.1.1 Flukonazol

Jedná se o novější systémové triazolové antimykotikum pro parenterální i perorální podání. Je to bis – triazolový derivát propanolu ze skupiny azolových antimykotik s vysokou antifungální specifitou účinku. Od ostatních azolových antimykotik se liší farmakokinetikou (je hydrofilní), má nejvyšší terapeutický index, nejméně nežádoucích účinků a lékových interakcí.

Obr. 2: Strukturální vzorec flukonazolu

2-(2,4-Difluorfenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol



Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu, inhibicí syntézy buněčné stěny se také omezuje kolonizace sliznic a adheze kandid na endotel či umělé povrchy (katetry, chlopenní a kloubní náhrady).

Antimikrobní spektrum flukonazolu zahrnuje: *Candida* spp., která je nejcitlivější, *Cryptococcus* spp., dermatofyty, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* a další. Primárně rezistentní je *Candida krusei*, vysoká incidence získané rezistence je nalézána u *Candida glabrata*. Je převážně neúčinný u aspergilózy, zcela neúčinný u zygomykózy.

Po perorálním podání se flukonazol rychle a téměř úplně vstřebává, takže koncentrace v plazmě jsou obdobné po perorálním i nitrožilním podání. Potrava absorpci neovlivňuje. Vazba na bílkoviny plazmy je nízká (10 – 12%), dobře proniká do všech tkání a tělesných tekutin včetně likvoru, placenty a mateřského mléka. V moči a kůži jsou koncentrace 10 x vyšší, 2 – 3 x vyšší jsou i ve fagocytujících buňkách; v kůži a nehtech vytváří dlouhodobé depot. Z 80% je vylučován ledvinami

(glomerulární filtrací) v aktivní formě, biologický poločas (25 – 30 hodin) se prodlužuje při poškození renálních funkcí.

Nežádoucími účinky flukonazolu jsou většinou nezávažné dyspeptické obtíže, dále bolesti hlavy, gastrointestinální obtíže (bolesti břicha, zvracení či průjem), kožní exantém. Velmi vzácně může dojít při léčbě flukonazolem k toxickému poškození jaterní buňky s rizikem letálního zakončení nezávisle na dávce.

Obecně platí, že interakce azolových antimykotik jsou četné, protože se azolová antimykotika metabolizují v játrech v mikrosomálním systému s cytochromem P450 3A. Ke zvýšení účinnosti současně podávaných léků s nutností redukce jejich dávky dochází u derivátů sulfonylurey, warfarinu, midazolamu, triazolamu. Existuje také riziko zvýšení nefrotoxicity cyklosporinu A. Snížení účinku flukonazolu se uvádí při současném podávání rifampicinu.

Flukonazol vykazuje v kombinaci s jinými antimykotiky synergický účinek, zejména s flucytosinem a mikonazolem, ale převážně antagonistický účinek s amfotericinem.

Klinické použití azolových antimykotik je především u kandidových infekcí. Flukonazol se používá i k primární a sekundární profylaxi u rizikových nemocných (dospělých i dětí).

Tab. 2: Klinické použití flukonazolu

Nejdůležitější klinické indikace
Kandidózy: systémové (orgánové), kandidémie, v útočné i udržovací léčbě u imunokompromitovaných nemocných; slizniční orofaryngeální, chronická orální atrofická kandidóza, jícnová, mukokutánní; kandidóza genitálu (vulvovaginální, balanitida)
Kryptokokózy (nitrolební, plicní, kožní) – lék volby v udržovací fázi léčby kryptokokové meningitidy, alternativa útočné léčby
Dermatomykózy: tinea pedis, corporis, cruris, unguium (onychomykóza), tinea versicolor a kožní kandidové infekce
Systémové endemické mykózy: kokcidiomykóza, parakokcidiomykóza, sporotrichóza, histoplazmóza

Dávkování se řídí formou rozsahem infekce, je stejné při perorální i parenterální aplikaci. Počáteční dávka (1. den) u systémových mykóz je dvojnásobná, poté se podává jedna denní dávka ještě 2 – 3 dny po klinickém a laboratorním vymizení nálezu. Klinický účinek léčby je rychlý, předčasné ukončení léčby vede k relapsu. V profylaxi – primární i sekundární – je flukonazol lékem volby. U imunologicky oslabených

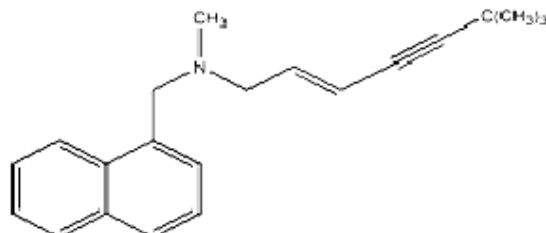
nemocných je nutná i dlouhodobá (týdny, měsíce) udržovací léčba. Dávkování činí 50 – 200 (400) mg/den v jedné denní dávce, podle základního onemocnění a typu imunoalterace.³

Shrneme – li základní vlastnosti flukonazolu, jedná se o širokospektré triazolové antimykotikum s velmi dobrou farmakokinetikou a minimálními vedlejšími účinky. Jeho mechanismus účinku je fungistatický a spočívá v inhibici syntézy ergosterolu. Spektrum účinku zahrnuje většinu kvasinek, zejména kandidy, kryptokoky, dále dimorfní houby a dermatofyty. Naopak rezistentní jsou aspergily, zygomycety a některé non – albicans kandidy (*Candida krusei*). Toxicita flukonazolu je nízká, většinou se objevují mírné gastrointestinální obtíže. Flukonazol je lékem volby většiny kandidóz (hlavně orofaryngeální, vulvovaginální) a kryptokokových infekcí.

4.6.2 Alkylaminová antimykotika – terbinafin

Obr. 3: Strukturální vzorec terbinafinu

trans-N-methyl-N-(1-naftylmethyl)-6,6-dimethylhept-2-en-4-ynyl-1-amin



Jedná se o širokospektrá chemoterapeutika s nízkou toxicitou pro perorální a lokální aplikaci k léčení kožních a slizničních mykóz. Významným zástupcem této skupiny je analog naftifinu terbinafin. Blokuje biosyntézu ergosterolu inhibicí aktivity enzymu skvalen – epoxidázy, ale na rozdíl od azolových antimykotik neinhibuje procesy závislé na cytochromu P450 a nesnižuje tedy koncentrace steroidních hormonů (estrogenů, testosteronu, kortisonu). Primárně fungicidní účinek je způsoben inhibicí enzymatické (epoxidázové) aktivity a intracelulární akumulací skvalenů, nedostatek ergosterolu se na antimykotickém účinku podílí fungistaticky. Terbinafin rovněž snižuje mitogenní odpověď fibroblastů, hladké svaloviny cév na stimulační účinek plazmatického růstového faktoru, a tím neointimální proliferaci.

Antimikrobní spektrum zahrnuje dermatofyty (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton floccosum*), kvasinky (*Candida* spp., *Pityrosporum* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*), plísně (*Aspergillus* spp.), dimorfní houby (*Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*) a Dematiaceae (*Hendersonula toruloidea*) a parazity (epimastigoty i amastigoty *Trypanosoma cruzi*). Podobně jako azolové deriváty je účinnější na vláknité formy hub, které jsou vůči inhibici syntézy buněčné membrány citlivější než kvasinky.

Terbinafin se po perorálním podání dobře vstřebává (více než 70% dávky), potrava resorpci neovlivňuje. Maximální koncentrace v plazmě je dosaženo za 2 hodiny. Vazba na plazmatické bílkoviny je až 99%.

Terbinafin je vysoce lipofilní a keratofilní a postupně se koncentruje v tukové tkáni, v kůži (ve stratum corneum již 2. den po podání dosahuje 10 x vyšších koncentrací než v plazmě) a jejich adnexech (vlasovém folikulu, vlasu), v nehtech a sebu. Poločas eliminace z tkání je 4 – 5 dní se zachováním fungicidních koncentrací vůči dermatofytům ještě tři týdny po ukončení léčby. Terbinafin podléhá oxidativní biotransformaci v játrech, metabolity jsou vylučovány močí (80%), méně stolicí (20%). Z toho vyplývá, že při porušení funkcí jater nebo ledvin může dojít k akumulaci terbinafinu.

K nežádoucím účinkům patří mírné dyspeptické obtíže jako nevolnost, nechutenství, bolest břicha či průjem, dále se uvádí alergický kožní exantém. Po 4 – 8 týdnech léčby se může rovněž objevit ztráta chuti. Nejsou alterovány funkce ledvin, ani krevní obraz (výjimečně se může vyskytnout neutropenie); přechodně mohou být zvýšeny hodnoty jaterních testů.

Terbinafin vykazuje synergický účinek s ketokonazolem při infekcích způsobených *Trypanosoma cruzi* (Chaganova nemoc) a potencuje účinek triazolových antimykotik.

Terbinafin je indikován v léčbě tineí (*tinea corporis*, *tinea cruris* a *tinea pedis*) a kvasinkových infekcí způsobených zástupci rodu *Candida* (*Candida albicans*), dále při onychomykóze vyvolané houbami ze skupiny dermatofyta, myotických infekcích kůže a nehtů vyvolaných citlivými dermatofyty.

Vzhledem k farmakokinetice není terbinafin účinný při systémových myotických infekcích.

Dávkování je u dospělých 250 mg/den jednou denně nebo rozděleně po 12 – ti hodinách. Délka léčby se ale liší podle indikace: u dermatomykózy – *tinea pedis* 2 – 6

týdnů, tinea corporis capitis a kožní kadiózy 2 – 4 týdny; onychomykózy – nehty rukou 6 – 12 týdnů, nehty nohou až 24 týdnů.^{3,59}

Tab. 3: Farmakokinetické vlastnosti terbinafinu

Allylaminové antimykotikum	Vazba na bílkoviny (%)	Distribuční objem V_d (l/kg)	Frakce vyloučená do moči (%/24 h)	Biologický poločas $T_{1/2}$ (h)
Terbinafin	99	0,7	79 – 85	16

Terbinafin je tedy allylaminový derivát se širokým spektrem účinku a nízkou toxicitou, který je dostupný v perorální lékové formě. Mechanismus účinku je fungistatický až fungicidní přes inhibici syntézy ergosterolu interferencí se squalenovou epoxidázou. Spektrum účinku terbinafinu je široké, zahrnuje dermatofyty, dimorfní houby a většinu kvasinek. Toxicita tohoto antimykotika je nízká, k nežádoucím účinkům se řadí mírné kožní afekty jako zarudnutí či svědění. Užívá se hlavně v léčbě dermatomykóz a zejména onychomykóz.

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje

Analytické váhy AND HM – 202 A & D Company
Analytické váhy AND HR – 120 A & D Company
Analytické váhy KERN ABS (max. 220 g, d = 0,1 mg)
Biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha
Digitální váhy KERN 440 – 33 (max. 120 g, d = 0,01 g)
Digitální váhy KERN 440 – 47 (max. 1200 g, d = 0,1 g)
Digitální váhy KERN 440 – 53 (max. 6000 g, d = 1g)
Magnetická míchačka Heidolph MR 3001
Mikrovlnná trouba ALASKA MW 1000 GC
Spektrofotometr Helios Gama/Delta, Unicam

5.2 Použité suroviny

Destilovaná voda (FaF UK Hradec Králové)
Ethylpyruvát (Fluka)
Léčiva flukonazol a terbinafin (Zentiva a.s., Praha)
Oligoesterové nosiče 5M a 3D (syntetizované na katedře farmaceutické technologie FaF UK Hradec Králové)

5.3 Oligoesterové nosiče

Byly použity oligoesterové nosiče syntetizované na katedře farmaceutické technologie FaF UK, pracovně označené 3D a 5M. Jedná se o kopolymery kyseliny mléčné a glykolové (1:1) obsahující 3 % dipentaerythritolu (3D) nebo 5 % mannitolu (5M) jako větvicí složky. Jejich charakteristiky uvádí tabulka číslo 4.

Tab. 4: Charakterizace terpolymerů kyseliny DL – mléčné, kyseliny glykolové a dipentaerythritolu (LA/GA/D) nebo mannitolu (LA/GA/M)

Označení polymeru	Poměr LA/GA/D, LA/GA/M (%)	M_n	M_w	M_w/M_n
3D	48,5/48,5/3,0	3600	5300	1,19
5M	47,5/47,5/5,0	1600	2200	1,36

M_nčíselně střední molekulová hmotnost [g/mol]

M_w hmotnostně střední molekulová hmotnost [g/mol]

M_w/M_n stupeň polydisperzity

5.4 Postup práce

5.4.1 Liberační médium

Jako liberační médium byla pro liberaci flukonazolu zvolena destilovaná voda.

Pro terbinafin bylo rovněž nutné použít jako disoluční médium destilovanou vodu z důvodu rozpustnosti terbinafinu, neboť ve fosfát citrátovém pufru pH 6,0 i pH 7,0 vznikal zákal, který znemožňoval měření absorbance.

5.4.2 Kalibrační přímka

Absorpční maximum flukonazolu v destilované vodě je při 261 nm, u terbinafinu v destilované vodě je při 283 nm. Byly tedy sestrojeny dvě kalibrační přímky.

Byl připraven zásobní roztok flukonazolu v destilované vodě o koncentraci asi 400,0 mg/l. Postupným ředěním byly získány roztoky o koncentraci 50 – 400 mg/l (tab. 5). Obdobně se postupovalo v případě terbinafinu (tab. 6).

Byla měřena absorbance roztoků proti destilované vodě. Z naměřených hodnot byly sestrojeny kalibrační přímky a zjištěny jejich rovnice (graf 1, graf 2).

Obecná rovnice kalibrační přímky: $y = A + Bx$

y..... absorbance

A..... absolutní člen

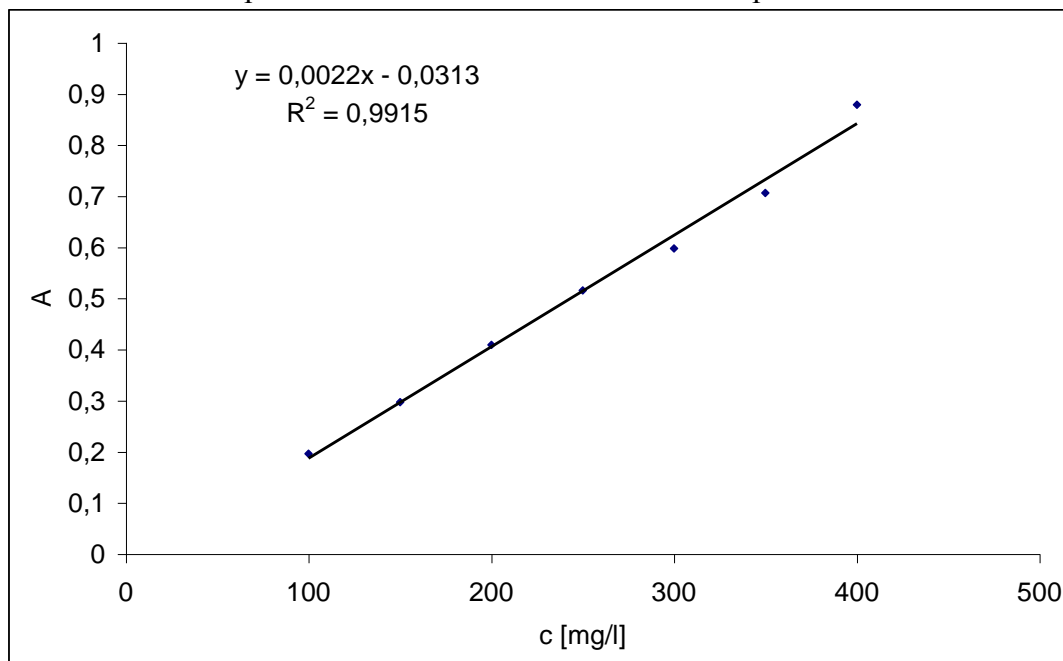
B..... směrnice

x koncentrace léčiva [mg/l]

Tab. 5: Absorbance odměrných roztoků flukonazolu v destilované vodě při 261 nm

Koncentrace flukonazolu [mg/l]	Absorbance
50,0	0,083
100,0	0,196
150,0	0,297
200,0	0,409
250,0	0,516
300,0	0,598
350,0	0,706
400,0	0,879

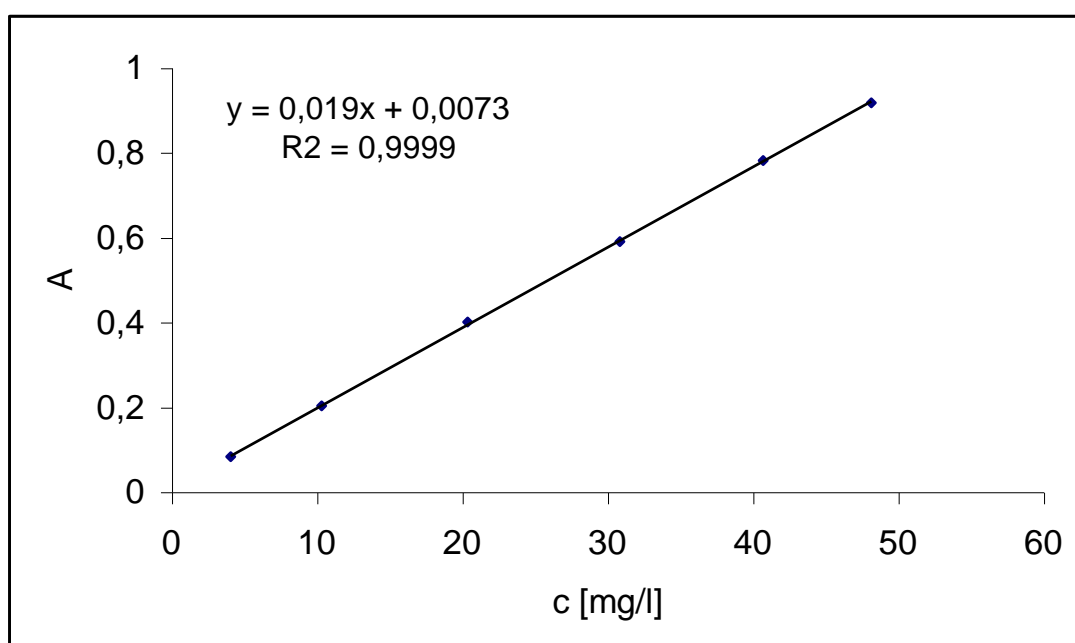
Graf 1: Kalibrační přímka flukonazolu v destilované vodě při 261 nm



Tab. 6: Absorbance odměrných roztoků terbinafinu v destilované vodě při 283 nm

Koncentrace terbinafinu [mg/l]	Absorbance
4,1	0,083
10,3	0,202
20,4	0,400
30,9	0,590
40,7	0,781
48,1	0,920

Graf 2: Kalibrační přímka terbinafinu v destilované vodě při 283 nm



5.4.3 Příprava matric

Byly připraveny matrice o hmotnosti 150,0 mg složené z nosiče 5M nebo 3D, plastifikátoru (ethylpyruvát) v koncentraci 10, 20 a 30% a léčiva (terbinafin, flukonazol) v koncentraci 4%.

Do vytárované kádinky byl navážen nosič. Kádinka byla umístěna do mikrovlnné trouby a byla zahřívána po dobu asi 3 minut. Poté bylo přidáno dané množství plastifikátoru. Směs oligoesteru s plastifikátorem byla kopistkou důkladně zhomogenizována. Do scintilační lahvičky bylo odváženo 150,0 mg. Tak byly připraveny placebo matrice složené pouze z oligoesteru a dané koncentrace plastifikátoru.

Poté bylo na základě výpočtu přiváženo příslušné léčivo. Vzniklá směs byla opět pečlivě zhomogenizována a byly odváženy dvě matrice s léčivem.

Všechny tři matrice byly umístěny do řádně označených scintilačních lahviček. Lahvičky byly uzavřeny a podle potřeby položeny na určitou dobu na magnetickou míchačku, aby se matrice rovnoměrně rozprostřely po dně scintilačních lahviček. Do každé scintilační lahvičky bylo naváženo 15,0 g liberačního média. Lahvičky byly umístěny do termostatu s nastavenou teplotou na 37°C, kde byly bez míchání po dobu disolučního testu uchovávány.

5.4.4 Stanovení liberovaných léčiv

Měřením absorbance na spektrofotometru bylo stanoveno množství uvolněného léčiva.

Vzorky s flukonazolem byly měřeny při 261 nm proti destilované vodě a rovněž proti placebo matici. U terbinafinu se měřilo při 283 nm proti destilované vodě a proti placebo matici. Všechny naměřené hodnoty byly zaneseny do příslušných tabulek.

První den se odběry prováděly po 2 a 6 hodinách. Dále se pokračovalo s odebíráním vždy po 24 hodinách. Ke konci testu se intervaly mezi jednotlivými odběry prodlužovaly.

Po odebrání vzorků a naměření absorbance se matrice opětovně zalily disolučním médiem a byly umístěny zpět do termostatu.

Podle rovnice kalibrační přímky bylo vypočteno množství uvolněného léčiva v čase odběru, které bylo převedeno na množství léčiva v 15,0 g disolučního média. Takto získané hodnoty pak byly převedeny na podíl liberovaného množství léčiva k celkovému množství léčiva v matrici v %. Průběh liberace byl vyjádřen graficky jako závislost kumulativních % uvolněného léčiva na čase.

Výpočet uvolněného flukonazolu při 261 nm:

$$x_1 = \frac{y + 0,0313}{0,0022}$$

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

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

Výpočet uvolněného terbinafinu při 283 nm:

$$x_1 = \frac{y - 0,0073}{0,0190}$$

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

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

x_1množství léčiva [mg/l]

x_2množství léčiva v 15,0 g [mg/l]

$x_{\%}$podíl liberovaného léčiva (%)

D.....ředění vzorku

m_nnavážka matrice

y.....absorbance

6. Výsledky

6.1. Tabulky

Tab. 7: Liberace Flu z nosiče 5M plastifikovaného 10% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,015	1	0,316	5,07	4,92	4,92
	0,012	1	0,295	4,77		
0,25	0,043	1	0,507	8,13	7,66	12,58
	0,034	1	0,445	7,20		
1	0,139	1	1,161	18,63	18,26	30,85
	0,131	1	1,107	17,89		
2	0,169	1	1,366	21,91	19,41	50,26
	0,122	1	1,045	16,90		
3	0,144	1	1,195	19,18	17,16	67,41
	0,106	1	0,936	15,14		
4	0,130	1	1,100	17,65	15,68	83,09
	0,093	1	0,848	13,70		
5	0,100	1	0,895	14,37	12,82	95,91
	0,071	1	0,698	11,28		
6	0,086	1	0,800	12,83	12,17	108,08
	0,073	1	0,711	11,50		
7	0,078	1	0,745	11,96	10,96	119,04
	0,059	1	0,616	9,96		
8	0,053	1	0,575	9,22	8,76	127,80
	0,044	1	0,513	8,30		

Tab. 8: Liberace Flu z nosiče 5M plastifikovaného 10% EP – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,016	1	0,323	5,17	4,92	4,92
	0,011	1	0,288	4,66		
0,25	0,020	1	0,350	5,61	5,14	10,06
	0,011	1	0,288	4,66		
1	0,106	1	0,936	15,02	14,80	24,86
	0,101	1	0,902	14,59		
2	0,140	1	1,168	18,74	16,55	41,42
	0,099	1	0,888	14,37		
3	0,124	1	1,059	16,99	14,85	56,27
	0,084	1	0,786	12,71		
4	0,119	1	1,025	16,44	14,52	70,79
	0,083	1	0,779	12,60		
5	0,074	1	0,718	11,52	9,91	80,70
	0,044	1	0,513	8,30		
6	0,070	1	0,691	11,08	10,35	91,06
	0,056	1	0,595	9,63		
7	0,048	1	0,541	8,68	7,77	98,83
	0,031	1	0,425	6,87		
8	0,038	1	0,473	7,58	7,23	106,05
	0,031	1	0,425	6,87		

Tab. 9: Liberace Flu z nosiče 5M plastifikovaného 20% EP měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,085	1	0,793	13,22	11,00	11,00
	0,046	1	0,527	8,78		
0,25	0,071	1	0,698	11,63	13,10	24,09
	0,097	1	0,875	14,57		
1	0,204	1	1,604	26,74	27,47	51,56
	0,217	1	1,693	28,20		
2	0,122	1	1,045	17,42	19,46	71,02
	0,158	1	1,291	21,50		
3	0,147	1	1,216	20,26	19,69	90,71
	0,137	1	1,148	19,11		
4	0,119	1	1,025	17,08	16,79	107,50
	0,114	1	0,991	16,50		
5	0,094	1	0,854	14,24	14,18	121,67
	0,093	1	0,848	14,12		
6	0,100	1	0,895	14,92	13,44	135,11
	0,074	1	0,718	11,96		
7	0,078	1	0,745	12,42	12,42	147,53
	0,078	1	0,745	12,41		
8	0,056	1	0,595	9,92	9,75	157,28
	0,053	1	0,575	9,57		

Tab. 10: Liberace Flu z nosiče 5M plastifikovaného 20% EP měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,25	0,008	1	0,268	4,47	5,94	5,94
	0,034	1	0,445	7,42		
1	0,163	1	1,325	22,08	23,32	29,26
	0,185	1	1,475	24,56		
2	0,099	1	0,888	14,81	16,68	45,94
	0,132	1	1,113	18,54		
3	0,125	1	1,066	17,76	17,24	63,18
	0,116	1	1,004	16,73		
4	0,112	1	0,977	16,28	16,05	79,23
	0,108	1	0,950	15,82		
5	0,081	1	0,766	12,76	12,47	91,71
	0,076	1	0,732	12,19		
6	0,082	1	0,773	12,88	11,39	103,10
	0,056	1	0,595	9,91		
7	0,049	1	0,548	9,13	9,18	112,28
	0,050	1	0,554	9,23		
8	0,048	1	0,541	9,01	8,84	121,12
	0,045	1	0,520	8,66		

Tab. 11: Liberace Flu z nosiče 3D plastifikovaného 10% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,001	1	0,220	3,70	4,19	4,19
	0,008	1	0,268	4,68		
0,25	0,003	1	0,234	3,93	4,49	8,68
	0,011	1	0,288	5,04		
1	0,010	1	0,282	4,73	5,60	14,28
	0,023	1	0,370	6,47		
2	0,046	1	0,527	8,86	9,40	23,68
	0,052	1	0,568	9,93		
3	0,033	1	0,438	7,37	8,59	32,27
	0,051	1	0,561	9,81		
4	0,047	1	0,534	8,98	10,17	42,44
	0,064	1	0,650	11,36		
5	0,079	1	0,752	12,64	16,77	59,21
	0,144	1	1,195	20,90		
6	0,111	1	0,970	16,31	18,66	77,87
	0,145	1	1,202	21,01		
7	0,137	1	1,148	19,29	20,09	97,96
	0,144	1	1,195	20,90		
8	0,109	1	0,957	16,08	15,63	113,59
	0,096	1	0,868	15,17		

Tab. 12: Liberace Flu z nosiče 3D plastifikovaného 10% EP – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
4	0,017	1	0,329	5,54	6,84	6,84
	0,037	1	0,466	8,14		
5	0,053	1	0,575	9,66	13,67	20,51
	0,117	1	1,011	17,68		
6	0,089	1	0,820	13,79	16,09	36,60
	0,123	1	1,052	18,39		
7	0,100	1	0,895	15,05	15,77	52,37
	0,107	1	0,943	16,49		
8	0,092	1	0,841	14,13	13,64	66,01
	0,079	1	0,752	13,15		

Tab. 13: Liberace Flu z nosiče 3D plastifikovaného 20% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,147	1	1,216	20,10	15,48	15,48
	0,067	1	0,670	10,87		
0,25	0,073	1	0,711	11,76	10,59	26,08
	0,054	1	0,582	9,43		
1	0,116	1	1,004	16,61	15,89	41,97
	0,106	1	0,936	15,18		
2	0,095	1	0,861	14,24	13,82	55,79
	0,090	1	0,827	13,41		
3	0,118	1	1,018	16,83	14,79	70,58
	0,084	1	0,786	12,75		
4	0,128	1	1,086	17,96	15,68	86,26
	0,090	1	0,827	13,41		
5	0,172	1	1,386	22,92	24,69	110,95
	0,208	1	1,632	26,45		
6	0,151	1	1,243	20,55	22,23	133,18
	0,185	1	1,475	23,91		
7	0,112	1	0,977	16,15	18,43	151,61
	0,156	1	1,277	20,70		
8	0,095	1	0,861	14,24	15,48	167,09
	0,120	1	1,032	16,72		

Tab. 14: Liberace Flu z nosiče 3D plastifikovaného 20% EP – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,127	1	1,079	17,85	13,08	13,08
	0,044	1	0,513	8,32		
0,25	0,039	1	0,479	7,93	6,80	19,88
	0,020	1	0,350	5,67		
1	0,077	1	0,738	12,21	11,37	31,25
	0,064	1	0,650	10,53		
2	0,062	1	0,636	10,52	10,19	41,45
	0,058	1	0,609	9,87		
3	0,073	1	0,711	11,76	9,88	51,32
	0,041	1	0,493	7,99		
4	0,101	1	0,902	14,91	12,67	63,99
	0,063	1	0,643	10,42		
5	0,107	1	0,943	15,59	17,37	81,37
	0,142	1	1,182	19,16		
6	0,116	1	1,004	16,61	18,38	99,75
	0,151	1	1,243	20,15		
7	0,062	1	0,636	10,52	12,90	112,65
	0,107	1	0,943	15,29		
8	0,066	1	0,663	10,97	12,19	124,84
	0,090	1	0,827	13,41		

Tab. 15: Liberace Flu z nosiče 3D plastifikovaného 30% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,119	1	1,025	16,71	14,78	14,78
	0,082	1	0,773	12,86		
0,25	0,074	1	0,718	11,71	10,07	24,86
	0,043	1	0,507	8,43		
1	0,130	1	1,100	17,93	17,84	42,69
	0,125	1	1,066	17,74		
2	0,096	1	0,868	14,15	14,58	57,28
	0,101	1	0,902	15,01		
3	0,093	1	0,848	13,82	15,72	73,00
	0,124	1	1,059	17,62		
4	0,129	1	1,093	17,82	18,06	91,06
	0,130	1	1,100	18,31		
5	0,130	1	1,100	17,93	19,43	110,49
	0,153	1	1,257	20,92		
6	0,161	1	1,311	21,38	20,64	131,13
	0,144	1	1,195	19,89		
7	0,115	1	0,998	16,27	18,02	149,15
	0,143	1	1,188	19,78		
8	0,129	1	1,093	17,82	16,19	165,34
	0,097	1	0,875	14,56		

Tab. 16: Liberace Flu z nosiče 3D plastifikovaného 30% EP – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,066	1	0,663	10,82	8,77	8,77
	0,028	1	0,404	6,73		
0,25	0,005	1	0,248	4,04	3,85	12,63
	0,001	1	0,220	3,67		
1	0,087	1	0,807	13,15	13,12	25,74
	0,084	1	0,786	13,08		
2	0,056	1	0,595	9,71	10,15	35,89
	0,062	1	0,636	10,59		
3	0,047	1	0,534	8,71	10,56	46,45
	0,078	1	0,745	12,40		
4	0,107	1	0,943	15,38	15,65	62,10
	0,109	1	0,957	15,92		
5	0,098	1	0,882	14,38	15,77	77,87
	0,120	1	1,032	17,17		
6	0,055	1	0,588	9,60	8,79	86,66
	0,039	1	0,479	7,98		
7	0,071	1	0,698	11,37	12,97	99,62
	0,097	1	0,875	14,56		
8	0,099	1	0,888	14,49	12,88	112,50
	0,068	1	0,677	11,27		

Tab. 17: Liberace Ter z nosiče 5M plastifikovaného 10% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,375	1	0,290	4,72	4,51	4,51
	0,343	1	0,265	4,30		
0,25	0,364	1	0,282	4,57	4,93	9,43
	0,419	1	0,325	5,28		
1	0,901	1	0,706	11,46	11,64	21,07
	0,929	1	0,728	11,81		
2	0,660	1	0,515	8,37	8,98	30,05
	0,756	1	0,591	9,60		
3	0,910	1	0,713	11,58	12,78	42,84
	0,553	2	0,862	13,99		
4	0,557	2	0,868	14,10	12,04	54,88
	0,397	2	0,615	9,99		
5	0,565	1	0,440	7,15	7,33	62,21
	0,593	1	0,462	7,51		
6	0,438	1	0,340	5,52	7,44	69,65
	0,737	1	0,576	9,35		
7	0,038	1	0,024	0,39	0,54	70,19
	0,061	1	0,042	0,69		
12	0,360	5	1,392	22,62	23,38	93,57
	0,384	5	1,487	24,14		
16	0,211	5	0,804	13,06	14,95	108,51
	0,270	5	1,037	16,83		
21	0,187	5	0,709	11,52	14,88	123,40
	0,292	5	1,124	18,24		

Tab. 18: Liberace Ter z nosiče 5M plastifikovaného 10% EP – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,369	1	0,286	4,64	4,42	4,42
	0,335	1	0,259	4,20		
0,25	0,384	1	0,297	4,83	5,19	9,61
	0,441	1	0,342	5,56		
1	0,900	1	0,705	11,45	11,61	21,23
	0,926	1	0,725	11,77		
2	0,672	1	0,525	8,52	9,12	30,34
	0,765	1	0,598	9,71		
3	0,775	1	0,606	9,85	10,11	40,45
	0,412	2	0,639	10,37		
4	0,543	2	0,846	13,74	11,42	51,87
	0,362	2	0,560	9,09		
5	0,626	1	0,488	7,93	8,10	59,97
	0,652	1	0,509	8,26		
6	0,440	1	0,342	5,55	7,48	67,45
	0,742	1	0,580	9,42		
12	0,351	5	1,357	22,04	22,67	90,12
	0,371	5	1,436	23,31		
16	0,212	5	0,808	13,13	15,04	105,17
	0,272	5	1,045	16,96		
21	0,167	5	0,630	10,24	13,60	118,77
	0,272	5	1,045	16,96		

Tab. 19: Liberace Ter z nosiče 5M plastifikovaného 20% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,501	5	1,949	31,35	28,85	28,85
	0,421	5	1,633	26,36		
0,25	0,478	1	0,372	5,98	6,40	35,25
	0,542	1	0,422	6,81		
1	0,752	1	0,588	9,46	9,24	44,49
	0,716	1	0,560	9,03		
2	0,715	1	0,559	8,99	8,83	53,32
	0,688	1	0,537	8,67		
3	0,934	1	0,732	11,77	10,92	64,24
	0,797	1	0,623	10,06		
4	0,680	1	0,531	8,54	9,68	73,92
	0,856	1	0,670	10,81		
5	0,671	1	0,524	8,43	7,93	81,85
	0,590	1	0,460	7,42		
6	0,418	1	0,324	5,22	5,04	86,89
	0,389	1	0,301	4,86		
7	0,034	1	0,021	0,34	0,41	87,30
	0,045	1	0,030	0,48		
12	0,264	5	1,013	16,30	16,49	103,78
	0,269	5	1,033	16,67		
16	0,200	5	0,761	12,24	12,80	116,58
	0,217	5	0,828	13,36		
21	0,632	1	0,493	7,93	8,04	124,62
	0,647	1	0,505	8,15		

Tab. 20: Liberace Ter z nosiče 5M plastifikovaného 20% EP – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,495	5	1,925	30,97	28,50	28,50
	0,416	5	1,613	26,04		
0,25	0,473	1	0,368	5,91	6,34	34,85
	0,539	1	0,420	6,77		
1	0,758	1	0,593	9,53	9,32	44,17
	0,722	1	0,564	9,11		
2	0,731	1	0,571	9,19	9,03	53,20
	0,703	1	0,549	8,86		
3	0,935	1	0,732	11,78	10,97	64,16
	0,804	1	0,629	10,15		
4	0,576	1	0,449	7,22	8,34	72,51
	0,750	1	0,586	9,46		
5	0,617	1	0,481	7,74	7,20	79,71
	0,530	1	0,413	6,66		
6	0,423	1	0,328	5,28	5,10	84,81
	0,394	1	0,305	4,93		
12	0,271	5	1,041	16,75	16,77	101,59
	0,271	5	1,041	16,80		
16	0,180	5	0,682	10,97	11,49	113,08
	0,196	5	0,745	12,02		
21	0,539	1	0,420	6,75	6,83	119,91
	0,550	1	0,428	6,91		

Tab. 21: Liberace Ter z nosiče 5M plastifikovaného 30% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,559	5	2,178	35,47	34,70	34,70
	0,533	5	2,075	33,93		
0,25	0,536	1	0,417	6,80	6,11	40,81
	0,427	1	0,331	5,42		
1	0,743	1	0,581	9,46	8,88	49,69
	0,651	1	0,508	8,31		
2	0,693	1	0,541	8,82	8,01	57,70
	0,565	1	0,440	7,20		
3	0,849	1	0,665	10,82	9,99	67,68
	0,716	1	0,560	9,15		
4	0,575	1	0,448	7,30	7,41	75,09
	0,590	1	0,460	7,52		
5	0,501	1	0,390	6,35	6,12	81,22
	0,464	1	0,361	5,90		
6	0,424	1	0,329	5,36	5,19	86,40
	0,396	1	0,307	5,02		
7	0,073	1	0,052	0,84	0,83	87,23
	0,070	1	0,050	0,81		
12	0,260	5	0,998	16,25	14,83	102,06
	0,215	5	0,820	13,41		
16	0,178	5	0,674	10,97	11,16	113,21
	0,183	5	0,694	11,34		
21	0,577	1	0,450	7,33	7,94	121,15
	0,670	1	0,523	8,55		

Tab. 22: Liberace Ter z nosiče 5M plastifikovaného 30% EP – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,550	5	2,142	34,89	34,18	34,18
	0,526	5	2,048	33,48		
0,25	0,543	1	0,423	6,89	6,19	40,37
	0,432	1	0,335	5,48		
1	0,750	1	0,586	9,55	8,96	49,32
	0,655	1	0,511	8,36		
2	0,707	1	0,552	9,00	8,18	57,51
	0,578	1	0,451	7,37		
3	0,853	1	0,668	10,87	10,06	67,56
	0,723	1	0,565	9,24		
4	0,406	1	0,315	5,13	5,27	72,83
	0,426	1	0,331	5,40		
5	0,553	1	0,431	7,02	6,79	79,62
	0,516	1	0,402	6,57		
6	0,430	1	0,334	5,44	5,30	84,92
	0,407	1	0,316	5,16		
7	0,012	1	0,004	0,06	0,05	84,97
	0,011	1	0,003	0,05		
12	0,226	5	0,863	14,06	13,80	98,77
	0,217	5	0,828	13,53		
16	0,175	5	0,662	10,78	10,90	109,67
	0,178	5	0,674	11,02		
21	0,556	1	0,433	7,06	7,65	117,32
	0,646	1	0,504	8,24		

Tab. 24: Liberace Ter z nosiče 3D plastifikovaného 10% EP – měřeno proti placebo

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,148	1	0,111	1,78	1,72	1,72
	0,139	1	0,104	1,67		
0,25	0,061	1	0,042	0,68	0,75	2,47
	0,072	1	0,051	0,82		
1	0,167	1	0,126	2,02	1,97	4,44
	0,159	1	0,120	1,92		
2	0,178	1	0,135	2,16	2,08	6,52
	0,165	1	0,125	2,00		
3	0,257	1	0,197	3,16	2,24	8,76
	0,111	1	0,082	1,31		
4	0,522	1	0,406	6,51	5,98	14,73
	0,437	1	0,339	5,44		
5	0,569	1	0,443	7,11	6,97	21,70
	0,547	1	0,426	6,83		
6	0,527	1	0,410	6,58	7,44	29,15
	0,664	1	0,518	8,31		
12	0,465	5	1,807	28,95	30,45	59,96
	0,512	5	1,992	31,95		
16	0,422	5	1,637	26,23	23,84	83,80
	0,346	5	1,337	21,44		
21	0,315	5	1,215	19,46	18,65	102,45
	0,289	5	1,112	17,83		

Tab. 25: Liberace Ter z nosiče 3D plastifikovaného 20% EP – měřeno proti destilované vodě

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,165	1	0,125	2,02	2,32	2,32
	0,213	1	0,162	2,62		
0,25	0,092	1	0,067	1,08	1,34	3,66
	0,133	1	0,099	1,60		
1	0,420	1	0,326	5,28	4,55	8,21
	0,307	1	0,237	3,82		
2	0,264	1	0,203	3,29	3,64	11,85
	0,321	1	0,248	4,00		
3	0,509	1	0,396	6,42	8,64	20,49
	0,859	1	0,672	10,85		
4	0,817	1	0,639	10,36	8,84	29,33
	0,581	1	0,453	7,31		
5	0,308	5	1,187	19,24	14,98	44,31
	0,848	1	0,664	10,71		
6	0,239	5	0,915	14,83	14,44	58,75
	0,228	5	0,871	14,06		
12	0,620	5	2,419	39,21	38,17	98,93
	0,590	5	2,300	37,12		
16	0,419	5	1,625	26,35	22,53	121,46
	0,301	5	1,159	18,71		
21	0,284	5	1,092	17,71	18,02	139,47
	0,295	5	1,136	18,33		

Tab. 26: Liberace Ter z nosiče 3D plastifikovaného 20% EP – měřeno proti placebu

čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,161	1	0,121	1,97	2,27	2,27
	0,209	1	0,159	2,57		
0,25	0,103	1	0,076	1,22	1,48	3,75
	0,143	1	0,107	1,73		
1	0,422	1	0,327	5,31	4,57	8,32
	0,308	1	0,237	3,83		
2	0,267	1	0,205	3,32	3,68	11,99
	0,324	1	0,250	4,04		
3	0,544	1	0,424	6,87	9,10	21,09
	0,896	1	0,702	11,32		
4	0,729	1	0,570	9,24	8,06	29,15
	0,547	1	0,426	6,88		
5	0,336	5	1,298	21,04	16,20	45,35
	0,899	1	0,704	11,36		
6	0,238	5	0,911	14,76	14,48	59,82
	0,230	5	0,879	14,19		
12	0,456	5	1,771	28,72	29,16	90,22
	0,472	5	1,834	29,61		
16	0,385	5	1,491	24,17	20,39	110,61
	0,268	5	1,029	16,61		
21	0,249	5	0,954	15,47	15,78	126,39
	0,260	5	0,998	16,10		

Tab. 27: Liberace Ter z nosiče 3D plastifikovaného 30% EP – měřeno proti destilované vodě

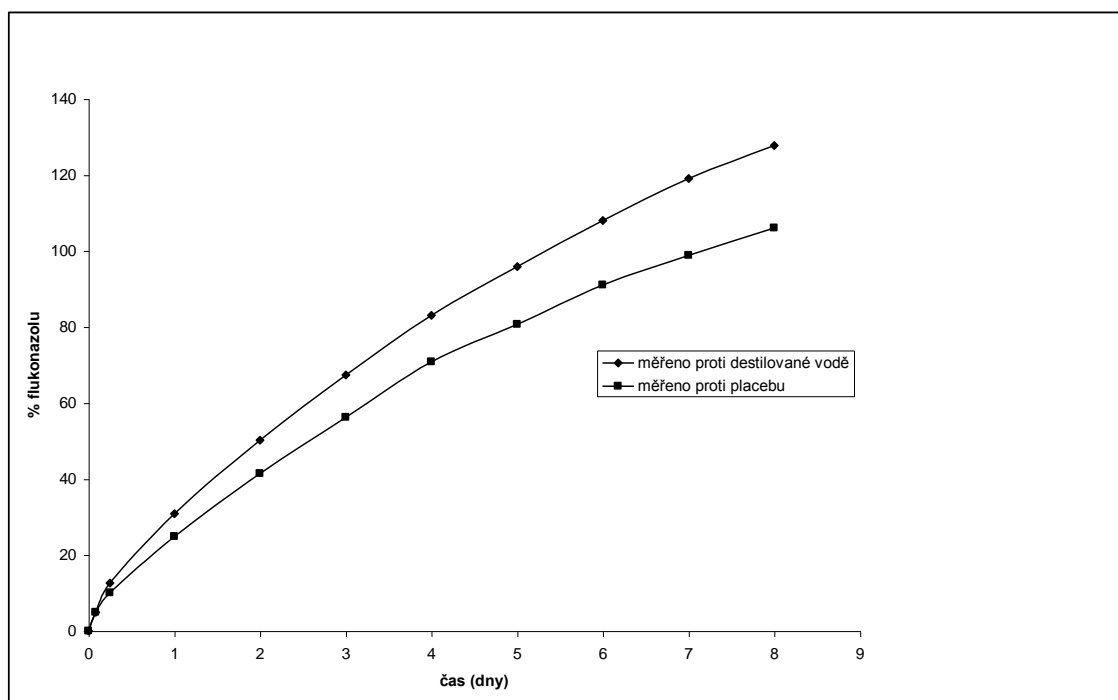
čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,216	5	0,824	13,45	11,28	11,28
	0,149	5	0,559	9,10		
0,25	0,313	1	0,241	3,94	3,99	15,27
	0,322	1	0,248	4,04		
1	0,460	1	0,357	5,84	5,91	21,18
	0,473	1	0,368	5,98		
2	0,278	1	0,214	3,49	3,81	24,99
	0,329	1	0,254	4,13		
3	0,392	1	0,304	4,96	5,20	30,19
	0,430	1	0,334	5,43		
4	0,618	1	0,482	7,87	6,69	36,88
	0,436	1	0,338	5,51		
5	0,506	1	0,394	6,43	6,91	43,79
	0,582	1	0,454	7,38		
6	0,135	5	0,504	8,23	7,51	51,30
	0,113	5	0,417	6,79		
12	0,784	5	3,066	50,06	48,70	101,47
	0,744	5	2,908	47,33		
16	0,445	5	1,728	28,21	28,23	129,70
	0,447	5	1,736	28,25		
21	0,315	5	1,215	19,83	19,09	148,80
	0,293	5	1,128	18,36		

Tab. 28: Liberace Ter z nosiče 3D plastifikovaného 30% EP – měřeno proti placebo

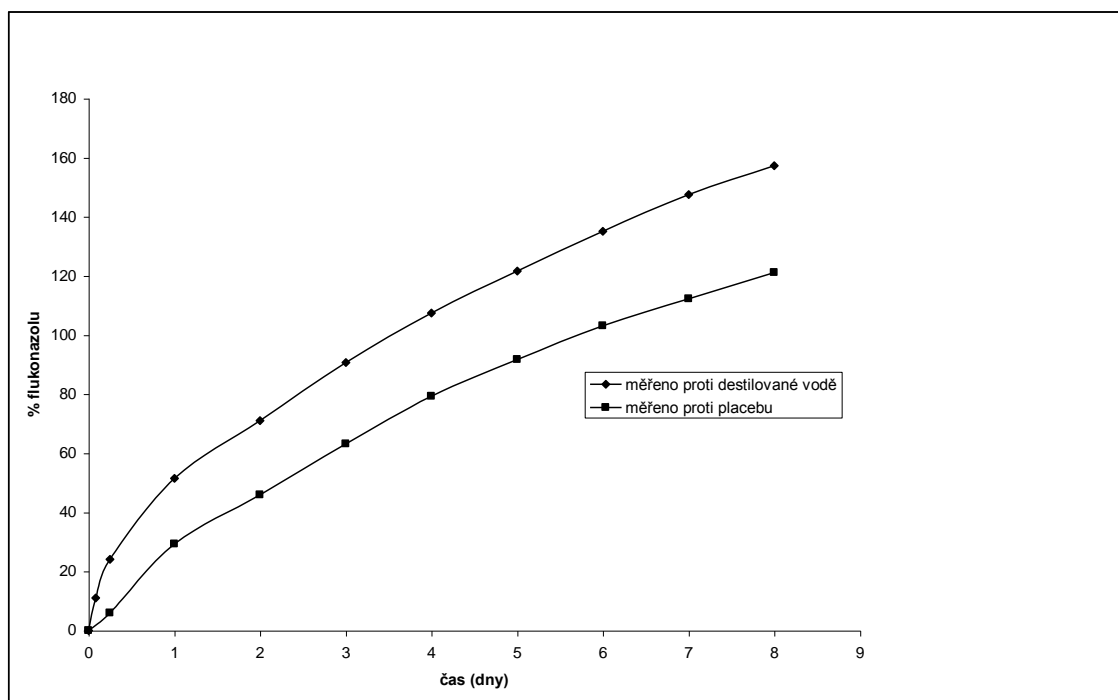
čas	A	ředění	Flu [mg]	Flu[%]	průměr	kumulativní %
0,083	0,211	5	0,804	13,13	11,02	11,02
	0,146	5	0,548	8,91		
0,25	0,323	1	0,249	4,07	4,11	15,14
	0,331	1	0,256	4,16		
1	0,467	1	0,363	5,93	6,00	21,14
	0,480	1	0,373	6,07		
2	0,290	1	0,223	3,64	3,98	25,11
	0,343	1	0,265	4,31		
3	0,431	1	0,335	5,46	5,71	30,82
	0,471	1	0,366	5,96		
4	0,532	1	0,414	6,76	5,56	36,38
	0,346	1	0,267	4,35		
5	0,450	1	0,350	5,71	6,16	42,54
	0,522	1	0,406	6,61		
6	0,128	5	0,476	7,78	7,25	49,80
	0,112	5	0,413	6,73		
12	0,745	5	2,912	47,55	46,70	96,94
	0,721	5	2,817	45,85		
16	0,430	5	1,669	27,25	27,33	124,27
	0,434	5	1,684	27,41		
21	0,276	5	1,061	17,32	16,62	140,89
	0,255	5	0,978	15,91		

6.2.Grafy

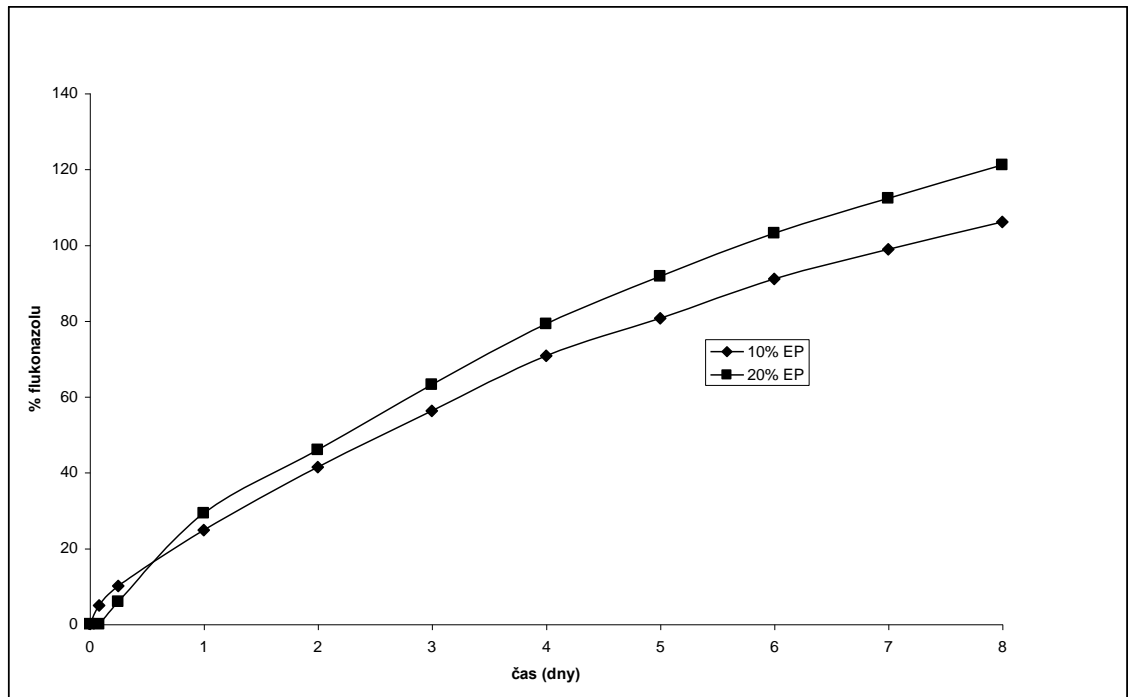
Graf 3: Liberace flukonazolu z nosiče 5M plastifikovaného 10% EP



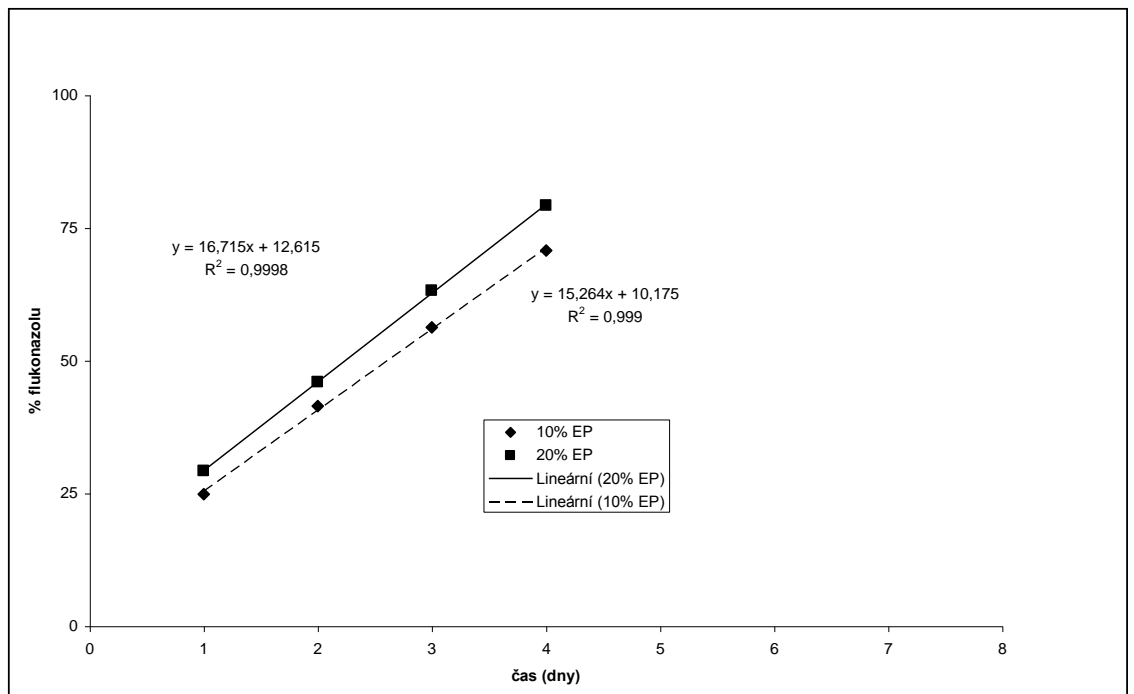
Graf 4: Liberace flukonazolu z nosiče 5M plastifikovaného 20% EP



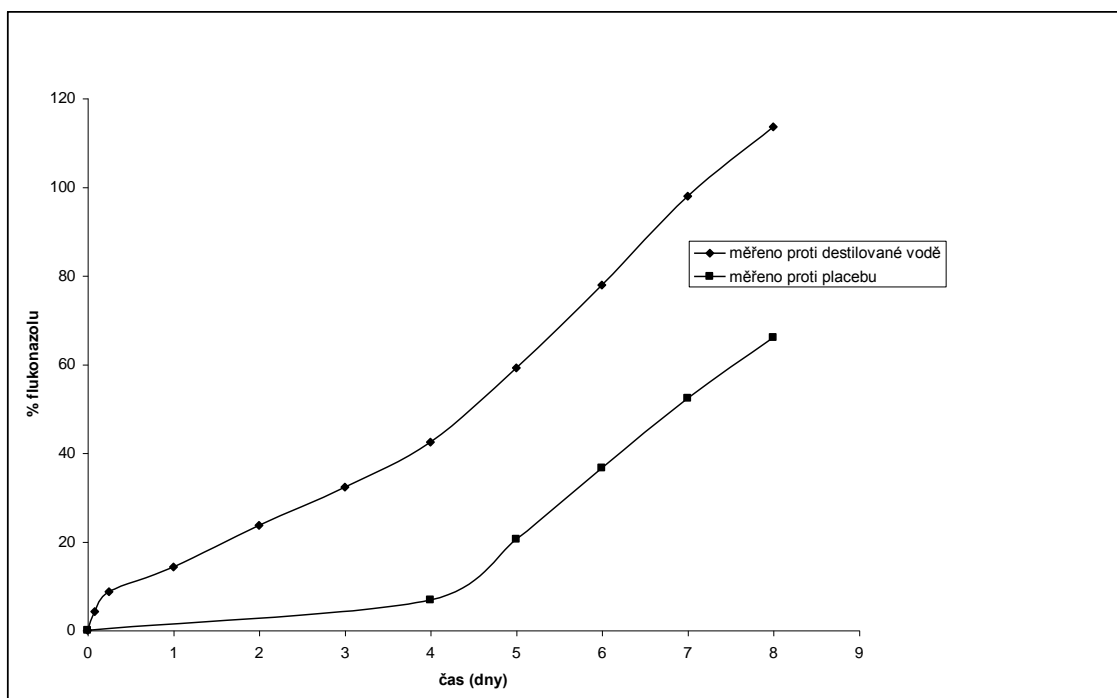
Graf 5: Vliv koncentrace EP na liberaci flukonazolu z nosiče 5M



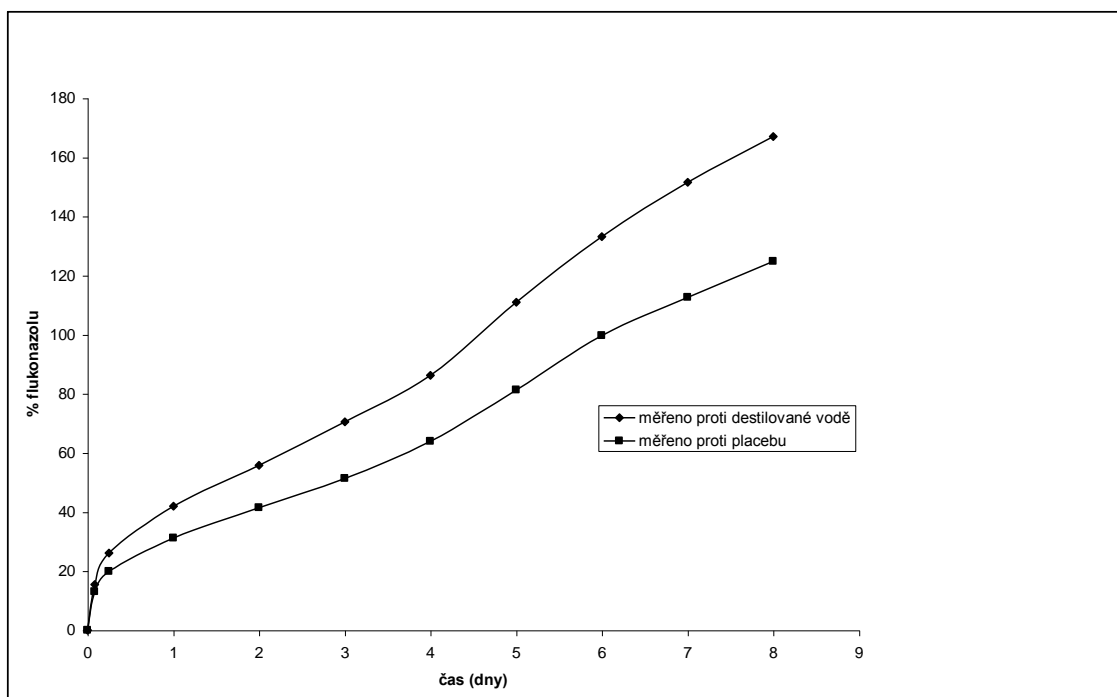
Graf 6: Lineární fáze liberace flukonazolu z nosiče 5M



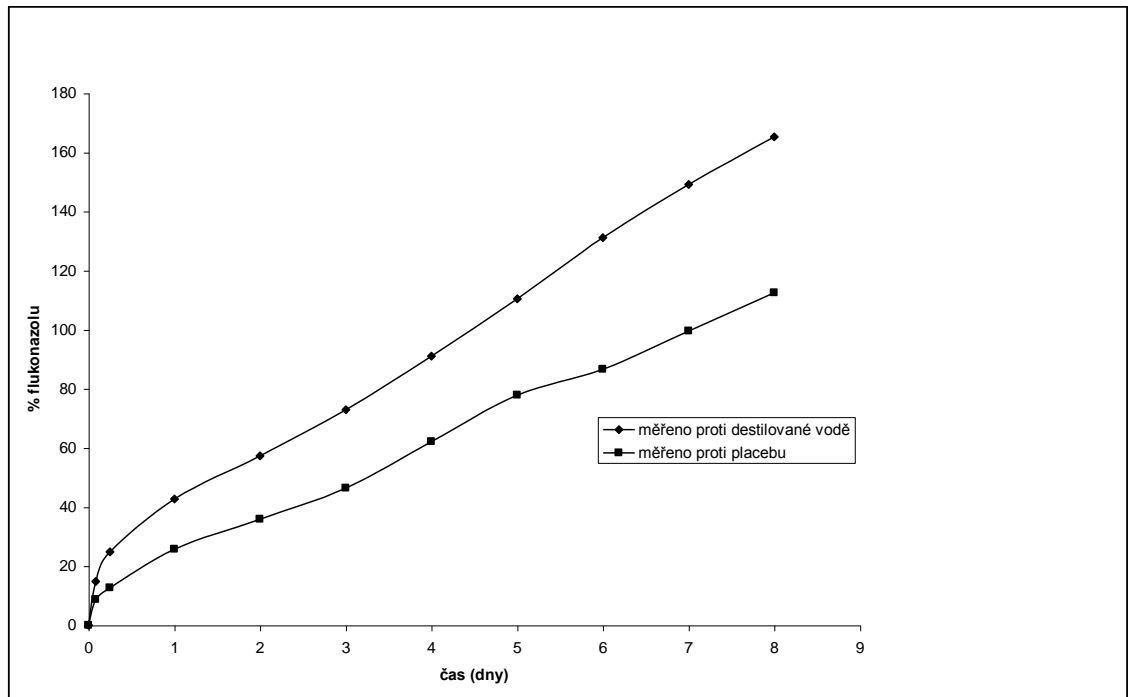
Graf 7: Liberace flukonazolu z nosiče 3D plastifikovaného 10% EP



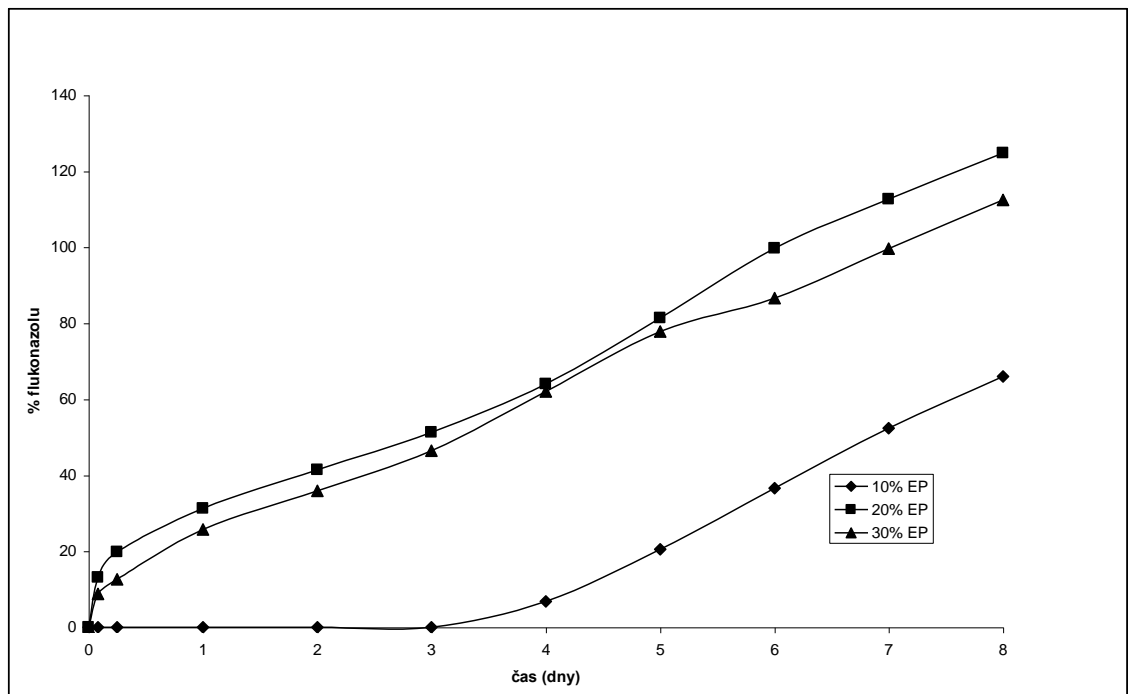
Graf 8: Liberace flukonazolu z nosiče 3D plastifikovaného 20% EP



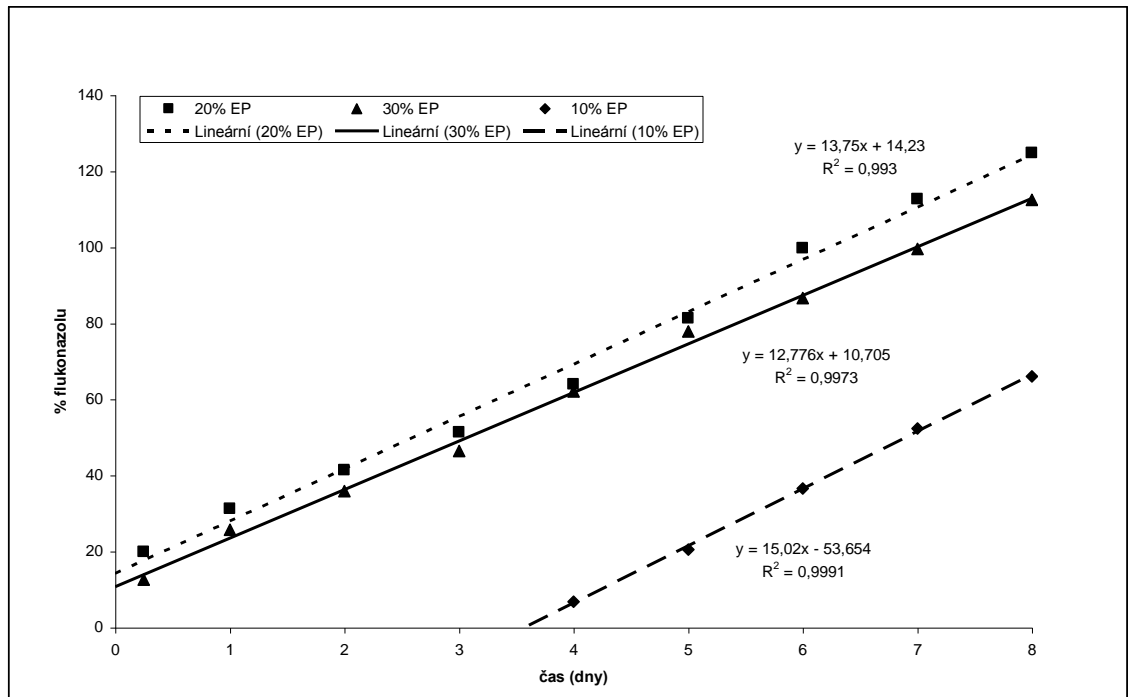
Graf 9: Liberace flukonazolu z nosiče 3D plastifikovaného 30% EP



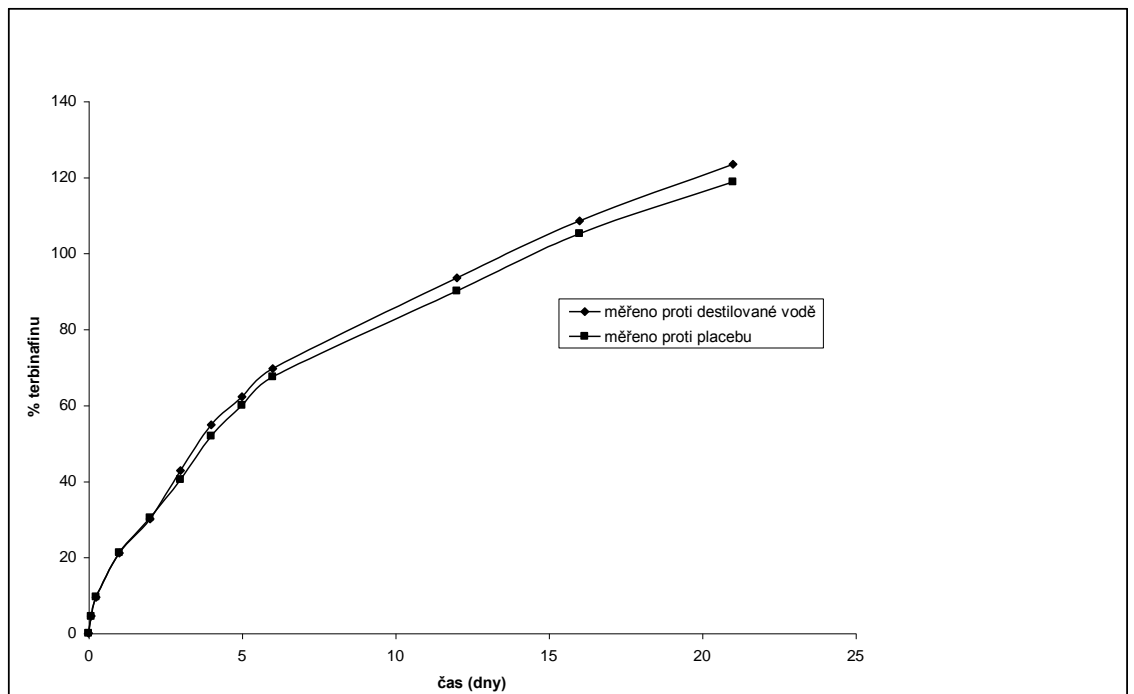
Graf 10: Vliv koncentrace EP na liberaci flukonazolu z nosiče 3D



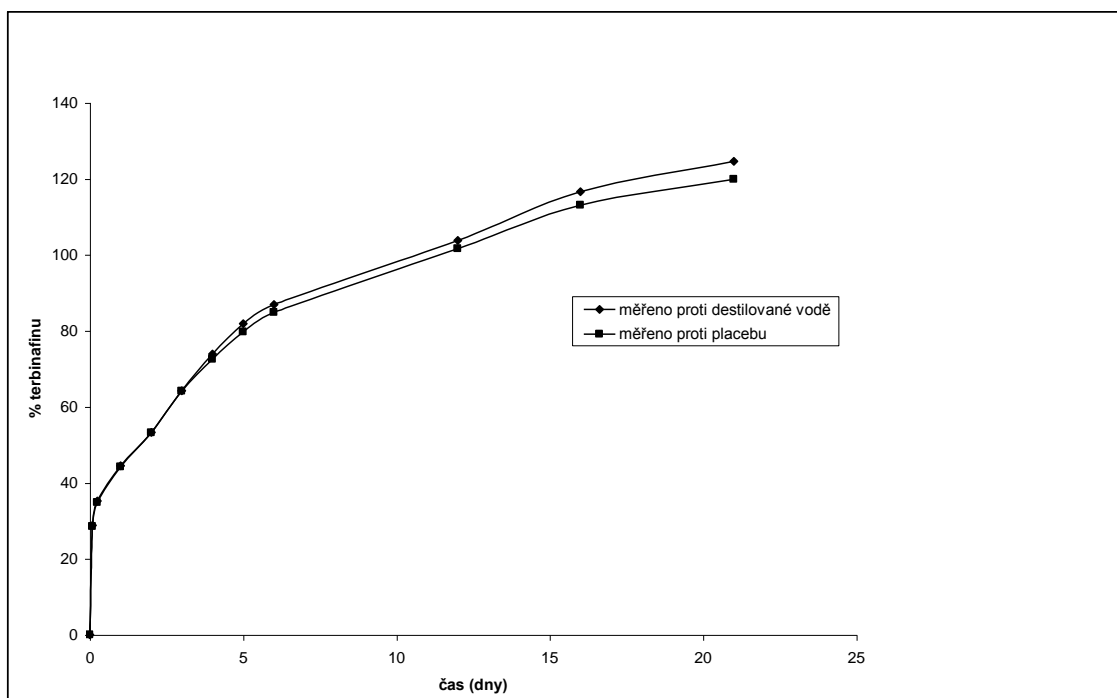
Graf 11: Lineární fáze liberace flukonazolu z nosiče 3D



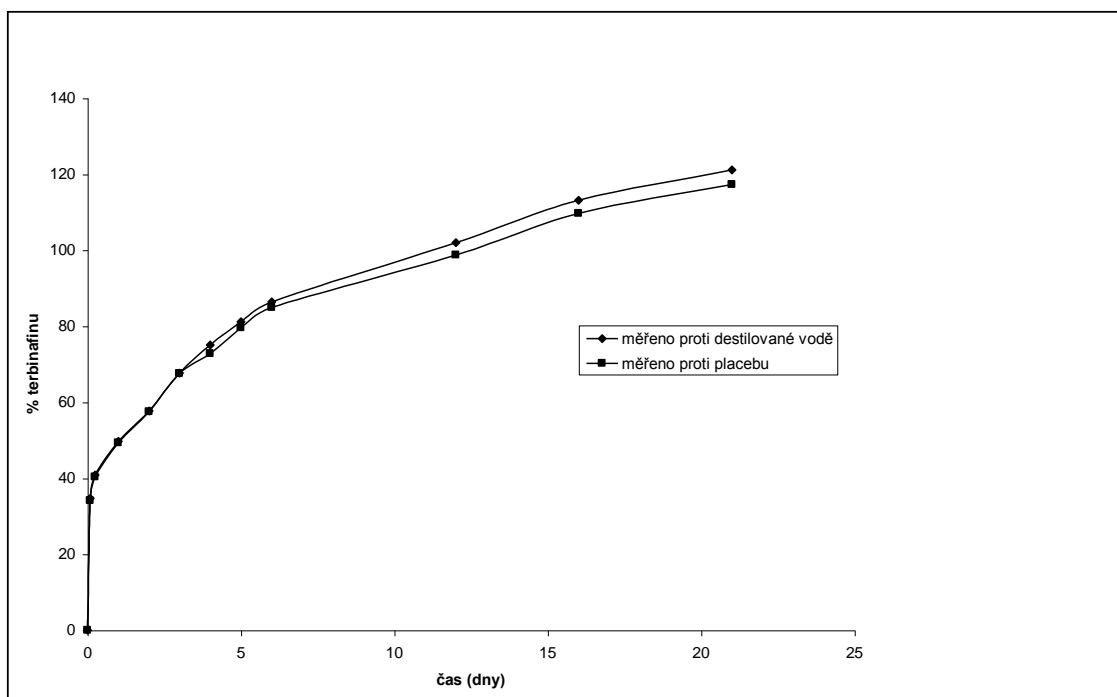
Graf 12: Liberace terbinafinu z nosiče 5M plastifikovaného 10% EP



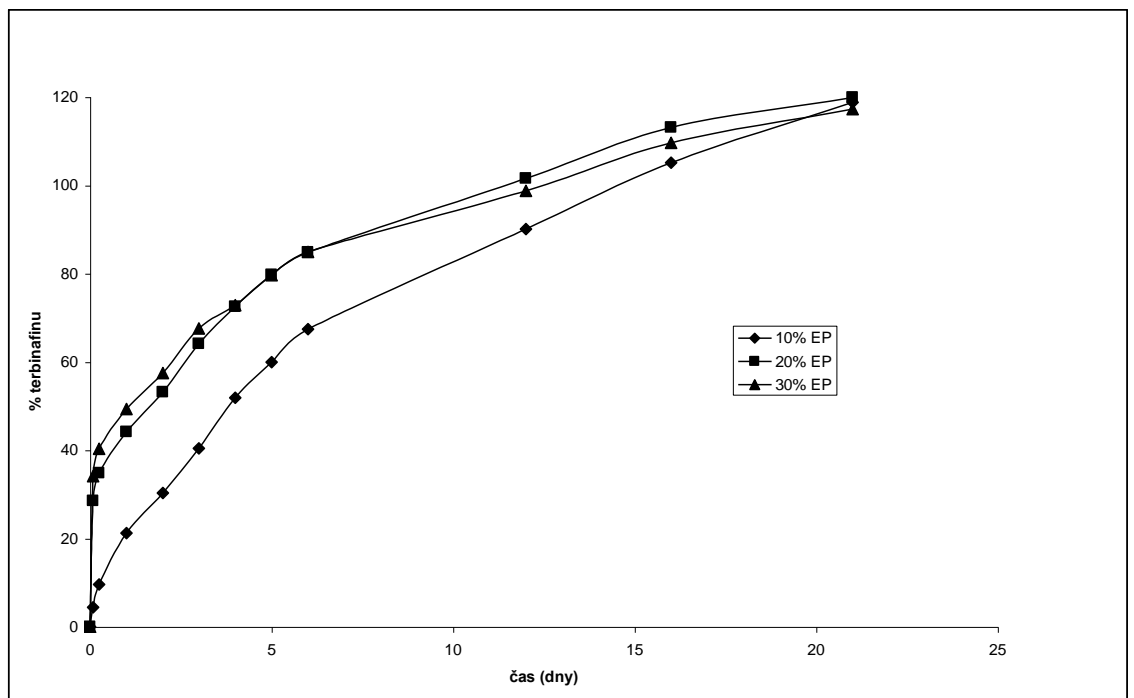
Graf 13: Liberace terbinafinu z nosiče 5M plastifikovaného 20% EP



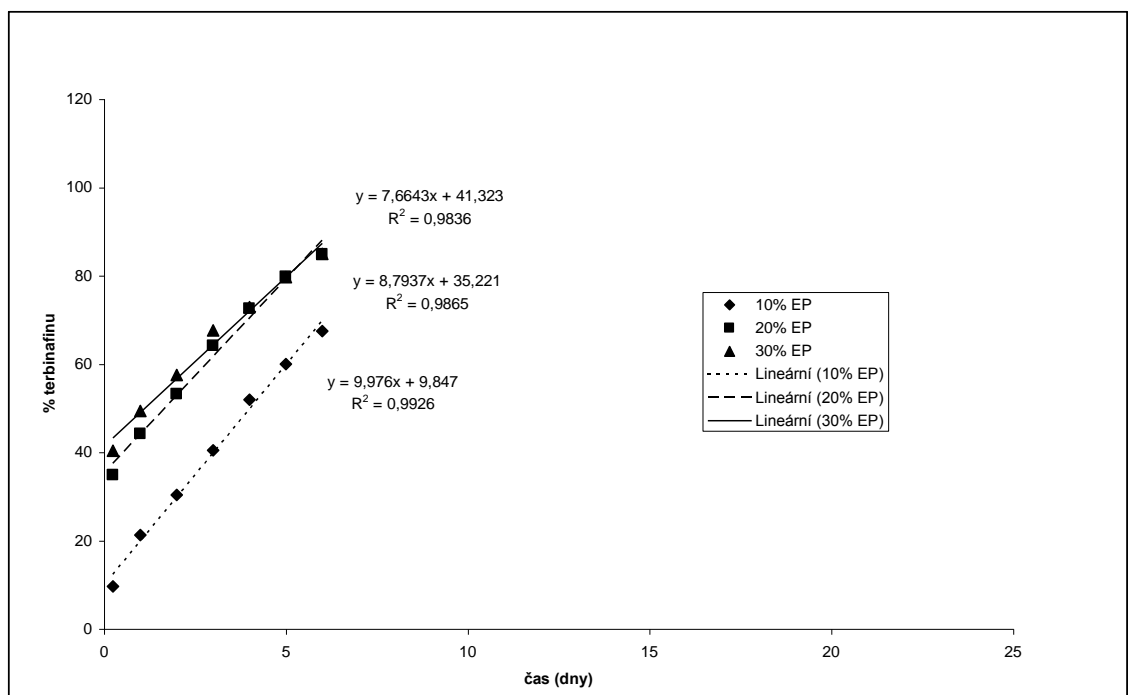
Graf 14: Liberace terbinafinu z nosiče 5M plastifikovaného 30% EP



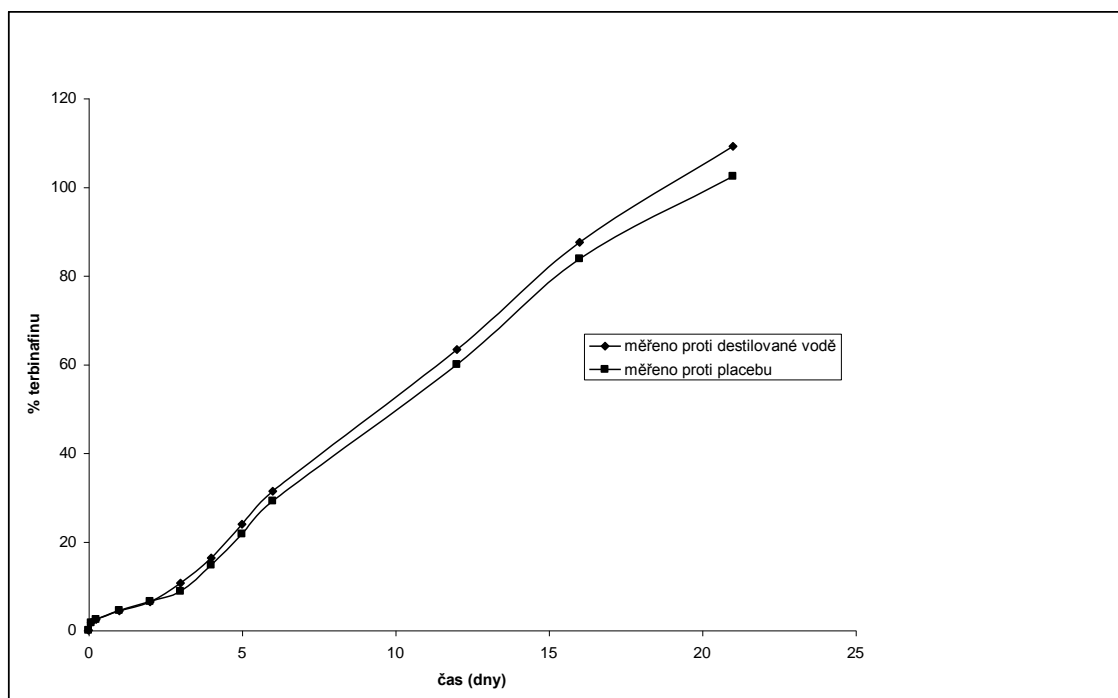
Graf 15: Vliv koncentrace EP na liberaci terbinafinu z nosiče 5M



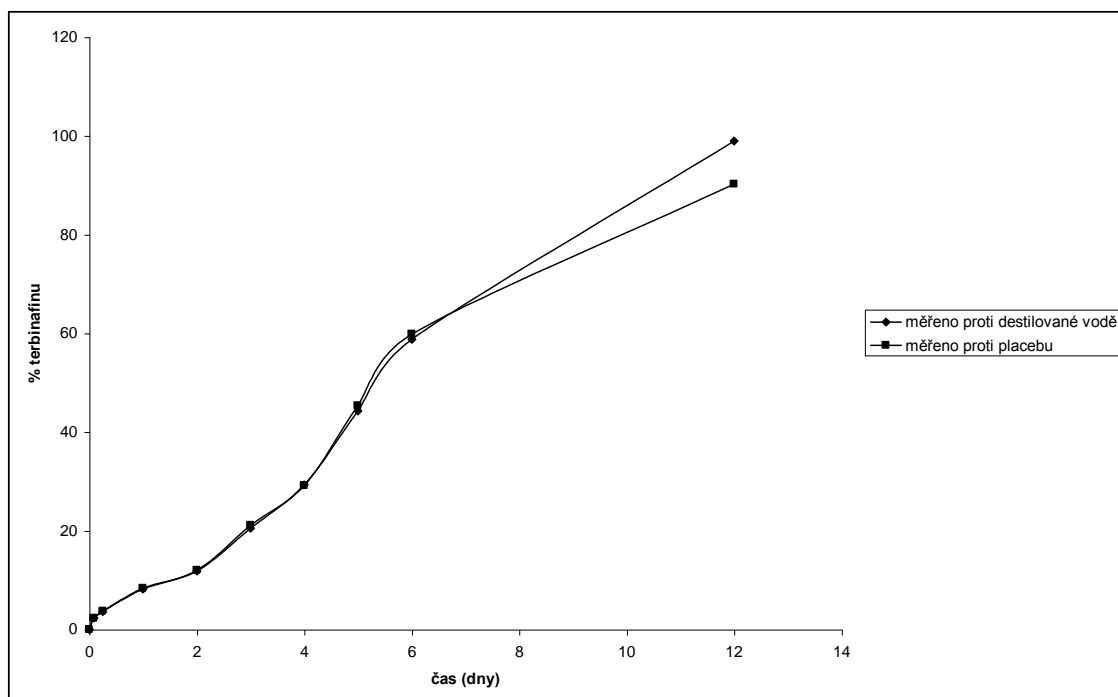
Graf 16: Lineární fáze liberace terbinafinu z nosiče 5M



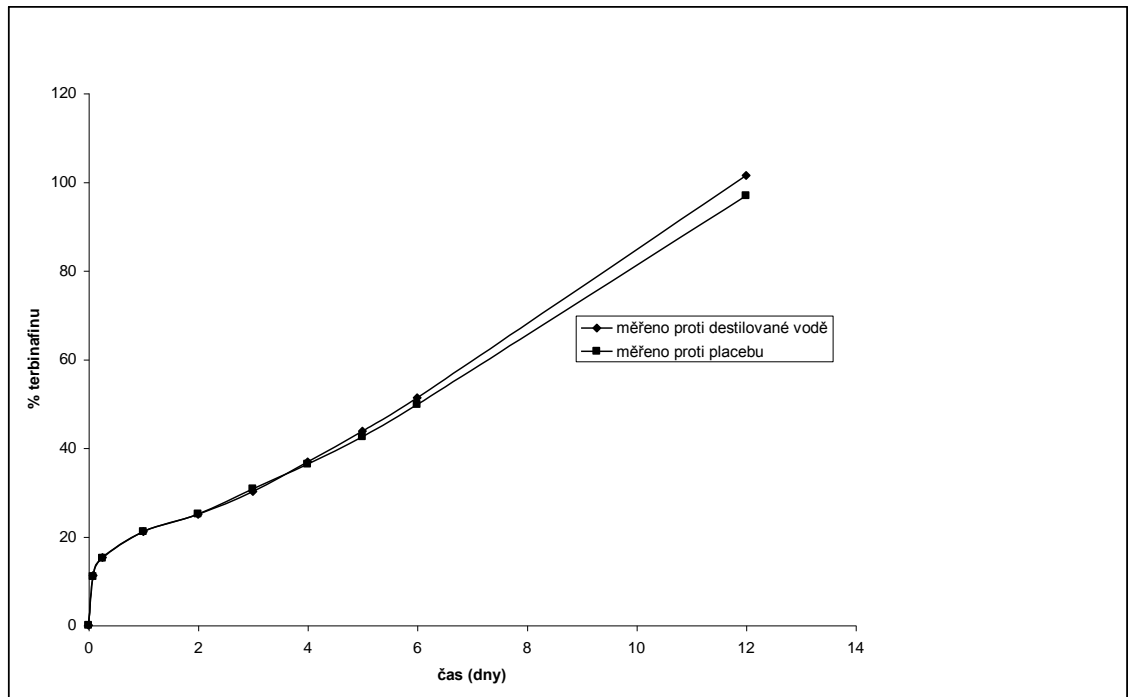
Graf 17: Liberace terbinafinu z nosiče 3D plastifikovaného 10% EP



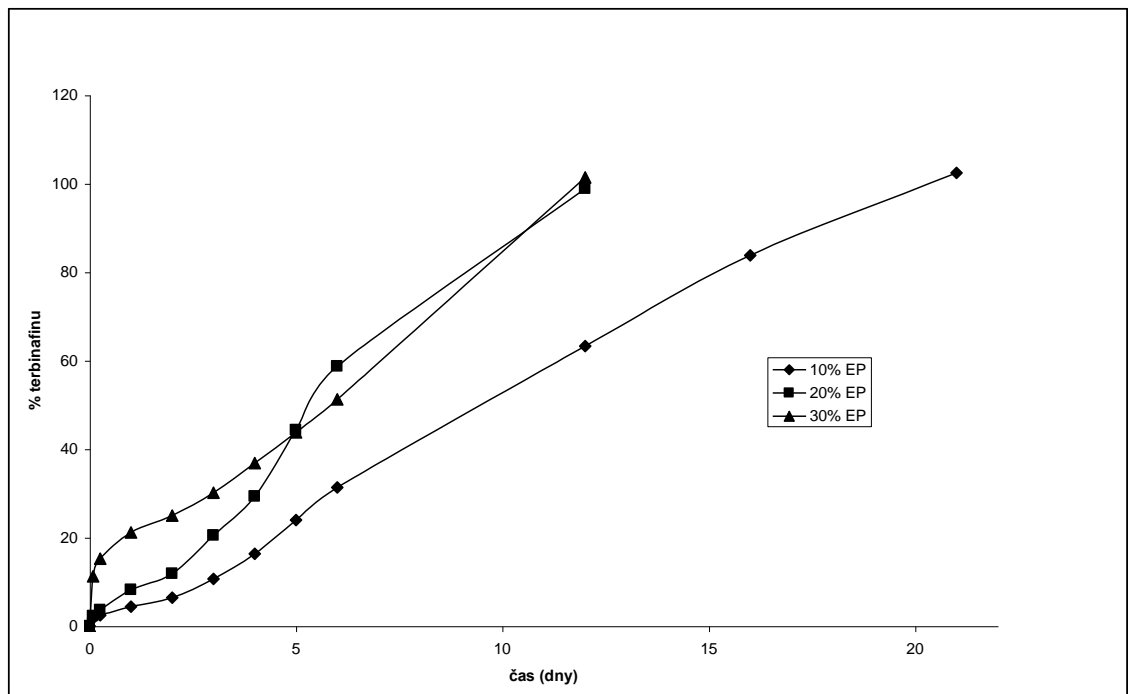
Graf 18: Liberace terbinafinu z nosiče 3D plastifikovaného 20% EP



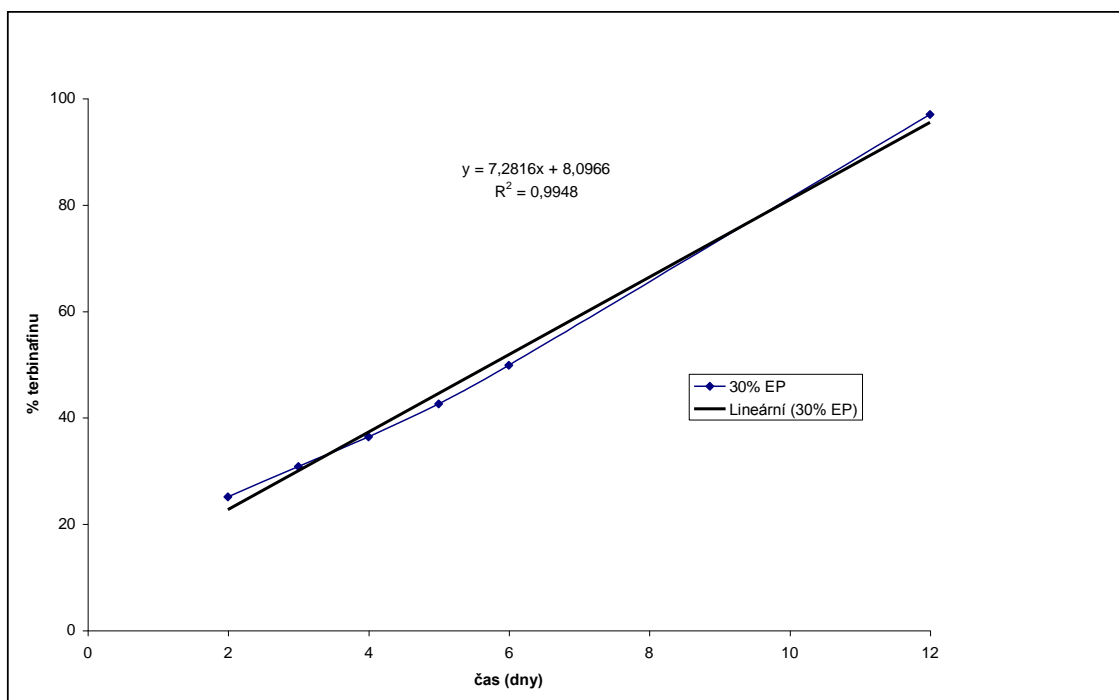
Graf 19: Liberace terbinafinu z nosiče 3D plastifikovaného 30% EP



Graf 20: Vliv koncentrace EP na liberaci terbinafinu z nosiče 3D



Graf 21: Lineární fáze liberace terbinafinu z nosiče 3D plastifikovaného 30% EP



7 Diskuze

V předložené rigorózní práci byly pro liberaci léčiv použity oligoesterové nosiče syntetizované na katedře farmaceutické technologie v roce 2004. Jedná se o kopolymery kyseliny mléčné a glykolové v poměru 1:1 obsahující jako větvičí složku mannitol (M) nebo dipentaerythritol (D). Tyto větvené oligoestary byly jako nosiče léčiv poprvé použity v diplomové práci Davida Mrázka⁶⁰. Na základě výsledků liberačních testů se jako výhodné jevíly nosiče obsahující 3% dipentaerythritolu a 5% mannitolu. Tyto dva oligoestery, pracovníčně označené jako 3D a 5M, byly tedy použity v předkládané rigorózní práci jako nosiče pro liberaci flukonazolu a terbinafinu.

Matrice byly připraveny již dříve vyzkoušenou metodou tavení nosičů s plastifikátorem, nikoli však v horkovzdušné sušárně nebo v silikonové lázni, ale v mikrovlnné troubě. Tavení probíhalo při středním výkonu (600 W) vždy několik minut v závislosti na hmotnosti polymerní směsi. Jako plastifikátor byl použit ethylpyruvát (EP) v koncentraci 10%, 20% nebo 30%. Koncentrace byla zvolena s ohledem na mísitelnost EP s testovanými nosiči. V porovnání s běžně používaným triethylcitrátem ve funkci plastifikátoru, který je mísitelný s většinou oligoesterových nosičů a může být použit téměř bez omezení, je EP termodynamicky horším rozpouštědlem nosičů. Proto mohl být použit maximálně do koncentrace 30%, v případě nosiče 5M s flukonazolem dokonce jen do koncentrace 20%.

K plastifikovanému nosiči bylo přidáno léčivo (terbinafin nebo flukonazol) v koncentraci 4% z celkové hmotnosti matrice. Matrice o hmotnosti 150,0 mg byly studovány jako tvarově shodné tenké disky na dně scintilačních lahvíček. Shodný povrch všech matric byl zajištěn nahřátím dna scintilační lahvičky, čímž se matrice rovnoměrně rozprostřely po dně scintilační lahvičky. Disolučním médiem pro liberaci léčiv byla destilovaná voda. a v průběhu disolučního testu byla měřena aktuální acidita disolučního média. Hodnota pH destilované vody použité jako disoluční médium byla 5,9. V průběhu liberačního testu aktuální acidita klesala v souvislosti s degradací oligoesterového nosiče. Pokles pH byl tím vyšší, čím delší byl časový interval od posledního odběru (výměny disolučního média).

V časových intervalech vhodně zvolených tak, aby byl zachycen celý průběh uvolňování léčiv, byly odebírány vzorky disolučního média a spektrofotometricky stanoveno množství uvolněného léčiva. Absorbance flukonazolu byla měřena při 261 nm a absorbance terbinafinu při 283 nm. Disoluční médium bylo po odběru

vzorku a změření absorbance odlito a nahrazeno novým, aby nedošlo k vytvoření přesyceného roztoku léčiva v případě, že se za daný časový úsek uvolní větší množství.

7.1 Liberace flukonazolu z nosiče 5M

Byly připraveny matrice z nosiče s 5% mannitolu (5M), plastifikované 10% nebo 20% ethylpyruvátu (EP), obsahující 4% flukonazolu. Zároveň byly připraveny placebo matrice, tvořené pouze plastifikovaným nosičem bez obsahu flukonazolu.

Byl proveden osmidenní disoluční test. Absorbance flukonazolu byla měřena proti destilované vodě a proti placebo vzorku (graf 3 a 4). Hodnoty naměřené proti vodě byly vyšší než hodnoty naměřené proti placebo, protože se do nich pravděpodobně promítá absorbance ethylpyruvátu. Průběh liberace flukonazolu z nosiče 5M plastifikovaného 10% a 20% EP je prakticky stejný (graf 5). Jednodenní burst byl 25% resp. 30%. Od 1. dne do 4. dne se flukonazol uvolňoval kinetikou 0. řádu (graf 6). Uvolnilo se 70% resp. 80% inkorporovaného léčiva. Od 4. dne došlo ke zpomalení liberace a do 8. dne se uvolnilo veškeré množství flukonazolu obsažené v matricích.

7.2 Liberace flukonazolu z nosiče 3D

Byla sledována liberace flukonazolu z matric tvořených terpolymerem kyseliny mléčné, glykolové a dipentaerythritolu v poměru 48,5:48,5:3,0 (3D), které byly plastifikované ethylpyruvátem (EP) v koncentraci 10%, 20% nebo 30%. Paralelně byly připraveny placebo matrice složené z nosiče a plastifikátoru, ale bez flukonazolu. Byl proveden statický disoluční test jak s matricemi s léčivem, tak s placebo matricemi. Množství uvolněného flukonazolu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při 281 nm proti destilované vodě a proti placebo vzorku (grafy 7 – 9). Předpokládá se, že je tím eliminován vliv EP a degradačních produktů nosiče na hodnotu naměřené absorbance.

Průběh liberace flukonazolu ovlivňuje použitý nosič. Z nosiče 3D se flukonazol uvolňoval pomaleji než z nosiče 5M. Při plastifikaci pouze 10% EP došlo dokonce k oddálení liberace po dobu 3 dnů (třídenní lag – time). Při použití 20% nebo 30% EP se za 24 hodin uvolnilo 25% resp. 30% flukonazolu (graf 10). Po počáteční fázi liberace, tj. při 10% EP po 3 dnech, při 20% a 30% EP po 6 hod., byl další průběh lineární (graf 11).

7.3 Liberace terbinafinu z nosiče 5M

Byly formulovány matrice s terbinafinem tvořené nosičem 5M a plastifikované 10% až 30% EP. Množství uvolněného terbinafinu bylo stanoveno měřením absorbance při 283 nm proti destilované vodě a proti placebo vzorkům (grafy 12 – 14). Zjištěné hodnoty se téměř nelišily, což lze vysvětlit tím, že pravděpodobně při této vlnové délce ethylpyruvát neabsorbuje.

Liberace terbinafinu probíhala ve třech fázích (graf 15). Za prvních 6 hodin se uvolnilo v závislosti na koncentraci EP v matrici 10%, 35% resp. 40% terbinafinu. V druhé fázi od šesté hodiny do šestého dne probíhala liberace terbinafinu kinetikou 0. řádu (graf 16). Za 6 dnů se z matric plastifikovaných 10% EP uvolnilo 67% terbinafinu, z matric plastifikovaných 20% a 30% EP se uvolnilo shodně 85% terbinafinu. Ve třetí fázi liberace od 6. dne do 21. dne se uvolňování terbinafinu zpomalilo a uvolnilo se zbylé množství terbinafinu obsažené v matricích.

7.4 Liberace terbinafinu z nosiče 3D

Liberace terbinafinu z nosiče 3D probíhala rovněž ve třech fázích, i když jednotlivé fáze jsou na křivkách méně výrazné než při liberaci terbinafinu z nosiče 5M. Vlivem různé koncentrace ethylpyruvátu došlo rovněž k časovému posunu jednotlivých fází.

Při plastifikaci 10% EP (graf 17) se za první 3 dny uvolnilo pouze 9% terbinafinu. Ve druhé fázi od 3. dne do 6. dne se liberace zrychlila a celkově se 6. den uvolnilo 30% terbinafinu. Zbylé množství terbinafinu se uvolnilo do 21. dne od počátku liberace. Při plastifikaci 20% EP (graf 18) se za první 2 dny uvolnilo 12% terbinafinu, od 2. do 6. dne se liberace zrychlila a uvolnilo se 60% terbinafinu, celková doba liberace byla 21 dnů. Při 30% koncentraci ethylpyruvátu v matricích došlo ke zrychlení liberace terbinafinu v počáteční fázi (graf 19). Za 6 hodin se uvolnilo 15% inkorporovaného terbinafinu. V druhé fázi se liberace zpomalila. Za 48 hodin od počátku se uvolnilo 25% terbinafinu. Od 2. dne do 12. dne probíhala liberace kinetikou 0. řádu (graf 21) a uvolnilo se veškeré množství terbinafinu obsažené v matricích.

8 Závěr

Z výsledků předložené rogorózní práce je možno vyvodit následující závěry:

1. Průběh liberace flukonazolu z nosiče 5M plastifikovaného 10% a 20% EP je prakticky stejný. Jednodenní burst byl 25% resp. 30%. Do 4. dne se uvolnilo 70% resp. 80% flukonazolu kinetikou 0. řádu. Celková doba liberace byla 8 dnů.

2. Z nosiče 3D se flukonazol uvolňoval pomaleji než z nosiče 5M. Při plastifikaci pouze 10% EP došlo dokonce k třídennímu oddálení liberace.

3. Liberace terbinafinu z nosičů 5M a 3D probíhala ve třech fázích. Množství uvolněného terbinafinu bylo v počáteční fázi (0 – 6 hodin) závislé na koncentraci ethylpyruvátu v matrici. V druhé fázi (do 6. dne) probíhala liberace terbinafinu kinetikou 0. řádu. Ve třetí fázi liberace od 6. dne do 21. dne se uvolňování terbinafinu zpomalilo a uvolnilo se zbylé množství terbinafinu obsažené v matricích.

9 Souhrn

Předložená rigorózní práce je zaměřena na sledování liberace antimykotických léčiv terbinafinu a flukonazolu z oligoesterových nosičů pracovně označených 5M a 3D. Jedná se o terpolymery kyseliny D,L – mléčné, kyseliny glykolové a 3% dipentaerythritolu nebo 5% mannitolu jako větvící složky.

Tyto degradabilní matrice složené z nosiče, plastifikátoru (10%, 20% a 30% ethylpyruvát) a léčiva (4% flukonazolu nebo terbinafinu) byly připraveny tavením směsi v mikrovlnné troubě a následně pečlivě zhomogenizovány. Stejně se postupovalo při přípravě placebo matrice tvořené pouze nosičem a plastifikátorem. Hmotnost takto připravených matric byla 150 mg. Jako liberační médium pro flukonazol i terbinafin byla zvolena destilovaná voda.

Byla sledována liberace flukonazolu a terbinafinu z matric umístěných ve scintilačních lahvičkách, ze kterých byly odebrány vzorky disolučního média ve vhodně zvolených časových intervalech tak, aby byl zachycen celý průběh uvolňování léčiv. Poté bylo doplněno nové médium do hmotnosti 15,0 g. V průběhu disolučního testu byly matrice umístěny v termostatu vytemperovaném na 37°C. Množství uvolněného flukonazolu bylo stanoveno spektrofotometricky při vlnové délce 261 nm, u terbinafinu při 283 nm. Byly měřeny hodnoty proti vodě a proti placebo.

Bylo vypočteno množství uvolněného flukonazolu a terbinafinu v jednotlivých časových intervalech a graficky vyjádřena závislost kumulativních procent uvolněného flukonazolu a terbinafinu na čase.

Flukonazol se z nosiče 5M uvolňoval 1. až 4. den kinetikou 0. řádu. Uvolnilo se 70% resp. 80% inkorporovaného léčiva. Do 8. dne se uvolnilo veškeré množství flukonazolu obsažené v matricích. Z nosiče 3D se flukonazol uvolňoval pomaleji než z nosiče 5M.

Liberace terbinafinu z nosičů 5M i 3D probíhala ve třech fázích. Množství uvolněného terbinafinu bylo v počáteční fázi závislé na koncentraci ethylpyruvátu v matrici, v druhé fázi probíhala liberace terbinafinu kinetikou 0. řádu. Ve třetí fázi liberace od 6. dne do 21. dne se uvolňování terbinafinu zpomalilo a uvolnilo se zbylé množství terbinafinu obsažené v matricích.

10 Literatura

- 1 Český lékopis 2002, Grada Publishing, Praha 2002, s.1061
- 2 Doležal, P.: Přednášky z farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 2004
- 3 Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2002, s. 34, 473 – 478
- 4 Kearney, A.S.: Prodrugs and targeted drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 19, 1996, 225 – 239
- 5 Hussain, A. and Truelove, J.E.: Prodrug approaches to enhancement of physicochemical properties of drugs. IV. Novel epinephrine prodrug. *J. Pharm. Sci.* 65, 1976, 1510 – 1512
- 6 McClure, D.A.: The effect of a prodrug of epinephrine (dipivalyl epinephrine) in glaucoma – general pharmacology, toxicology, and clinical experience. In: T. Higuchi and V. Stella (Eds) *Prodrugs as Novel Drug Delivery Systems*, American Chemical Society, Washington, DC, 1975, 224
- 7 Chakravarty, P.K., Carl, P.L., Weber, M.J. and Katzenellenbogen, J.A.: Plasmin – activated prodrugs for cancer chemotherapy. II. Synthesis and biological activity of peptidyl derivatives of doxorubicin. *J. Med. Chem.* 26, 1983, 638 – 644
- 8 Jarvest, R.L.: Discovery and characterization of famciclovir (FamvirTM), a novel anti – herpesvirus agent. *Drugs Today* 30, 1994, 575 - 588
- 9 Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J. and Collins, P.: 9 – (2 – hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272, 1978, 583 – 585
- 10 Elion, G.B., Furman, P.A., Fyfe, J.A., de Miranda, P., Beauchamp, L. and Schaeffer, H.J.: Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9 – (2 – hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1977, 5716 – 5720
- 11 Wilding, I.R., Davis, S.S. and O'Hagan, D.T.: Targeting of drugs and vaccines to the gut. *Pharmacol. Ther.* 62, 1994, 97 – 124
- 12 Tozer, T.N., Friend, D.R. and McLeod, A.D.: Kinetic perspectives on colonic delivery. *STP Pharm. Sci.* 5, 1995, 4 – 12

-
- 13 Schroder, H. and Campbell, D.E.S.: Absorption, metabolism, and excretion of salicylazosulfonylpyridine in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 13, 1972, 539 – 551
 - 14 Peppercorn, M.A. and Goldman, P.: Distribution studies of salicylazopyridine and its metabolites. *Gastroenterology* 64, 1973, 240 – 245
 - 15 Azad – Kahn, A.K., Piris, J. and Truelove, S.C.: An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet* 2, 1977, 892 – 895
 - 16 Friend, D.R. and Chang, G.W.: A colon – specific drug – delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. *J. Med. Chem.* 27, 1984, 261 – 266
 - 17 Friend, D.R. and Chang, G.W.: Drug glycosides: potential prodrugs for colon – specific drug delivery. *J. Med. Chem.* 28, 1985, 51 – 57
 - 18 Simpkins, J.W., Smulkowski, M., Dixon, R. and Tuttle, R.E.: Evidence for the delivery of narcotic antagonists to the colon as their glucuronide conjugates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 1988, 195 – 205
 - 19 Haeberlin, B., Rubas, W., Nolen, H.W. and Friend, D.R.: In vitro evaluation of dexamethasone – β – D – glucuronide for colon – specific drug delivery. *Pharm. Res.* 10, 1993, 1553 – 1562
 - 20 Nolen, H.W. and Friend, D.R.: Menthol – β – D – glucuronide: A potential prodrug for treatment of the irritable bowel syndrome. *Pharm. Res.* 11, 1994, 1707 – 1711
 - 21 Schon, A.H.: Modulation of antibody response by conjugation to antigens with monoethoxypolyethylene glycol. *Adv. Exp. Med. Biol.* 251, 1989, 341 – 351
 - 22 Lederman, J.A., Begent, R.H.J., Bagshawe, K.D., Riggs, S.J., Searle, F., Glaser, M.G., Green, A.J. and Dale, R.G.: Repeated anti – tumour antibody therapy in man with suppression of the host response by cyclosporin A. *Br. J. Cancer* 58, 1988, 654 – 657
 - 23 Miyashita, H., Karaki, Y., Kikuchi, M. and Fujii, I.: Prodrug activation by catalytic antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, 5337 – 5340
 - 24 Garnett, M.C., Embleton, M.J., Jacobs, E. and Baldwin, R.W.: Studies on the mechanism of action of an anti – body – targeted drug – carrier conjugate. *Anti – Cancer Drug. Des.* 1, 1985, 3 – 12
 - 25 Frazza, E.J. and Schmitt, E.E.: A new absorbable suture. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 1, 1971, 43 – 58
 - 26 Wasserman, D.: US Patent 1, 375, 008, 1971

-
- 27 Dunn, R.L., English, J.P., Strobel, J.D., Cowsar, D.R. and Tice, T.R.: Preparation and evaluation of lactide/glycolide copolymers for drug delivery, In: C. Migliaresi (Ed.), *Polymers in medicine*, Vol. 3, Amsterdam, Elsevier 1988
 - 28 Vert, M., Chabot, F., Leray, J. and Chrsitel, P.: Bioresorbable polyesters for bone surgery. *Makromol. Chem. Suppl.*, 5:30, 1981
 - 29 Li, S. and Vert, M.: Biodegradation of aliphatic polyesters, In: G. Scott and D. Gilead (Eds.), *Biodegradable Polymers, Principles and Applications*, London, Chapman & Hall, 1995, 43 – 87
 - 30 Kitchell, J.P., Wise, D.L.: *Meth. Enzymol.*, 112, 1985, 436 – 448
 - 31 Wu, X.S.: in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering* (D.L. Wise et al., eds), Marcel Dekker, Inc., New York 1995, 1015 – 1054
 - 32 Vert, M.: *Proc. Int. Conf. Adv. Controlled Delivery*, Baltimore, MD, 1996, 32 – 36
 - 33 Ginde, R.M., Gupta, R.K.: *J. Appl. Polym. Sci.*, 33, 1987, 2411 – 2429
 - 34 Tice, T.R., Cowsar, D.R.: *Pharm. Technol.*, 1984, 26 – 35
 - 35 Gogolewski, S., Pennings, A.J.: *J. Appl. Polym. Sci.*, 28, 1983, 1045 – 1061
 - 36 Schnidler, A., Jeffcoat, R., Kimmel, G.L., Pitt, C.G., Wall, M.E., Zweidinger, R.: *Contemporary Topics in Polymer Science volume 2*, Plenum Press, New York 1977, 251 – 289
 - 37 Cohen, S., Alfonso, M.J., Langer, R.: *Int. J. Technol. Assessment in Health Care*, 10(1), 1994, 121 – 130
 - 38 Dijkstra, P.J., Bulte, A., Feijen, J.: *The 17th Annual Meeting of the Society for Biomaterials*, 1991, 184
 - 39 Lewis, D.H.: in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (M. Chasin and R. Langer, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York 1990, 1 – 41
 - 40 Jamshidi, K., Hyon, S.H., Ikada, Y.: *Polymer*, 29, 1988, 2229 – 2234
 - 41 Pegoretti, A., Fambri, L., and Migliaresi, C.: In vitro degradation of poly(L – lactic acid) fibers produced by melt – spinning . *J. Appl. Polym.Sci.*, 64, 1997, 213 – 233
 - 42 Eenink, M.J.D., Feijen, J., Olijslager, J., Albers, J.H.M., Rieke, J.C. and Greidanus, P.J.: Biodegradable hollow fibers for the controlled release of hormones. *J. Controlled Release*, 6, 1987, 225 – 247
 - 43 Bodmeier, R. and Chen, H.: Evaluation of biodegradable poly(lactide) pellets prepared by direct compression. *J. Pharm Sci.*, 78, 1989, 819 – 822

-
- 44 Yamakawa, I., Kawahara, M., Watanabe, S. and Miyake, Y.: Sustained release of insulin by double – layered implant using poly(DL – lactic acid). *J. Pharm. Sci.*, 79(6), 1990, 505 – 509
- 45 Zhang, X., Wyss, U.P., Pichors, D., Amsden, B. and Goosen, M.F.A.: Controlled release of albumin from biodegradable poly(DL – lactide)cylinders. *J. Controlled Release*, 35, 1993, 61 – 69
- 46 Gangadharam, P.R.J., Ashtekar, D.R., Farhi, D.C. and Wise, D.L.: Sustained release of isoniazid in vivo from a single implant of biodegradable polymer. *Tubercle*, 72, 1991, 115 – 122
- 47 Bhardwaj, R. and Blanchard, J.: In vitro evaluation of poly(DL – lactide – co – glycolide) polymer – based implants containing the sloha – melanocyte stimulating hormone analog, Melanotan – I. *J. Controlled Release*, 45, 1997, 49 – 55
- 48 Jimoh, A.G., Wise, D.L., Gresser, J.D. and Trantolo, D.J.: Pulsed FSH release from an implantable capsule system. *J. Controlled Release*, 34, 1995, 87 – 95
- 49 Lambert, W.J. and Peck, K.D.: Development of an in situ forming biodegradable polylactide – co – glycolide system for the controlled release of proteins. *J. Controlled Release*, 33, 1995, 237 – 243
- 50 de Groot, J.H., Zijlstra, F.M., Kulpers, H.W., Pennings, A.J., Klompaker, J., Veth, R.P.H. and Jansen, H.W.B.: Meniscal tissue regeneration in porous 50/50 copoly(L – lactide/ ϵ – caprolactone)implants. *Biomaterials*, 18, 1997, 613 – 622
- 51 Barrows, T.H.: Synthetic absorbable surgical devices of polyester(amides), US Pat. 4343931, 1982
- 52 Gilding, D.K.: Biodegradable polymers for use in surgery – poly(ethylen – oxide) – poly(ethylene – terephthalate) (PEO – PET) co – polymers. 2. In vitro degradation, *Polymer*, 22, 1981, 499 – 504
- 53 Fakirov, S., Gogeva, T.: Poly(ether – ester)s based on poly(butylene – terephthalate) and poly(ethyleneglycol). 1. poly(ether – ester)s with various polyether – polyesters ratios, *Makromol. Chem.*, 191, 1990, 603 – 614
- 54 Radder, A.M., Leenders, H., van Blitterswijk, C.A.: Application of porous PEO/PBT copolymers for bone replacement, *J. Biomed. Mater. Res.*, 30, 1996, 341 – 351
- 55 Bezemer, J.M., Grijpma, D.W., Dijkstra, P.J., van Blitterswijk, C.A., Feijen, J.: A controlled release system for proteins based on poly(ether – ester) block copolymers: polymer network characterization, *J. Control. Rel.*, 62, 1999, 393 – 405

-
- 56 Lakshmi, S., Katti, D.S., Laurencin, C.T.: Biodegradable polyphosphazenes for drug delivery applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 2003, 467 – 482
- 57 King, M.E., Kinney, A.Y.: Tissue adhesives: a new method of wound repair, *Nurse Pract.*, 24, 1999, 66 – 73
- 58 Oowaki, H., Matsuda, S., Sakai, N., Okta, T., Iwata, H., Sadato, A., Taki, W., Hashimoto, N., Ikada, Y.: Non – adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery, *Biomaterials*, 21, 2000, 1039 – 1046
- 59 Buchta, V., Jílek, P., Horáček, J., Horák, V.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha 1998, s. 52 – 53, 151 – 155
- 60 Mrázek, D.: *Biodegradabilní systémy s protimikrobními léčivy*, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 2005