

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**ADHEZIVNÍ VLASTNOSTI OLIGOESTERŮ
VĚTVENÝCH PENTAERYTHRITOLEM
A TRIPENTAERYTHRITOLEM**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Hradec Králové, 2008

Mgr. Šárka Podzimková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Děkuji PharmDr. Evě Šnejdové, Ph.D. za odborné vedení při vypracování rigorózní práce.

Šárka Podzimková

OBSAH

1. ÚVOD.....	5
2. CÍL PRÁCE.....	6
3. SEZNAM ZKRATEK	7
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
4.1. VYUŽITÍ BIOADHEZE PRO PERORÁLNÍ PODÁNÍ PEPTIDOVÝCH A PROTEINOVÝCH LÉČIV DO GIT	9
4.1.1. LIMITACE PODÁNÍ.....	10
4.1.2. MOŽNOSTI ZLEPŠENÍ PODÁNÍ	11
4.2. POLYMERY POUŽÍVANÉ V BDDS	14
4.2.1. CHITOSAN A JEHO DERIVÁTY	15
4.2.2. DERIVÁTY CELULOSY A JINÉ HYDROFILNÍ POLYMERY.....	16
4.2.3. LAKTOYL / KAPROLAKTONOVÉ KOPOLYMERY	17
4.2.4. DERIVÁTY POLYAKRYLOVÉ KYSELINY.....	18
4.3. CYTOADHEZE.....	21
4.3.1. LEKTINY	22
4.3.2. BAKTERIÁLNÍ ADHEZINY	25
4.3.3. VIROVÉ ADHEZIVNÍ FAKTORY	25
4.3.4. SELEKTINY	26
4.4. SPECIFICKÁ ENDO- A TRANSCYTÓZA jako nová perspektiva vývoje makromolekulárních nosičů léčiv	27
4.4.1. RECEPTOREM ZPROSTŘEDKOVANÁ ENDO/TRANSCYTÓZA	28
4.4.2. ADSORPČNÍ ENDO/TRANSCYTÓZA	29
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
5.1. POUŽITÉ SUROVINY.....	31
5.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	31
5.2.1. Materiálový zkušební stroj T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell.....	32
5.2.2. Brookfieldův digitální viskozimetr - model DV-E.....	32
5.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ	33
5.3.1. Plastifikované oligoestery.....	33
5.4. POSTUP MĚŘENÍ.....	34
5.4.1. Měření adheze.....	34

5.4.2. Měření viskozity	34
5.5. VYHODNOCENÍ.....	35
5.5.1. Měření adheze.....	35
5.5.2. Měření viskozity	36
6. VÝSLEDKY	37
6.1. TABULKY.....	38
6.1.1. Měření adheze.....	38
6.1.2. Měření viskozity	42
6.2. GRAFY.....	43
6.2.1. Měření adheze.....	43
6.2.2. Měření viskozity	45
7. DISKUZE	48
7.1. <i>Adhezivita plastifikovaných oligoesterů.....</i>	<i>49</i>
7.2. <i>Dynamická viskozita plastifikovaných oligoesterů.....</i>	<i>52</i>
8. ZÁVĚRY.....	54
9. SOUHRN	55
10. LITERATURA.....	57

1. ÚVOD

Bioadheze resp. mukoadheze je jev, při kterém substrát adhezuje k biologickému povrchu, resp. mukóze. V současnosti je hojně využívána při podání léčiv. Oproti klasickému podání umožňuje prodloužený kontakt s epitelem nebo mucinem, což má za následek nižší dávkovací interval, zvýšení biodostupnosti léčiva a tím lepší compliance pacienta. Mukoadheze je jev nespecifický, proto je dnes větší důraz kladen na výzkum cílenější mukoadheze - cytoadheze, prostřednictvím specifických, receptory zprostředkovaných interakcí. Jako velmi atraktivní nosiče pro perorální podání léčiv se jeví lektiny.

Nejčastějším a nejjednodušším způsobem aplikace léčiv je perorální podání. Je málo invazivní, levné, nevyžaduje školený personál. Nevýhodou je ale vysoký first-pass efekt (efekt prvního průchodu játry), rychlá přeměna hlenu a enzymatická degradace v GIT. Nové mukoadhezivní lékové formy se snaží překonat tato omezení různými cestami, působí např. jako enzymové inhibitory nebo jsou léčiva inkorporována do umělých nosičových systémů (lipozomy, nanočástice, farmakozomy). Podání proteinů nebo polysacharidů je kvůli jejich malé absorpci běžně omezeno jen na parenterální aplikaci. Novější mukoadheziva, jako jsou deriváty chitosanu, dovolují podání per os pro jejich schopnost reversibilně otevřít tight junction a tím umožnit paracelulární transport.

Specifická vazba mukoadheziva na buněčný povrch není nezbytně omezena jen na prostou fixaci bioadhezivního ligandu, ale může následně docházet i ke včlenění tohoto ligandu do buňky. Dochází tedy k vezikulárním transportním procesům (endocytóza a transcytóza).

Mezi nejčastější polymery používané BDDS patří chitosan a jeho deriváty, laktoyl/kaprolaktonové kopolymery, deriváty celulosy a deriváty kyselin akrylové a polyakrylové.

2. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce je studium reologických a adhezivních vlastností oligoesterů kyseliny D,L-mléčné a glykolové větvených pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem.

Úkol diplomové práce je možno rozdělit do těchto dílčích kroků:

1. Připravit vzorky pro měření viskozity a adheze: pro plastifikaci oligoesterů použít triethylcitrát v koncentraci 30%.
2. Na viskozimetru Brookfield DV-E s adaptérem pro malé množství vzorku změřit viskozitu plastifikovaných oligoesterů při teplotě 37°C vřetenem č.14.
3. Na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell měřit adhezivní vlastnosti připravených vzorků jako maximální sílu F_{max} v jednotkách Newton, potřebnou pro odtržení vzorku od podkladu.
4. Za stejných podmínek změřit dynamickou viskozitu a adhezivní sílu plastifikovaného lineárního oligoesteru tvořeného ekvimolárním množstvím kyselin L-mléčné a glykolové a výsledky porovnat.
5. Hodnoty adhezivní síly F_{max} v jednotkách Newton přepočítat na velikost kontaktní plochy a porovnat s výsledky získanými v diplomové práci.

3. SEZNAM ZKRATEK

1P.....	oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 1% pentaerythritolu
1T.....	oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 1% tripentaerythritolu
3P.....	oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 3% pentaerythritolu
3T.....	oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 3% tripentaerythritolu
5P.....	oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 5% pentaerythritolu
5T.....	oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 5% tripentaerythritolu
BDDA.....	bioadhesive drug delivery systems – bioadhezivní terapeutické systémy léčiv
F_{max}	maximální síla potřebná pro odtržení adheziva od podkladu
$\varnothing F_{max}/S$	průměrná F_{max} vztažená na velikost kontaktní plochy
GIT.....	gastrointestinální trakt
HPMC.....	hydroxypropylmethylcellulosa
LE.....	vzdálenost mezi horní a dolní adhezivní plochou
PLGA	oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové 50% : 50%
PVA.....	polyvinylalkohol
PVP.....	polyvinylpyrrolidon
RPM.....	počet otáček vřetena za minutu
S.....	směrodatná odchylka
XG.....	xanthanová guma

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. VYUŽITÍ BIOADHEZE PRO PERORÁLNÍ PODÁNÍ PEPTIDOVÝCH A PROTEINOVÝCH LÉČIV DO GIT

Hlavním cílem perorálního bioadhezivního terapeutického systému léčiv (BDDS - bioadhesive drug delivery systems) je především prodloužit a zintenzivnit kontakt mezi přípravkem s řízeným uvolňováním léčiva a žaludeční nebo střevní sliznicí, což má za následek zvýšenou absorpci léčiva, prodloužení dávkového intervalu, vzestup biologické dostupnosti léčiva a zvýšení compliance pacienta. Nicméně výsledky studií bioadheze s běžně používanými polymery zklamaly. Hlavní potíží jsou zřejmě fyziologické zvláštnosti hlenu v GIT (přeměna hlenu), další nevýhodou je vyšší koncentrace léčiva aplikovaného na omezenou plochu, a tím možné poškození sliznice. Pro efektivnější podání peptidů, proteinů a dalších látek (polynukleotidy, polysacharidy) neparentální cestou, především aplikací do GIT, je tedy nutné vytvořit nové metody aplikace, které by překonaly omezení běžných bioadhezivních systémů - enzymatické a difúzní bariéry.

Následně prováděnými výzkumy byly získány jednak nadějně mukoadhezivní polymery odvozené od polyakrylové kyseliny, které působí jako inhibitory proteolytických enzymů, a navíc také jistota, že interakce mezi různými typy mukoadhezivních polymerů a epiteálními buňkami mají přímý vliv na permeabilitu mukózy. Tyto mukoadhezivní polymery jsou tak považovány za novou třídu tzv. multifunkčních makromolekul.

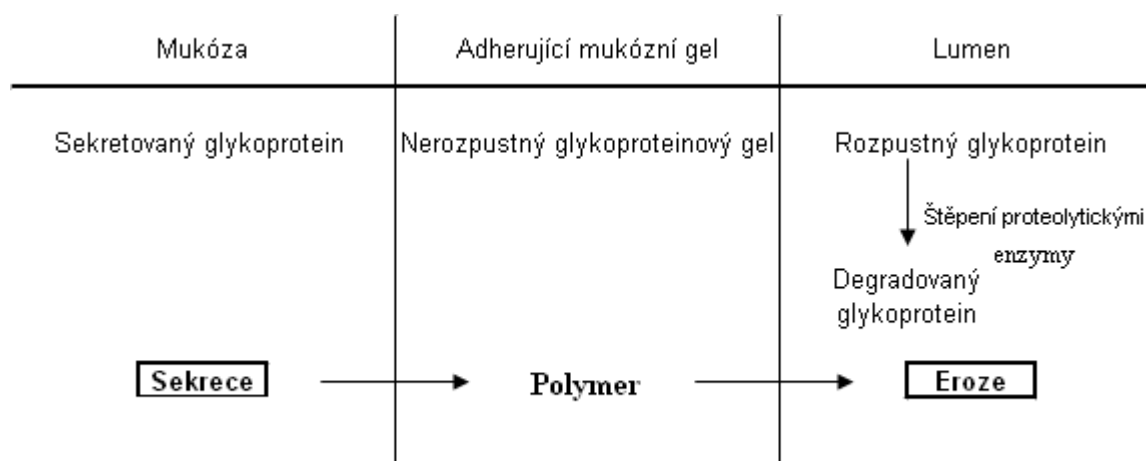
Částečné překonání problémů týkajících se hlenu v GIT a zajištění delší fixace v lumen GIT může být vyřešeno v současnosti velmi studovanou bioadhezí specifických biomolekul prostřednictvím *receptor – ligandových interakcí*, kde vazba k povrchu samotných epiteálních buněk je výhodnější než vazba k hlenu. Těmito specifickými bioadhezivními molekulami mohou být rostlinné lektiny, nové syntetické polymery či bakteriální nebo virové adhezivní faktory. Kromě prosté fixace nosičů léčiv v GIT může být přímý bioadhezivní kontakt k apikální buněčné membráně využit i k indukci aktivních transportních vezikulárních procesů, jako je endocytóza a transcytóza.

4.1.1. LIMITACE PODÁNÍ

Hlavními limitacemi podání mukoadheziv do GIT jsou :

- nespecifičnost mukoadheze v GIT
- rychlá inaktivace BDDS před dosažením cílové tkáně, způsobená přítomností hlenu, hlenových degradačních produktů či potravy v lumen GIT
- trvání adhezivního kontaktu k mukózní tkáni zprostředkovaného adhezí k hlenové gelové vrstvě pouze v případě pevného ulpění hlenu k jeho buněčnému substrátu.

Přítomnost hlenové gelové vrstvy adhezující k povrchu intestinálního epitelu je výsledkem tzv. ustálených, do rovnováhy probíhajících procesů,¹ kdy jsou mucinové glykoproteiny kontinuálně secernovány pohárkovými buňkami epitelu a ihned při uvolňování mění svoje reologické vlastnosti z nízkoviskózního roztoku na viskoelastický gel. Na lumenální povrchu je adhezující gelová vrstva kontinuálně mechanicky a enzymaticky erodována (tzv. *přeměna hlenu* - pohybuje se řádově v hodinách). (Obr.1)



Obr.1 : Přeměna mukózní hlenové vrstvy ¹

Následkem přeměny hlenu je lumen GIT vyplněno odloučeným hlenem, který může adherovat k lékovým formám. To snižuje např. schopnost tablet dosáhnout hlenové vrstvy pokrývající buněčný povrch. Za těchto podmínek by se potenciální mukoadhezivní přípravky chovaly jako normální tablety, procházející gastrointestinálním traktem s lumenálním obsahem.³⁸

Klinické studie na člověku naznačují, že mukoadheze polycarbophilu ve vagíně trvá 1-3 dny², zatímco v GIT řádově pouze hodiny. Na rozdíl od tenkého střeva totiž není vaginální epitel potažen vrstvou hlenu, ale je pouze zvlhčován transsudací (prosakováním do okolních dutin) intersticiální tekutiny přes paracelulární póry. V důsledku běžného, slabě kyselého pH a nedostatku hlenu je tedy tento orgán vhodnějším cílovým místem mukoadheziv polyakrylového typu než GIT. Studie³ naznačují, že mukoadhezivum aplikované do žaludku je velmi rychle inaktivováno, naopak dosažení mukózy tenkého střeva je snazší, ačkoliv omezení v důsledku přeměny hlenu zůstávají.

Z těchto studií i z mnoha výzkumů prováděných na potkanech vyplývá, že tlusté a slepé střevo je lepším místem pro mukoadhezi než žaludek a střední část tenkého střeva (jejunum) v důsledku tenčí hlenové vrstvy a méně časté přeměny hlenu.

4.1.2. MOŽNOSTI ZLEPŠENÍ PODÁNÍ

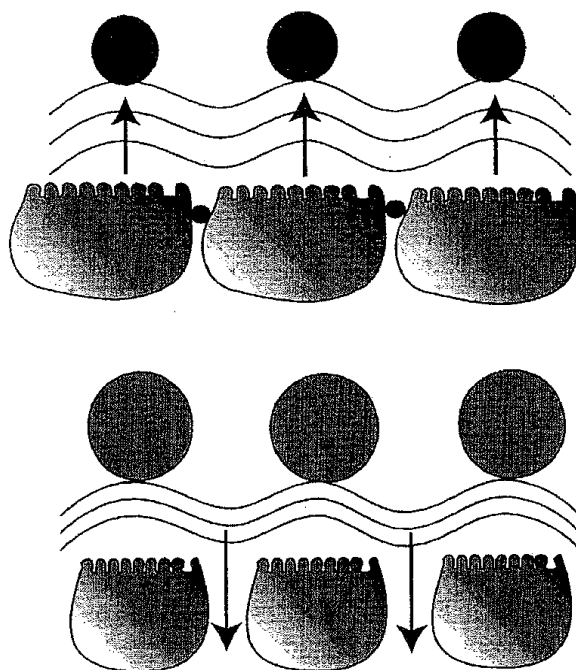
V důsledku existence enzymatických a fyzikálních absorpčních bariér vyžaduje úspěšné podání peptidových léčiv do GIT vytvoření nových technologií, které by chránily tato léčiva před proteolytickým štěpením a současně zlepšily jejich penetraci přes střevní epitel.

- Koncepty předpokládající *inkorporaci léčiv do umělých nosičových systémů*, jako jsou lipozomy, nanočástice, farmakozomy a proteinoidní makrosféry.
- Studie popisují zvýšení biodostupnosti perorálních forem přidáváním malých molekul, které působí buď jako *enzymové inhibitory* (aprotinin, bestatin) nebo jako *penetrační enhancery* (surfaktanty, žlučové kyseliny, vápníkové chelátory). V tomto kontextu tak vznikají přístupy předpokládající aplikaci bio/mukoadhezivních polymerů, které jsou schopny nejen adherovat k mucinovým/epiteliálním povrchům, ale také zvyšují permeabilitu epitelu a inhibují proteolytické enzymy.

Oba mechanismy jsou ale částečně omezeny toxicitou přísad ve smyslu přímého poškození mukózy nebo nežádoucích účinků při vstřebání těchto látek do krve.

- *ENZYMOVÁ INHIBICE* - výzkumy bylo zjištěno, že především deriváty kyseliny polyakrylové jsou schopné inhibovat proteázy. Tyto deriváty totiž obsahují velké množství karboxylových funkčních skupin, schopných chelatovat divalentní kationty (Ca^{2+} , Zn^{2+}), které jsou esenciálními kofaktory metaloproteáz. Navázání těchto kofaktorů vede ke kompletní ztrátě enzymové aktivity v důsledku ireverzibilních strukturálních změn. Tyto inhibiční vlastnosti nesouvisí s mukoadhezivními vlastnostmi dané molekuly ani s viskozitou přípravku. Zmíněné inhibiční polymery byly využity ve vysokých dávkách jako objemová laxativa ale i jako antidiarhoika, aniž by se projeví nežádoucí vedlejší účinky, což by mohlo být výhodou oproti dosud používaným nízkomolekulárním enzymovým inhibitorům (aprotinin nebo bestatin).
- *ZLEPŠENÍ PENETRACE* – studie ukázaly, že biologická dostupnost inzulínu po jeho nasální aplikaci je vysoce zvýšena, pokud léčivá forma obsahuje bioadhezivní škrobové mikrosféry. Důvodem je pravděpodobně dočasné zvýšení permeability epitelu, spíše než prodloužení residenčního času. In vitro studie na buněčných kulturách naznačují, že suché materiály, které jsou schopné bobtnat (škrobové mikrosféry), vedou k reverzibilnímu ohniskovému rozšíření tight junctions, a tím ke zvýšení absorpce paracelulární cestou. (obr.2). Pokud je polymer se schopností bobtnat aplikován jako suchý prášek, absorbuje vodu z epitelálního substrátu, což vede k dehydrataci buněk a k jejich následnému svraštění.⁴

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



Obr.2 : Hypotetický mechanismus otevření tight junctions mezi mukózním epitelem při kontaktu se suchými bobtnajícími polymery (např. škrobovými makrosférami) ⁵

4.2. POLYMERY POUŽÍVANÉ V BDDS

V současné době se látky o vyšší molekulové hmotnosti, jako jsou peptidy, proteiny a polysacharidy, aplikují pouze parenterálně kvůli jejich malé absorpci přes epiteliální bariéru. To je nevýhodné hlavně z hlediska nižší compliance pacienta, vyšší ceny léčiv a podání pouze erudovaným pracovníkem.

Polymery používané v BDDS můžeme rozdělit na: ⁶

- *Hydrofilní polymery* - ve vodě rozpustné polymery, které při kontaktu s vodou bobtnají, eventuelně podléhají úplné disoluci. Systémy obalené těmito polymery vykazují v suchém stavu vysokou adhezivitu k mukóze. Ta prudce klesá se vzrůstajícím stupněm disoluce. Z tohoto důvodu jsou tyto polymery vhodnými nosiči léčiv pro podání do dutiny nosní, bukalní, vaginální a na sliznici oka. (kys. polyakrylová, polymethakryláty, deriváty celulózy).
- *Hydrogely* – zesíťované polymery, které bobtnají při kontaktu s vodou, míra bobtnání závisí na stupni zesíťování. Ve své molekule obsahují karboxylovou skupinu, která umožňuje tvorbu vodíkové vazby (karbomera, polykarbophil).
- *Termoplastické polymery* – hydrofóbní polymery. (SferomeryTM – nově patentované polymery stálé v kyselém prostředí, jsou proto ideální pro podání do žaludku a tenkého střeva).

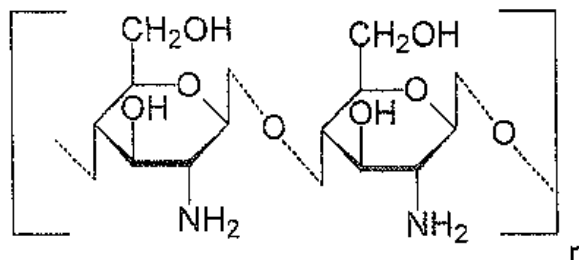
Polymery s vhodnými bioadhezivními vlastnostmi musí splňovat tyto podmínky:

- přítomnost karboxylové nebo hydroxylové funkční skupiny nutné pro tvorbu sekundárních chemických vazeb (vodíkové vazby),
- vysoká molekulová hmotnost a flexibilita řetězce,
- záporný povrchový náboj,
- dostatečné povrchové napětí pro rozptýlení polymeru na mukózu,
- povrchová struktura s vysokou afinitou pro vazbu mezi polymerem a mucinem.

4.2.1. CHITOSAN A JEHO DERIVÁTY

Mnoho studií dokazuje, že chitosan a jeho deriváty (N-trimethylchitosan, mono-N-karboxymethylchitosan) jsou velmi účinné a bezpečné látky, zlepšující absorpci mukózně (nasálně, perorálně) podaných hydrofilních makromolekul jako jsou peptidy, proteiny nebo heparin.

Chitosan [$\alpha(1\rightarrow4)$ 2-amino 2-deoxy β -D glukán] je mukopolysacharid svou strukturou blízký celulóze. Získává se deacetylací chitinu. Jeho chemické vlastnosti závisí na molekulové hmotnosti, stupni deacetylace a



viskozitě. Chitosan je kladně nabitý, rozpustný ve slabě kyselém prostředí. Po orálním podání může být rozložen enzymy chitinázami, které jsou produkovány střevními mikroorganismy nebo lysozomy.⁷ Studie Schipperera⁸ ukazují, že chitosan o vyšší i nižší molekulové hmotnosti s nízkým stupněm deacetylace působí jako absorpční enhancer a vykazuje toxicitu závislou na dávce. Naopak chitosan s vyšším stupněm deacetylace a vyšší molekulovou hmotností je aktivní enhancer a je velmi málo toxický. Z toho vyplývá, že potenciální toxicita chitosanu závisí na struktuře polymeru, ale ne vždy se vztahuje k jeho absorpci zvyšujícímu efektu.

Je vhodným nosičem léčiv pro nasální, orální, parenterální a transdermalní podání i pro aplikaci na sliznici oka.

Chitosan vykazuje velmi dobré mukoadhezivní vlastnosti. Interakce pozitivně nabitě aminoskupiny na druhém uhlíku s negativně nabitým buněčným povrchem umožní přechodné, reversibilní otevření tight junction mezi epiteliálními buňkami, a tím paracelulární transport velkých hydrofilních sloučenin.⁹

Chitosan už byl použit pro zlepšení nasální absorpce kalcitoninu a inzulinu u ovce a krysy, morphin-6-glukuronidu a goserelinu u ovce a zlepšení intestinální absorpce buserelinu u krysy.

Částicové nosiče léčiv aplikované na mukózu chrání léčivo před jeho degradací v GIT, zlepšují jeho absorpci a současně způsobují jeho prolongované uvolňování.¹⁰ Kromě přípravy mikročástic je chitosan využíván pro inkorporaci do liposomů nebo alginátových gelových kuliček. (Např. chitosanové mikročástice pro podání prednisolonu do tlustého střeva byly připraveny precipitační/koacervační technikou

užitím síranu sodného jako srážedla. Mikročástice byly zesíťeny z důvodu zvýšení stability v kyselém prostředí. Jako potenciální kandidáti pro podání léčiv do plic se jeví nezesíťené nebo glutaraldehydem zesíťené chitosanové mikročástice). Bezpečnými a účinnými absorpčními enhancery jsou i deriváty chitosanu. Pozitivně nabitý (N-trimethylchitosan) chlorid zlepšuje podání a absorpci hydrofilních makromolekul s kladným nábojem nebo látek neutrálních, naopak mono-N-karboxymethylchitosan je vhodným nosičem pro intestinální absorpci léčiv záporně nabitých (nízkomolekulární hepariny).

Chitosan je též důležitou složkou pro podání vakcín. Chitosanové nanočástice byly vyrobeny precipitací/koacervací pomocí tri(poly)fosfátu. Do takto připravených částic byly inkorporovány BSA (hovězí sérový albumin) nebo antigen tetanu.¹¹ Spojení očkovací látky s těmito částicemi vykazuje zvýšenou absorpci antigenu lymfatickou tkání, a tím indukci silných systémových i mukózních reakcí proti antigenu. Tento specifický účinek chitosanu je dán stupněm deacetylace a typem použité lékové formy. Částicové injekční systémy jsou absorbovány M-buňkami a následně biodegradovány. Pro svoji nízkou výrobní cenu, biodegradabilitu, biokompatibilitu a nízkou toxicitu obliba chitosanu v současnosti vzrůstá.

4.2.2. DERIVÁTY CELULOSY A JINÉ HYDROFILNÍ POLYMERY

- karboxymethylcelulosa (CMC) a sodná sůl karboxymethylcelulosa
- hydroxyethylcelulosa (HEC)
- hydroxypropylcelulosa (HPC)
- methylhydroxyethylcelulosa (MHEC)
- hydroxypropylmethylcelulosa (HPMC)
- xanthanová guma - polysacharid, sekundární metabolit získaný biotechnologickou fermentací mikroorganismem *Xanthomonas campestris* v aerobních podmínkách; pro svoji vysokou schopnost bobtnat je významným bioadhezivem
- polyvinylalkohol (PVA)

Četnými studii bylo zjištěno, že tento typ polymerů je vhodným nosičem léčiv ve formě prášku aplikovaného do dutiny nosní. Vědci Peppas a Buri¹² popsali ve své studii mechanismus adheze ve vodě rozpustného polymeru aplikovaného v práškové formě jako počáteční absorpci vody z mucinu polymerem s jeho následnou přeměnu na gel, který adhezuje k mukóze. Další neustálou absorpcí vody dochází k rozpouštění gelu, a tím k rozprostření po mukóze.

Doba setrvání polymeru v místě aplikace může být kontrolována smísením dvou nebo více polymerů s rozdílnou mukoadhezí. (Např. mukoadheze polymerů v in vitro a in vivo studiích¹³ klesá v pořadí xanthanová guma (XC) › tamarindová guma (TG) › HPC › PVA. Tyto in vitro studie mohou být používány pro přesnější odhad doby setrvání práškových lékových forem neutrálních polymerů při nasální mukoadhezi).

4.2.3. LAKTOYL / KAPROLAKTONOVÉ KOPOLYMERY

Jedná se o nová, biokompatibilní tkáňová adheziva, u nichž v průběhu aplikace in vivo nedochází k žádným chemickým ani biochemickým interakcím. Účinek těchto látek je založen pouze na jejich reologických vlastnostech závislých na teplotě.

Přestože alkylové kyanoakryláty jsou silnějšími bioadhezivy, většina z nich se nesmí používat v praxi pro nebezpečí orgánového poškození, které je dáno toxicitou jejich monomerů.¹⁴ Proto se vědci zaměřili ve svých pracích na vývoj biokompatibilních a biodegradabilních netoxických adheziv, která nezpůsobují chemické reakce. Jde konkrétně o kopolymery s nízkou molekulovou hmotností, které jsou při teplotě aplikace (T_a) málo viskózní, zatímco při teplotě lidského těla (T_t) jejich viskozita vzrůstá. Nízká viskozita a vyšší tekutost při T_a usnadňuje aplikaci kopolymeru, zvyšuje jeho přizpůsobivost a lepší připojení ke tkáni. Naopak při T_t dochází k prudkému vzestupu viskozity oligomerů, což je hlavní příčinou adhezivních vlastností těchto materiálů. (Teplota adheziv při aplikaci nesmí být vyšší než 60°C, aby se předešlo tepelnému poškození tkáně).

Struktura kopolymerů je tvořena centrální molekulou (nejčastěji trimethylolpropan, který dává vznik rozvětveným molekulám, nebo ethylenglykol, ten vede k vytvoření lineárních polymerů), k níž je navázán biodegradabilní řetězec, nejčastěji laktoyl nebo kaprolakton. Změnou složení a molekulové hmotnosti různých složek těchto

kopolymerových systémů byly získány materiály s vhodnými reologickými vlastnostmi, a tím vyšší adhezivitou.

Vědecké práce se zaměřily na studium vztahů mezi teplotou, reologickými vlastnostmi a molekulovou hmotností. Vysokomolekulární polymery sice vykazují velikou kohezivní sílu, ale zároveň i příliš vysokou teplotu skelného přechodu (T_g) - jsou tak velmi tuhé - a současně i nepříjemně vysokou viskozitu až při klinicky netolerované teplotě. Nízkomolekulární polymery mají nižší krystalinitu, prudký pokles viskozity nastává při teplotě lehce nad jejich T_g .

Viskozita i adhezivní vlastnosti polymerů v teplotním rozmezí mezi T_a a T_t byly modifikovány včleněním laktidových nebo kaprolaktonových bloků. Tyto jednotky umožňují zvýšit segmentální pohyblivost polyesterových řetězců, kompenzovat tuhoucí efekt laktidových bloků a upravit hodnotu T_g . Jejich včleněním do molekuly polymeru dochází k prodloužení délky polyesterových bloků, a tím ke zvýšení jejich kohezivní síly a zároveň k udržení T_g hodnoty v klinicky vhodném teplotním intervalu. Vzhledem k tomu, že kaprolakton má i negativní vliv na adhezivní vlastnosti oligomerů, byl jeho obsah optimalizován tak, že byla zaručena jednak dostatečně vysoká adhezivita a současně i výhodné reologické vlastnosti.

4.2.4. DERIVÁTY POLYAKRYLOVÉ KYSELINY

– Karbomera

Jedná se o syntetický, větvený polymer kyseliny akrylové zesíťovaný pomocí alylsacharózy. Je rozpustná ve vodě, patří mezi aniontové polymery. Karboxylové skupiny hlavního řetězce, který je tvořen monomery kyseliny akrylové, jsou odpovědné za silnou bioadhezi.

– Polykarbophil

Je to málo větvený derivát kyseliny polyakrylové zesíťovaný pomocí divinylglykolu, vykazující vysokou a dlouhotrvající adhezivitu. Pojme vodu v množství odpovídajícím 60 – 100 násobku své hmotnosti

– *Poly(alkylkyanoakrylát)*³⁸

I přes svoji relativně vysokou vazebnou sílu je jeho klinické použití značně omezeno kvůli toxicitě monomerů. Většina alkylkyanoakrylátů je pro vnitřní použití zakázána, protože mohou způsobit funkční poškození tkáně. Jejich použití je tak limitováno pouze na topické kožní použití. Polymerizace alkylkyanoakrylátů je exotermický děj, který může způsobit tepelné poškození tkáně, zvláště jestliže je jeho vrstva v místě aplikace příliš silná.

– *Poly(methakrylát)*

Sodné a draselné soli metakrylátových kopolymerů byly připraveny s cílem vyvinout nové, málo bobtnající mukoadhezivní materiály, vhodné pro aplikaci do dutiny ústní.

Přestože mají polyakrylové kyseliny výborné mukoadhezivní vlastnosti hlavně díky schopnosti tvořit vodíkové vazby s funkčními skupinami hlenu,¹⁵ bobtnají po hydrataci s obtížemi, a dávají tak vzniknout vysoce viskózním roztokům, které mohou snižovat účinnost terapie, pokud jsou užívány jako složky pevných lékových forem aplikovaných bukalně. Proto je cílem vytvořit nové, málo bobtnající mukoadhezivní materiály, obsahující karboxylové skupiny.

Ve studiích byly zkoumány hlavně Eudragit® L100 a S100. Soli byly získány sprejovým sušením vodných roztoků polymerů, neutralizovaných NaOH nebo KOH. Takto připravená bioadheziva byla zkoušena ve formě tablet nebo náplastí.

– Eudagrit® S100 - poly(metakrylová kyselina a methyl metakrylát) v poměru 1:2

– Eudragit® L100 - poly(metakrylová kyselina a methyl metakrylát) v poměru 1:1

Bioadhezivní síla byla stanovena na základě měření síly odtržení polymeru od mucinu.

Velmi intenzivně zkoumanou oblastí aplikace léčiv do GIT je v současnosti i technologie výroby mikročástic. Hlavní výhodou těchto materiálů je možnost vytvořit přesný tvar a velikost částice, konkrétní povrchové struktury nosiče a požadovanou velikost rezervoáru pro léčivo. Na míru vytvořený tvar a velmi malé částice umožní intenzivnější kontakt s intestinální stěnou, zatímco větší částice zabraňují endocytóze jiných látek. Rezervoár nosiče může být plněn jednou látkou nebo i směsí různých léčiv. Ve studii byly použity mikrotechnologicky připravené polymethakryláty, k jejichž povrchu byly připojeny lektiny pro specifický targeting.

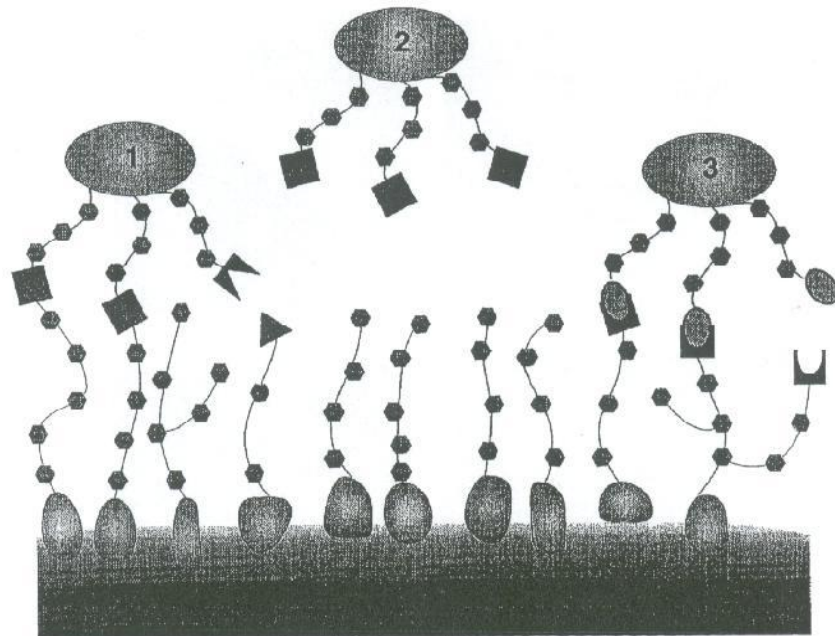
Tab. 1.: Některá, v současné době dostupná bioadhezivní léčiva¹⁶

Produkt	Výrobce	Bioadhezivní polymer	Léková forma
Buccastem [®]	Reckitt Benckiser	PVP, XG,	Bukkální tableta
Corlan pellets [®]	Celltech	Akáciová guma	Oromukozální tableta
Suscard [®]	Forest	HPMC	Bukkální tableta
Gaviscon Liquid [®]	Reckitt Benckiser	Alginát sodný	Perorální roztok
Orabase [®]	ConvaTech	Pektin, želatina	Orální pasta
Corsodyl gel [®]	GlaxoSmithKline	HPMC	Orální gel
Nyogel [®]	Novartis	Karbomera, PVA	Oční gel
Pilogel [®]	Alcon	Karbomera	Oční gel
Timoptol-LA [®]	Merk, Sharpe and Dohme	Gellan guma	Oční gel
Aci-Jel [®]	Janssen-Cilag	Akacia, tragakant	Vaginální gel
Crinone [®]	Serono	Karbomera	Vaginální gel
Gynol-II [®]	Janssen-Cilag	Sodná sůl CMC, PVP	Vaginální gel
Zidoval [®]	3M	Karbomera	Vaginální gel

4.3. CYTOADHEZE

Jak ukazuje příroda, mikroorganismy (např. bakterie) jsou schopné adherovat k buněčným povrchům při velmi nepříznivých podmínkách (např. v GIT) nejenom efektivně, ale také velmi specificky. Tato buněčně specifická bioadheze je jednou z hlavních podmínek patogenity mnoha bakterií, protože průnik do těla hostitele nebo do cílové buňky vyžaduje primárně kontakt.¹⁷ Zkoumáním využití a vlastností této vysoce specifické cytoadheze vznikají nové možnosti pro cílené podání léčiva, které překonávají i limitace a obtížnosti dříve pouze používané mukoadheze (nespecifičnost, rychlá obměna hlenu, obalení lékové formy hlenem,...)

V kontrastu k fyzikálním adhezivním procesům (vodíkové vazby a povrchové interakce) vyskytujícím se při mukoadhezi, adheze bakterií k buněčným povrchům zahrnuje vysoce specifické, receptory zprostředkované interakce. Bakteriální adhezivní faktory jsou nazývány *adheziny*.^{5,17} Jedná se o glykoproteiny, které rozpoznávají komplementární strukturu na hostitelském buněčném povrchu – *receptory* (specifické cukerné struktury na cílových buňkách, např. glykokalyx mukózních buněk v GIT) a tvoří s nimi specifickou vazbu.



Obr. 3: Mechanismus bakteriální adheze k mukóze hostitele prostřednictvím specifických receptory zprostředkovaných interakcí: Adheze může být zprostředkována vazbou bakteriálních lektinů (adhezínů) k hostitelovým cukerným zbytkům (1) nebo

vazbou endogenních hostitelských lektinů k bakteriálním ligandům (3). Bakterie bez vhodného lektinu nebo cukerných jednotek nejsou schopny adherovat.(2) ⁵

Adheziny mohou být spojeny s rozsáhlými polymerními strukturami pomocí vláknitých přívěšků, nazývaných *fimbrie*.

Aby mohly být bioadhezivní struktury užity pro BDDS, musí :

- být netoxické a neimunogenní
- být stabilní v podmínkách GIT
- se vázat specificky k povrchovým strukturám epitelu, ne k hlenu.

Bakteriální adheze se vysvětluje fyzikálně-chemickými modely prostřednictvím Van der Waalsových sil, Hamakrovy konstanty, volné povrchové energie a DLVO teorie.¹⁸

4.3.1. LEKTINY

Lektiny jsou definovány jako (glyko)proteiny neimunního původu (vyloučeny jsou tak protilátky), které se specificky váží na polysacharidy nebo glykokonjugáty.⁵ Jsou schopné specificky rozpoznat a následně se reversibilně vázat k cukerným složkám glykokonjugátů (N-acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin, galaktosa, fruktosa a kyselina sialová) beze změny kovalentní struktury některého z rozpoznávaných glykosylových ligandů. Proto jsou lektiny atraktivními nosiči pro orální podání léčiv.

Pojem lektin, latinsky *legere*, původně popisoval rostlinné extrakty, schopné shlukovat erythrocyty. Lektiny byly objeveny v 19. stol. při studiu aglutinace lidských a zvířecích erythrocytů vlivem určitých rostlinných extraktů. Vyskytují se hlavně mezi rostlinami čeledi *Fabaceae* (hrách, fazol), ale také v čeledi *Solanaceae* (rajče), *Poaceae* (pšenice) nebo *Loranthaceae* (jmelí).¹⁹ Interakce mezi lektiny a sacharidy jsou podstatou mnoha buněčných jevů jak je růst, diferenciací, migrace, rozpoznávání a přilnavost k jiným buňkám.

Známé lektiny jsou proteiny nebo glykoproteiny lišící se velikostí molekuly (asi 9 – 150 kDa), strukturou a charakterem cukerné složky. Podle cukerné složky se rozdělují na :

- *Merolektiny* - mají pouze jednu cukry rozpoznávající doménu (CRD).
- *Hololektiny* - mají dvě nebo více CRD, mohou vázat více než jednu sacharidovou strukturu na buněčném povrchu. Výsledkem je vyšší vazebná síla.
- *Chimerolektiny* - mají další jiné vazebné domény.

Většina známých lektinů je rostlinného původu, ale jsou známy i lektiny produkované vyššími živočichy, dokonce i člověkem. Tyto tzv. endogenní nebo reverzní lektiny hrají důležitou roli při interakcích mezi bakteriemi nebo viry a hostitelským organismem.

Ve studiích *ex vivo* bylo zjištěno, že zatímco k izolovaným sacharidovým ligandům se mnoho lektinů váže pouze slabou silou, vazebná síla k buněčnému povrchu pokrytému těmito ligandy může být mnohem silnější. Tento jev se vysvětluje dvoustupňovým mechanismem, kde se lektin nejdříve váže k sacharidu, poté následuje vazba k proteinům.

Některé lektiny se vážou jen na povrch epitelových buněk, zatímco jiné v návaznosti na tuto primární bioadhezi mohou dát buňce podnět absorbovat vázané ligandy endocytotickými procesy do její cytoplazmy (bioinvaze). Tento mechanismus může být využit pro formulaci nových bioinvazivních nosičů léčiv.³⁸

4.3.1.1. ROSTLINNÉ LEKTINY

Rostlinné lektiny by se mohly jevit jako velmi atraktivní nosiče pro perorální podání léčiv díky jejich specifické vazbě k intestinálním mukózním buňkám a jejich obecně dobré rezistenci k trávení v GIT. Bohužel některé rostlinné lektiny vykazují akutní toxicitu nebo jiné nežádoucí biologické účinky.

Prvním, dobře prostudovaným, ale toxickým lektinem je *lektin fazolu obecného* – *lektin PHA (Phaseolus vulgaris hemagglutinin)*. Po podání člověku nebo zvířatům v syrovém stavu působí enteritidu a průjem.²⁰ Ve studiích byla pozorována vazba a narušení lumenálního povrchu tenkého střeva lektinem.^{21,22} Morfologické a metabolické změny indukované vazbou lektinu PHA a ostatních rostlinných lektinů byly demonstrovány v pokusech *in vitro* užitím Caco-2 buněk.²³ V kontrastu k jeho celkové toxicitě pro živočichy je lektin PHA intestinálním růstovým faktorem indukujícím střevní hyperplazii, zvýšení proteinové syntézy a zpětné vychytávání polyaminů v intestinálních epitelálních buňkách. Pro toto komplexní spektrum biologických účinků byly lektiny podobné PHA pojmenovány jako zevní (cizí) metabolické signální molekuly.²⁴ Pozoruhodná je relativně vysoká orální biodostupnost lektinu PHA po perorálním podání potkanovi. Pro vysokou toxicitu PHA lektinu ale zájem o něj postupně opadá.

Dalším studovaným lektinem byl *rajčatový lektin (TL)*, získaný z *Lycopersicon esculentum*. Představuje nadějnou látku, zejména pro svoji malou toxicitu. Tento

glykoprotein (~ 70 kDa) byl Kilpatrickem označen za rezistentní k trávení a schopný vázat se k intestinálním klkům potkana bez škodlivých účinků.

Vědci Naisbeth a Woodley²⁵ byli zřejmě prvními, kdo studoval aplikaci TL jako bioadheziva. Navazujícími studii bylo zjištěno, že TL má schopnost specificky se vázat na izolované prasečí enterocyty i jednovrstvé humánní Caco-2 buněčné kultury. Byl vytvořen model targetingového systému, tvořeného 1 μ m polystyrenovými kuličkami kovalentně spojenými s proteinem (lektinem). V pokusech in vitro se tyto částice specificky vázaly k enterocytům, ale v přítomnosti prasečího žaludečního hlenu byla tato vazba znemožněna, což je hlavní nevýhoda TL.²⁶ Pravděpodobně byla bioadheze mikrosfér obalených lektinem inhibována rozpustným hlenem nebo odloučenými hlenovými částmi přítomnými v lumen střeva. Tato zkřížená reaktivita značně omezuje aplikaci TL jako bioadheziva v GIT.

Byly proto hledány bioadhezivní excipienty vážící se specificky k enterocytům bez zkřížené reakce s hlenem nebo ostatním obsahem v GIT a bez vedlejších toxických účinků. Přestože tento posledně zmíněný požadavek vylučuje mnoho známých lektinů, přesto zůstávají zajímavé z hlediska studia vazebných interakcí.

Vědci Gabor a Wirthova realizovali další studie zabývající se screeningem interakcí lektin-buňka a testováním specifčnosti a vazebné kapacity několika lektinů rostlinného původu na intestinálních rakovinných buněčných liniích.²⁷ Zaměřili se zvláště na tři proteiny: *pšeničný klíčkový aglutinin (WGA)*, *Solanum tuberosum lektin (STL)* a *Ulex europaeus isoagglutinin (I UEA)*. Experimenty s intestinálními buněčnými kulturami Caco-2 ukázaly, že absorpce různých lektinů se liší v závislosti na teplotě. Jde tedy o energeticky závislý proces.

4.3.1.2. REVERSNÍ (ENDOGENNÍ) LEKTINY

Práce Izahra²⁸ a Askenazyho²⁹ dokazují, že některé bakterie, jako např. *Shigella*, adherují prostřednictvím sacharid (fucosa, glukosa, manosa) senzitivních interakcí, přičemž adhezín je produkován ne bakteriálními buňkami, ale samotnými intestinálními buňkami. Jedná se tedy o tzv. endogenní (obrácené) lektiny.

Poly-N-2-hydroxypropyl methacrylamid (PHPMAm) je ve vodě rozpustný, bioadhezivní polymerní nosič pro cílené podání léčiva do tlustého střeva. Je známo, že mnoho rozpoznávacích systémů pro terminální cukry sacharidových řetězců glykoproteinů se běžně vyskytuje v živých organismech. PHPMAm s postranním řetězcem zakončeným

cukernou jednotkou byl syntetizován se záměrem využít tento přirozený rozpoznávací systém pro podání léčiv do buněk se specifitou pro tuto cukernou složku.

Bridges a kolektiv³⁰ ve své studii *in vitro* popisují, že N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid kopolymery (HPMA-kopolymery) s postranním řetězcem zakončeným cukerným zbytkem mají vyšší afinitu k tenkému střevu krysy oproti kontrolním neutrálním HPMA-kopolymerům bez cukerného zbytku. Míra této tkáňové asociace vzrůstá v pořadí galaktosa > manosa > fucosa, přičemž kationické deriváty obsahující NH_4^+ vykazují daleko silnější spojení s tkání, pravděpodobně v důsledku nespecifických elektrostatických interakcí. Stále je však nejasné, zda tyto polymery adherovaly přímo na tkáňový povrch nebo prostřednictvím hlenové gelové vrstvy.

4.3.2. BAKTERIÁLNÍ ADHEZINY

Bakterie mají schopnost adherovat na epiteliální povrch GIT s pomocí fimbrií - dlouhých, lektinu podobných proteinů, umístěných na povrchu mnoha bakteriálních kmenů. Přítomnost fimbrií podmiňuje bakteriální patogenitu. Navíc většina bakterií vykazuje velký počet adhesinů.

Např. u *E.coli* je adheze (a tím vytvoření těsného kontaktu) ke kartáčovému lemu epiteliálních buněk pomocí K99-fimbrií nezbytná pro následnou produkci a uptake enterotoxinu této bakterie.

Např. invazin, membránový protein z *Yersinia pseudotuberculosis*, byl použit do polymerních nanosfér pro vytvoření zajímavého cíleného systému léčiv. Je schopen absorpce do buněk a vizualizace konfokálním laserovým scanningovým mikroskopem.³¹

4.3.3. VIROVÉ ADHEZIVNÍ FAKTORY

V porovnání s bakteriálními systémy se znalosti o virových receptorech na molekulární úrovni neustále zvětšují. Souhrnná krystalová struktura chřipkového viru s jeho receptorem, kyselinou sialovou, už byla popsána. Rhinovirus, původce nachlazení, se váže k buněčné adhezivní molekule ICAM-1 na povrchu eukaryotních buněk, a tím

snižuje schopnost leukocytů eliminovat virové infikované buňky. Novou strategií inhibice těchto virových vazeb, a tím prevence infekce pomocí léčiva spíše než klasickými vakcínami, je příprava rozpustných receptorových analogů.³² Např. Rubas a kol. obalili lipozomy reovirus- σ 1 buněčným vazebným proteinem, pro něž jsou vazebným místem M-buňky.

4.3.4. SELEKTINY

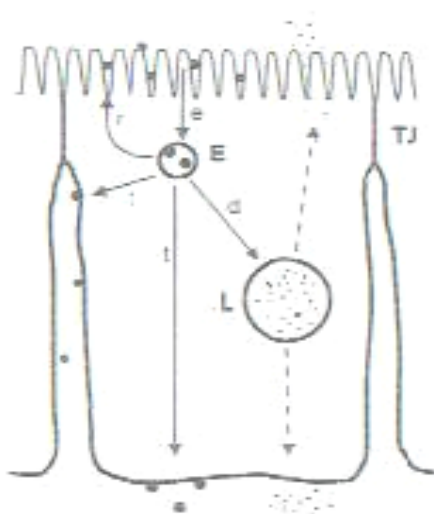
Jedná se nový způsob targetingu leukocytů do místa zánětu v endoteliálních buňkách. Tyto buňky zahrnují skupinu lektinům podobných membránových proteinů, nazývanou *selektiny*. Selektiny jsou velmi specifické pro určité oligosacharidové sekvence spojené s antigenem, známým jako sialyl lewis X. Jedná se o pentasacharid, který je částí delšího sacharidového řetězce glykoproteinů, podobných mucinu. Ukazuje se, že v budoucnu by mohly selektiny sloužit např. pro cílené podání parenterálně podaných léčivých přípravků do zanícené cévní tkáně.

4.4. SPECIFICKÁ ENDO- A TRANSCYTÓZA jako nová perspektiva vývoje makromolekulárních nosičů léčiv

Specifická vazba k epitelálním buňkám není nezbytně omezena jen na prostou fixaci bioadhezivního ligandu na buněčný povrch, ale může následně docházet i ke včlenění tohoto ligandu do buňky. Dochází tedy k vezikulárním transportním procesům, označeným jako *endocytóza* a *transcytóza*.

Nespecifické interakce mezi epitelem a mukoadhezivním polymerem způsobují pouze dočasné uvolnění intercelulárních tight junctions, což je vhodné pro rychlou absorpci malých peptidových léčiv paracelulární cestou. Specifická endo- a transcytóza poskytuje selektivně zlepšený transport velkých bioaktivních molekul (polypeptidy, polysacharidy, polynukleotidy) přes těsně spojené klastry polarizovaných epitelálních nebo endoteliálních buněk. Bariérové funkce těchto tkání zůstávají pro ostatní roztoky látek intaktní.

Vchlípení buněčné membrány, jež umožňuje absorpci malých kapiček extracelulární kapaliny (tzv. kapalná fáze endocytózy nebo pinocytózy), je společné většině typům buněk. Většinou se tyto procesy vyskytují kontinuálně, nezávisle na spouštěcích signálech (vazba ligandu k buňce).³³ Množství extracelulárního média absorbovaného těmito procesy je samozřejmě velmi malé. Je dáno indexem endocytózy a pohybuje se v rozmezí od 0,4 do 2,1 $\mu\text{l}/10^6$ buněk pro různé typy buněk.³⁴



Obr.4 : Endo- a transcytóza v polarizovaných epitelálních buňkách oddělených pomocí tight junction³⁵

4.4.1. RECEPTOREM ZPROSTŘEDKOVANÁ ENDO/TRANSCYTÓZA

Koncept receptorem zprostředkované endocytózy, který byl formulován v roce 1974 vědci Goldsteinem a Brownem,³⁶ vysvětluje regulaci metabolismu cholesterolu na buněčné úrovni jako povrchový kontakt, včlenění do buňky a následnou intracelulární degradaci plazmového lipoproteinu o nízké denzitě (LDL). Jejich objev byl v roce 1985 oceněn Nobelovou cenou. V následujících letech byla receptorem zprostředkovaná endocytóza uznána za mechanismus, kterým živočišné buňky absorbují mnoho makromolekul.

Receptorem zprostředkované transportní procesy jsou dále rozlišovány podle osudu ligandu a receptoru po včlenění do buňky. Absorbovaná částice je buď hromaděna, degradována nebo recyklována zpět na buněčný povrch. (Obr.4)

Zatímco *endocytózou* je částice včleněna dovnitř buňky, *transcytózou* dochází v polarizovaných buňkách k transportu komplexu receptor-ligand na protější stranu buňky, kde je ligand, někdy i s receptorem nebo jeho částí, uvolněn do extracelulární tekutiny. Tento zvláštní případ receptorem zprostředkované transcytózy je velmi nadějný pro vývoj nových makromolekulárních nosičů léčiv, umožňujících transport neporušených, biologicky aktivních makromolekul přes tight junctions buněčné bariéry. Transcytóza se velmi hojně vyskytuje v živém organismu, jako např. intestinální absorpce imunoglobulinů přes epitel u nově narozených savců, GI absorpce vit.B₁₂, transcytóza nervového růstového faktoru, ricinu nebo receptorem zprostředkovaná transcytóza inzulínu, transferrinu a nově i virů.

Oproti již dříve zmíněným pokusům o nespecifické zvýšení permability epiteliální bariéry tento princip využívající specifickou, receptorem zprostředkovanou absorpci ovlivňuje pouze daný substrát (léčivo, nosič léčiva), zatímco epiteliální membrána zůstává intaktní. Ačkoliv je tento koncept endocytózy a transcytózy jako prostředek zlepšení absorpce biomolekul ještě v počátcích, jsou již známy pokusy o spojování makromolekul se speciálními transcytotickými nosiči s cílem zlepšit epiteliální nebo endoteliální transport farmakologicky aktivních peptidů. Např. vědci Russel-Jones a de Aizpuura připravili konjugát vitamínu B₁₂ a analogu LHRH. Po orální aplikaci LHRH myši došlo ke stimulaci ovulace ve vyvíjejících se folikulech, zatímco samostatně podané hormony toto nezpůsobily.

Přesto už teď jsou známy z in vivo studií některá omezení této metody:

- kompetice, kdy nosič léčiva může inhibovat transport esenciálních nutričních faktorů nebo naopak,
- receptorem zprostředkovaný transportní systém není přítomný v daném epitelu nebo endotelu,
- receptorem zprostředkovaný transportní systém pracuje spíše sekrečně než absorpčně.

4.4.2. ADSORPČNÍ ENDO/TRANSCYTÓZA

Oproti dříve zmíněnému vysoce specifickému receptorem zprostředkovanému transportnímu systému může být vazba a následná endocytóza extracelulárního ligandu lépe dosažena i při nižší úrovni specifity. Místo receptorových proteinů, navázaných na povrchu buňky, může být vazba k buněčnému povrchu zprostředkována elektrostatickými (nábojem zprostředkovanými) nebo cukr-specifickými (lektinem zprostředkovanými) interakcemi. Konstanta afinity těchto interakcí se pohybuje spíše v rozsahu 10^{-6} než 10^{-9} , ale počet těchto vazebných míst je asi 1000x vyšší, než těch pro vysoce afinitní receptory.³⁷ Znamená to tedy, že i při nižší specifické afinitě receptorů je vazba k velkému množství těchto receptorů velmi pevná. Tento jev se označuje jako avidita.

Tento typ transcytózy již byl použit pro zlepšení transportu látek. Makromolekuly byly spojovány s polykationty a celý pozitivně nabitý komplex byl absorbován do buňky na základě elektrostatické síly díky negativně nabitě buněčné membráně. (Např. pozitivně nabitě IgG vykazuje vysokou vazebnost k endotelu mozkových kapilár, což je podmíněno endocytózou a následnou transcytózou hematoencefalickou bariérou.)

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. POUŽITÉ SUROVINY

1P = Oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 1% pentaerythritolu (FaF UK HK)

3P = Oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 3% pentaerythritolu (FaF UK HK)

5P = Oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 5% pentaerythritolu (FaF UK HK)

1T = Oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 1% tripentaerythritolu (FaF UK HK)

3T = Oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 3% tripentaerythritolu (FaF UK HK)

5T = Oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 5% tripentaerythritolu (FaF UK HK)

PLGA = Oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové 50% : 50% (FaF UK HK)

Čištěná voda (FaF UK HK)

Hydroxid sodný (Jan Kulich)

Triethylcitrát (Merck)

Aceton (Jan Kulich)

5.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- Digitální váhy KERN 440-33, max. 200g, d = 0,01g
- Mikrovlnná komora, Le Cygne electronic, model LCE-2034M
- Materiálový zkušební stroj T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell
- Brookfieldův digitální viskozimetr model DV-E

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

Jedná se o univerzální stroj se širokým využitím. Umožňuje měřit tlakové, tahové a ohybové vlastnosti materiálu. Software Master test lze nastavit pro nejčastěji používané zkoušky nebo i pro komplexní testy.



Obr.5: Materiálový zkušební stroj³⁸

Šablona *Adheze 2 kN* byla nastavena servisním technikem pro měření adheze materiálu. V šabloně je většina parametrů předem definována. Některé parametry se během testu mění, a tak je možno zjišťovat změny adhezivní síly v závislosti na testovacích parametrech. Jedná se zejména o dobu kontaktu, kontaktní sílu a rychlost odtržení kontaktních ploch.

5.2.2. Brookfieldův digitální viskozimetr - model DV-E

Jde o rotační viskozimetr, jehož princip měření viskozity spočívá ve snímání kroutícího momentu, který je nutný pro rotaci vřetena ponořeného do vzorku tekutiny konstantní rychlostí. Kroutící moment je úměrný viskóznímu tahu ponořeného vřetena, a tím viskozitě kapaliny.

Jeho součástí je i adaptér pro malé objemy vzorků a vodní lázeň s cirkulací. Viskozimetr umožňuje nepřerušované měření vzorku i po dlouhou dobu, a tím analýzu

na čase závislých vlastností tekutiny. Lze ho použít pro měření newtonovské i neneutronovské kapaliny.



Obr. 6,7,8 : Brookfieldův digitální viskozimetr s příslušenstvím

5.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ

5.3.1. Plastifikované oligoestery

Jsou to polymery kyseliny D,L-mléčné a glykolové v poměru 1:1 (jednotlivé sekvence obou kyselin se náhodně střídají, vznikají látky s různými fyzikálními a chemickými vlastnostmi) s obsahem pentaerythritolu (1P, 3P, 5P) nebo tripentaerythritolu (1T, 3T, 5T), které jsou plastifikované triethylcitrátem z důvodu zlepšení adhezivních vlastností.

<i>Nosič</i>	7,0 g
<i>Triethylcitrát</i>	3,0 g

Do kádinky jsem navázila 7,0 g testovaného nosiče a zahřívala v mikrovlnné komoře do změknutí. Pak jsem přidala 3,0 g triethylcitrátu a obě látky důkladně zhomogenizovala. Takto připravený vzorek jsem označila. Stejným způsobem jsem připravila vzorek lineárního nosiče PLGA tvořeného ekvimolárním množstvím kyseliny mléčné a glykolové.

5.4. POSTUP MĚŘENÍ

5.4.1. Měření adheze

Po zapnutí přístroje jsem nejprve zkontrolovala fixní parametry, a poté jsem nastavila parametry proměnné. Odšroubovala jsem horní kontaktní plochu, očistila ji acetonem, rovnoměrně v tenké kompaktní vrstvičce na ni nanesla 0,2 g vzorku a našroubovala zpět. Nastavila jsem výchozí vzdálenost horní a dolní plochy (LE), vynulovala sílu a spustila zkoušku. Horní plocha se pohybovala směrem dolů, (pohyb z výchozí pozice LE 25 mm rychlostí 25 mm/min do okamžiku, kdy se přiblíží na zkušební vzdálenost čelistí 5 mm, po dosažení této vzdálenosti rychlostí 10 mm/min), až se plochy dostaly do kontaktu. Následovala doba kontaktu 60 s, zatížení 5 N a poté se horní čelist odtrhla rychlostí 100 mm/min. Snímač síly zaznamenal maximální sílu, nutnou pro odtržení obou ploch F_{max} . Po ukončení zkoušky jsem opět nastavila výchozí polohu obou ploch LE 25 mm. Po každé zkoušce jsem odšroubovala horní čelist, obě čelisti jsem očistila od zbytků vzorku acetonem a znovu nanesla zkoušený vzorek na horní čelist. Prováděla jsem vždy 10 měření pro stejný vzorek za daných podmínek.

5.4.2. Měření viskozity

Nejprve jsem pomocí termostatu vytemperovala vodní lázeň na teplotu 37°C. Poté jsem do viskozimetru našroubovala vřeteno č.14. Válec, který je součástí adaptéru pro malé objemy vzorků, jsem naplnila zkoušeným vzorkem, vložila ho do dvouplášťového obalu a 15 min. nechala temperovat. Na displeji jsem navolila velikost použitého vřetena a nastavila rychlost rotace - hodnotu RPM (počet otáček vřetena za minutu) na nejnižší hodnotu - konkrétně 0,3 a spustila motor. Vřeteno jsem nechala pětkrát otočit a poté jsem na displeji odečetla hodnotu dynamické viskozity v jednotkách mPa.s. Zvýšila jsem rychlost otáčení vřetena a postup opakovala. Hodnoty pod 10% krouťícího momentu jsem vynechala z důvodu dosažení přesnosti měření. Po proměření v celém rozsahu hodnot RPM jsem z válce odstranila vzorek, vyčistila válec i s vřetenem acetonem a naplnila dalším vzorkem.

Takto jsem proměřila všechny plastifikované nosiče. Do tabulky jsem zaznamenala hodnoty dynamické viskozity při daných rychlostech otáčení vřetene. Sestrojila jsem viskozitní křivky (závislost viskozity na RPM) a graficky porovnála viskozitu jednotlivých vzorků.

5.5. VYHODNOCENÍ

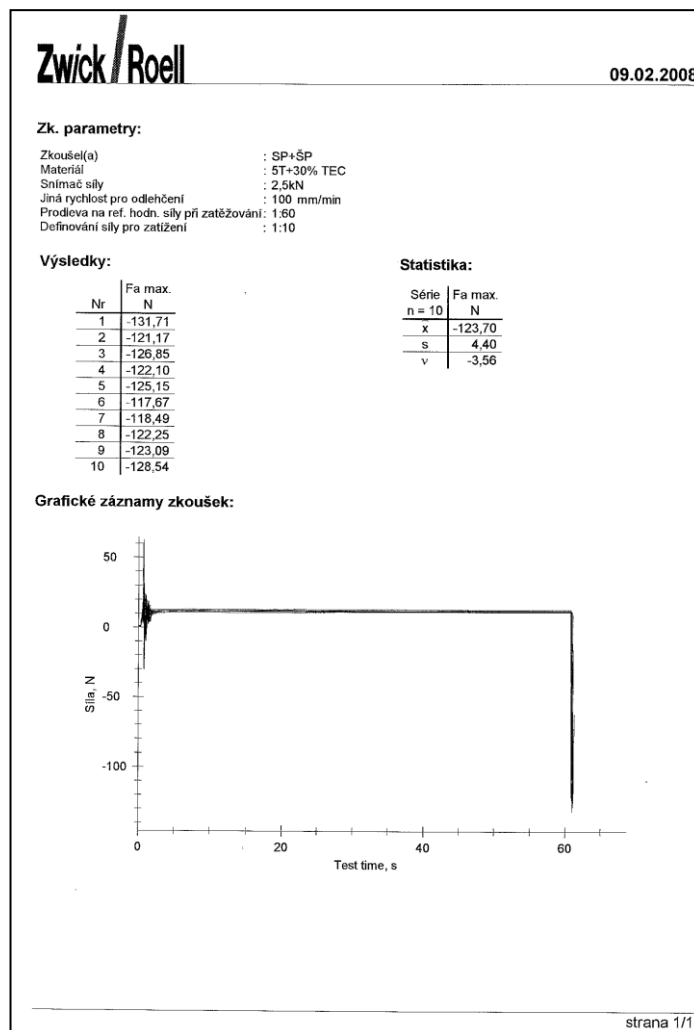
5.5.1. Měření adheze

Adhezivní vlastnosti jsou hodnoceny pomocí maximální síly F_{\max} , která je nutná pro odtržení adhezivního materiálu od podkladu.

Z každého měření počítač sestrojí graf závislosti síly F_{\max} na čase t . Série zkoušek zahrnuje 10 měření za stejných podmínek, z nichž je vypočítána průměrná hodnota \bar{F}_{\max} .

Pro porovnání výsledků měření s výsledky z diplomové práce jsem počítala hodnotu \bar{F}_{\max}/S (mN/mm^2). V testech provedených v rámci diplomové práce byla použita kruhová kontaktní plocha o průměru 28,04 mm, zatímco v testech provedených v rámci této rigorózní práce měla kontaktní plocha průměr 20,11 mm.

Obr. 9 : Příklad protokolu



5.5.2. Měření viskozity

Viskozita, která je definována jako míra vnitřního tření, je měřena pomocí kroutícího momentu. Ten je nepřímo úměrný viskozitě kapaliny.

Přístroj zaznamenával pro každou hodnotu RPM hodnotu kroutícího momentu v % a velikost dynamické viskozity v mPa.s.

Pro další zpracování jsem použila hodnoty dynamické viskozity při kroutícím momentu vyšším než 10%.

6. VÝSLEDKY

6.1. TABULKY

6.1.1. Měření adheze

Tab. 2: Adhezivita plastifikovaného nosiče *PLGA*

Měření č.	F_{\max} [N]	$\bar{\varnothing} F_{\max}$ [N]	s	\varnothing čelisti [mm]	$\bar{\varnothing} F_{\max} / S$ [mN/mm ²]
1	120,05	114,82	8,57	20,11	361,50
2	131,17				
3	124,69				
4	111,85				
5	112,72				
6	109,08				
7	118,61				
8	108,87				
9	104,61				
10	106,55				

Tab. 3 : Adhezivita plastifikovaného nosiče *IP*

Měření č.	F_{\max} [N]	$\bar{\varnothing} F_{\max}$ [N]	s	\varnothing čelisti [mm]	$\bar{\varnothing} F_{\max} / S$ [mN/mm ²]
1	73,01	73,48	0,88	20,11	231,34
2	72,44				
3	73,05				
4	73,25				
5	74,84				
6	74,71				
7	72,21				
8	73,59				
9	73,68				
10	74,05				

Tab. 4 : Adhezivita plastifikovaného nosiče **3P**

Měření č.	F_{\max} [N]	\bar{F}_{\max} [N]	s	\varnothing čelisti [mm]	\bar{F}_{\max} / S [mN/mm ²]
1	106,74	103,74	3,02	20,11	326,61
2	102,02				
3	107,75				
4	102,12				
5	106,74				
6	103,97				
7	100,50				
8	106,79				
9	100,86				
10	99,93				

Tab. 5 : Adhezivita plastifikovaného nosiče **5P**

Měření č.	F_{\max} [N]	\bar{F}_{\max} [N]	s	\varnothing čelisti [mm]	\bar{F}_{\max} / S [mN/mm ²]
1	80,86	82,19	1,49	20,11	258,76
2	81,01				
3	81,67				
4	79,60				
5	84,01				
6	81,73				
7	82,96				
8	83,65				
9	84,05				
10	82,37				

Tab. 6 : Adhezivita plastifikovaného nosiče **1T**

Měření č.	F_{\max} [N]	\bar{F}_{\max} [N]	s	\varnothing čelisti [mm]	\bar{F}_{\max} / S [mN/mm ²]
1	140,48	137,07	5,08	20,11	431,55
2	132,16				
3	144,73				
4	144,13				
5	133,10				
6	134,13				
7	132,10				
8	141,26				
9	136,07				
10	132,53				

Tab. 7 : Adhezivita plastifikovaného nosiče **3T**

Měření č.	F_{\max} [N]	\bar{F}_{\max} [N]	s	\varnothing čelisti [mm]	\bar{F}_{\max} / S [mN/mm ²]
1	136,15	135,58	2,73	20,11	426,86
2	134,89				
3	131,87				
4	136,87				
5	137,99				
6	133,06				
7	135,54				
8	135,95				
9	132,53				
10	140,98				

Tab. 8 : Adhezivita plastifikovaného nosiče **5T**

Měření č.	F_{\max} [N]	$\bar{\varnothing} F_{\max}$ [N]	s	\varnothing čelisti [mm]	$\bar{\varnothing} F_{\max} / S$ [mN/mm ²]
1	131,71	123,70	4,40	20,11	389,45
2	121,17				
3	126,85				
4	122,10				
5	125,15				
6	117,67				
7	118,49				
8	122,25				
9	123,09				
10	128,54				

6.1.2. Měření viskozity

Tab. 9: Dynamická viskozita plastifikovaných nosičů při teplotě 37°C měřená vřetenem
č.14

RPM	Dynamická viskozita [Pa.s]						
	1P	3P	5P	1T	3T	5T	PLGA
0,3	-	-	-	-	-	-	
0,6	-	-	-	560,0	377,0	-	
1	125,0	-	-	544,0	376,0	-	
1,5	123,3	110,2	-	537,5	373,3	160,8	125,8
2	123,1	110,0	-	535,6	370,6	161,3	125,6
2,5	123,0	110,0	-	-	369,0	161,5	126,0
3	122,5	110,0	41,7	-	367,9	160,8	126,3
4	120,9	109,8	41,5	-	-	160,3	126,1
5	119,8	109,3	41,3	-	-	160,5	126,0
6	118,8	109,2	41,3	-	-	161,0	125,8
10	114,3	108,5	41,3	-	-	-	125,0
12	-	-	41,0	-	-	-	
20	-	-	40,5	-	-	-	
30	-	-	40,2	-	-	-	
průměr	-	109,6	41,1	-	372,3	160,8	125,83

RPM.....počet otáček vřetena za minutu

1P, 3P, 5P.....nosiče větvené 1 %, 3 % nebo 5 % pentaerythritolu

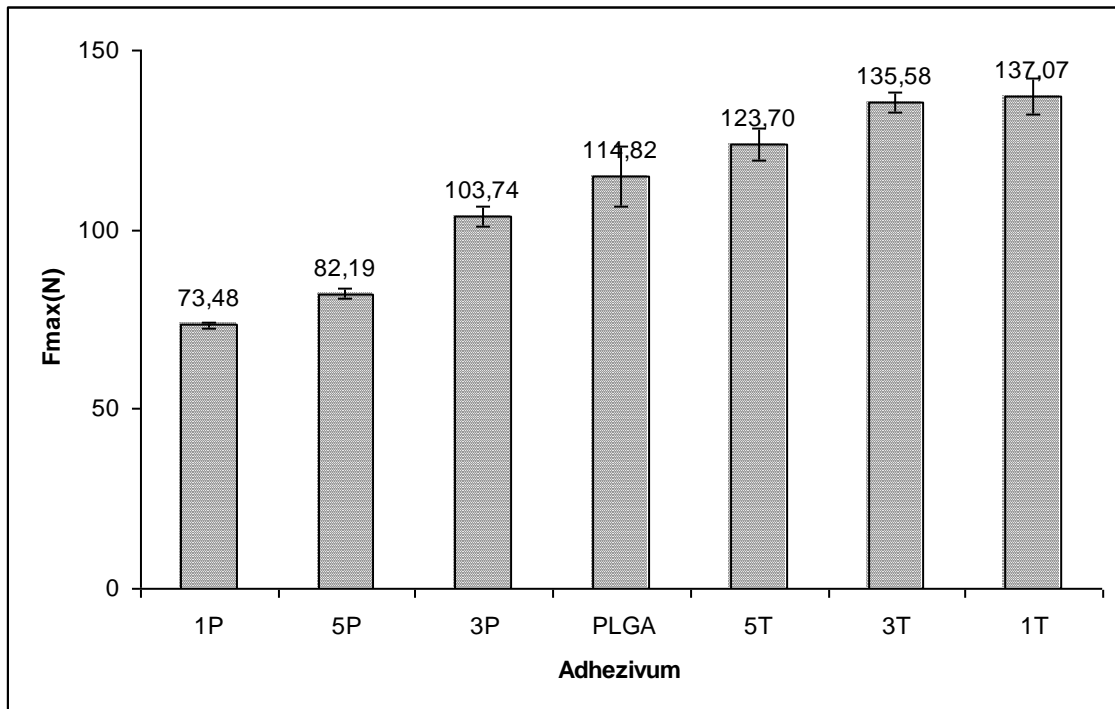
1T, 3T, 5T.....nosiče větvené 1 %, 3 % nebo 5 % tripentaerythritolu

PLGA.....lineární oligoester kyseliny mléčné a glykolové 50:50

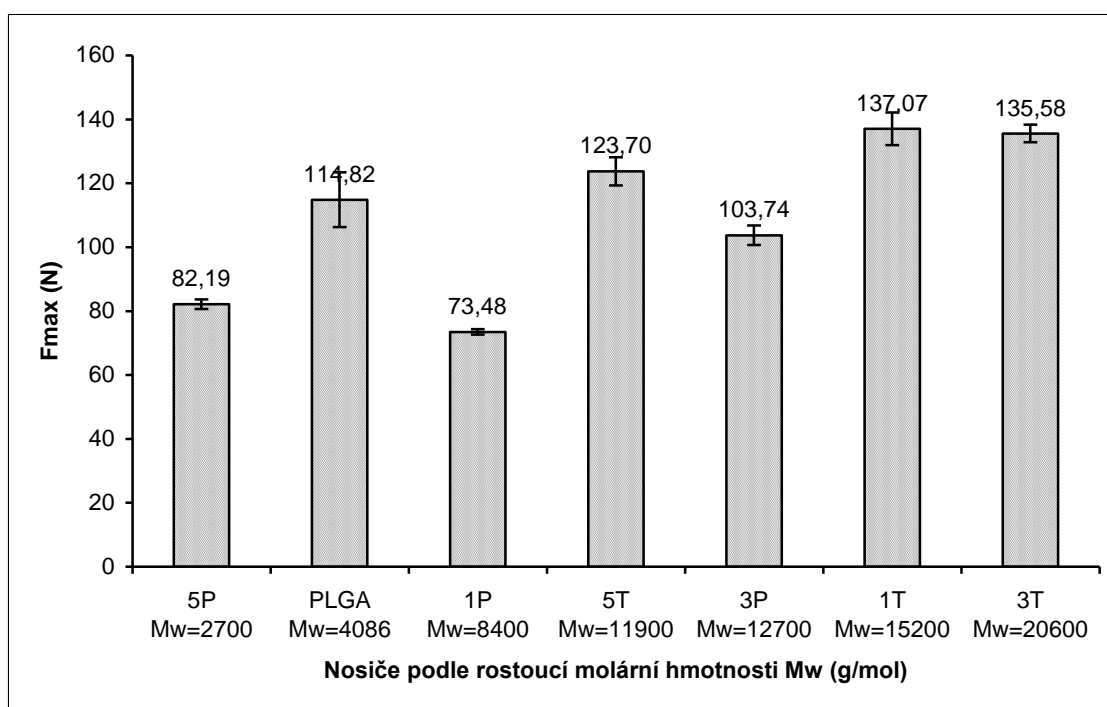
6.2. GRAFY

6.2.1. Měření adheze

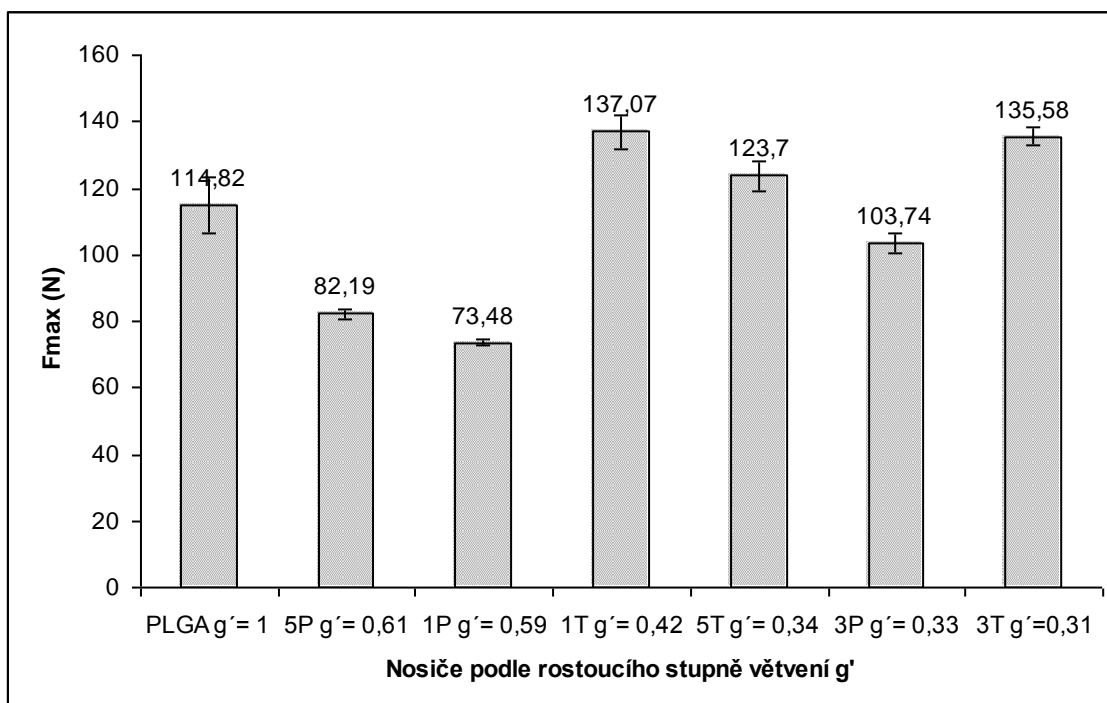
Obr.10: Porovnání adhezivní síly F_{max} testovaných nosičů plastifikovaných 30 % triethylcitrátu



Obr. 11: Vztah mezi molární hmotností M_w a adhezivní silou F_{max}

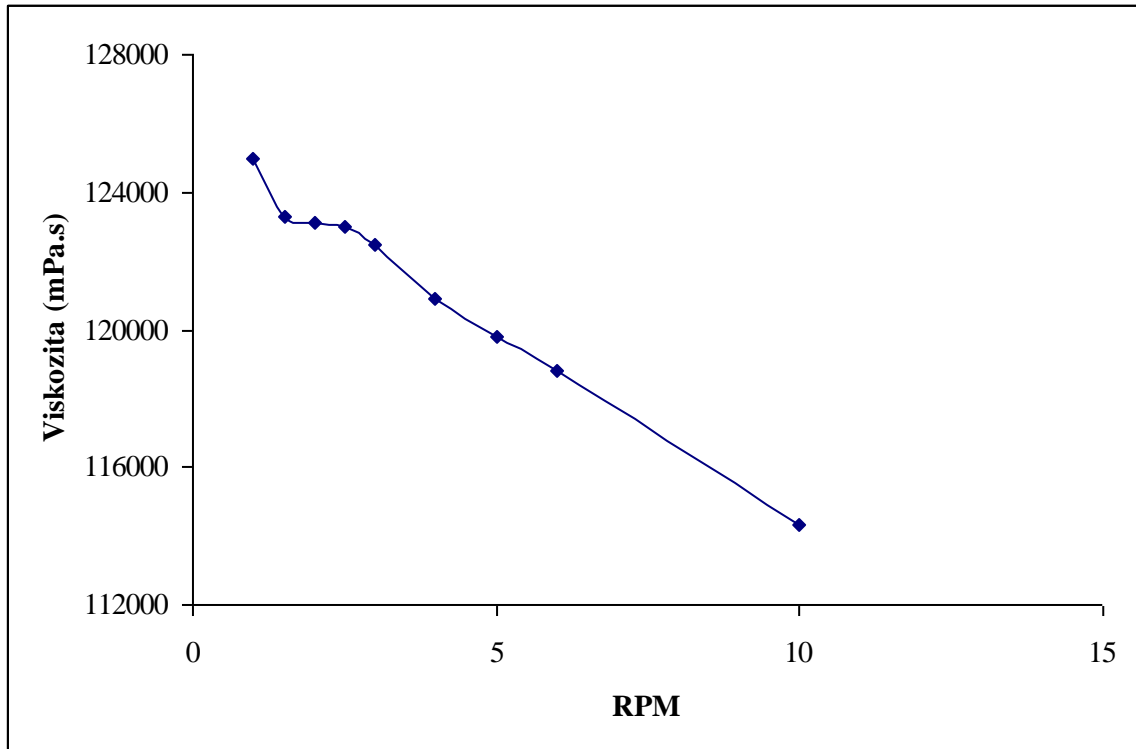


Obr. 12: Vztah mezi stupněm větvení a adhezivní silou F_{max}

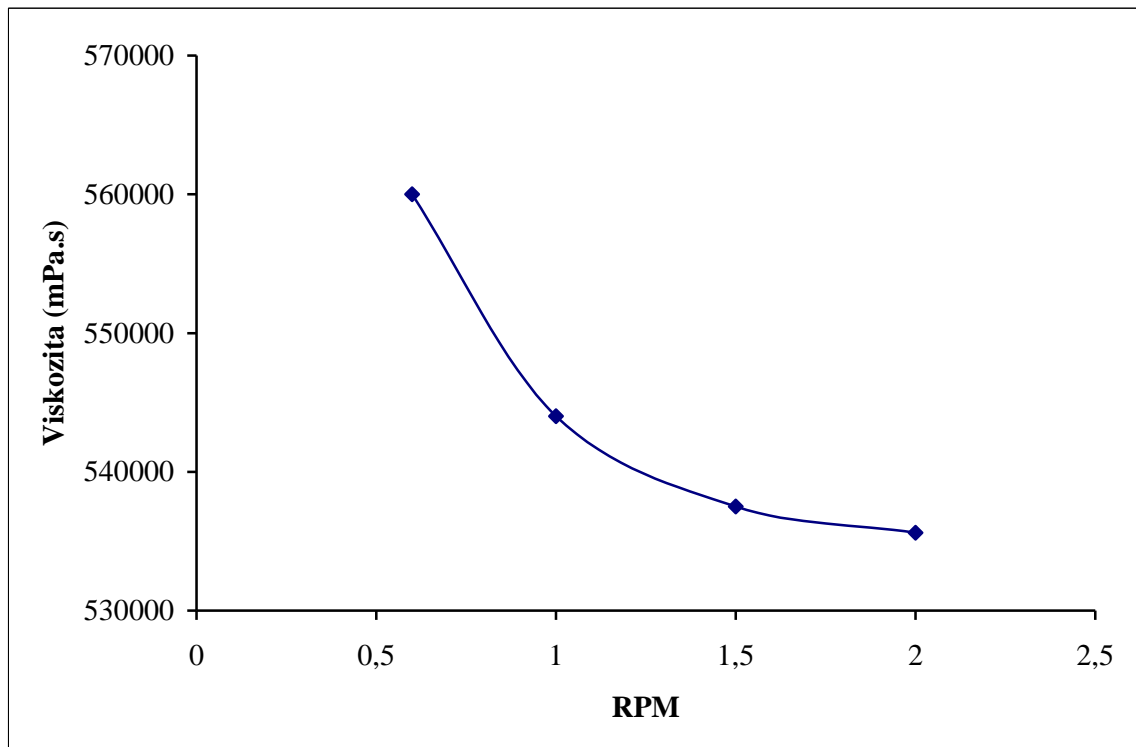


6.2.2. Měření viskozity

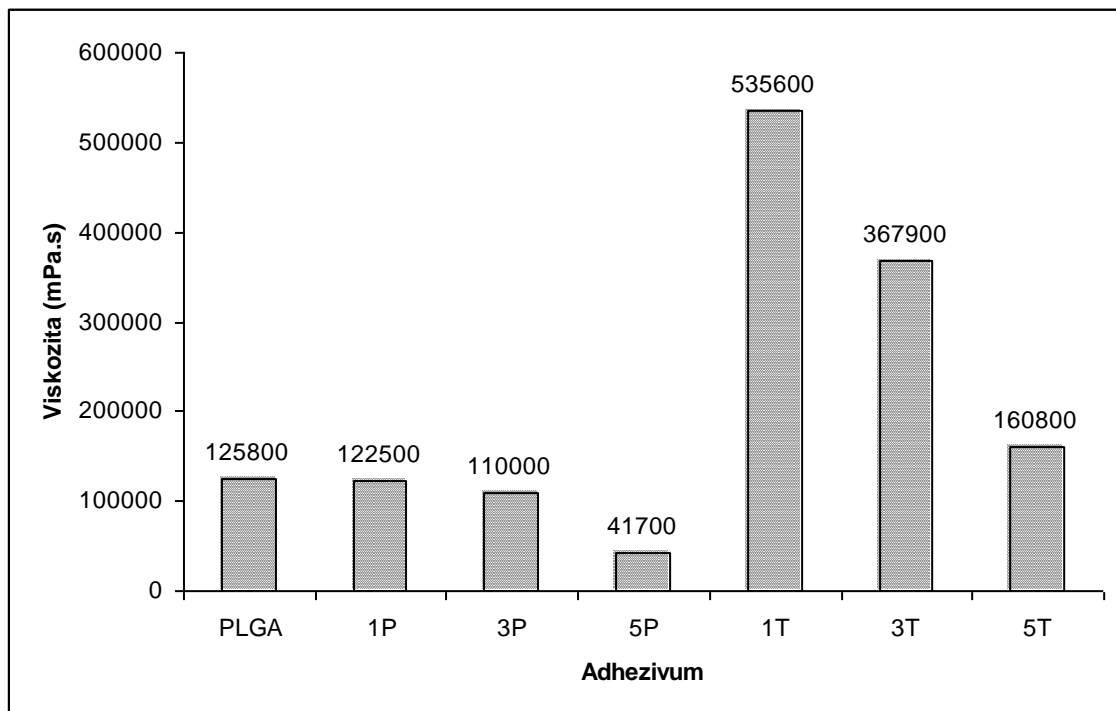
Obr. 13: Viskozitní křivka plastifikovaného nosiče 1P



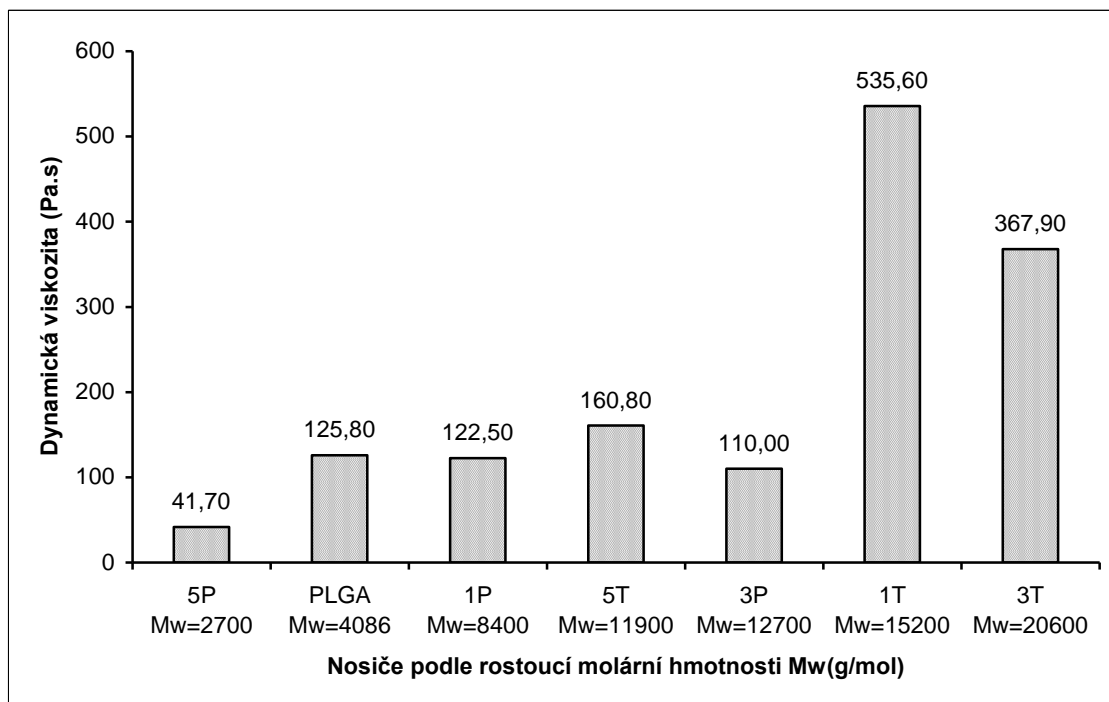
Obr. 14 : Viskozitní křivka plastifikovaného nosiče 1T



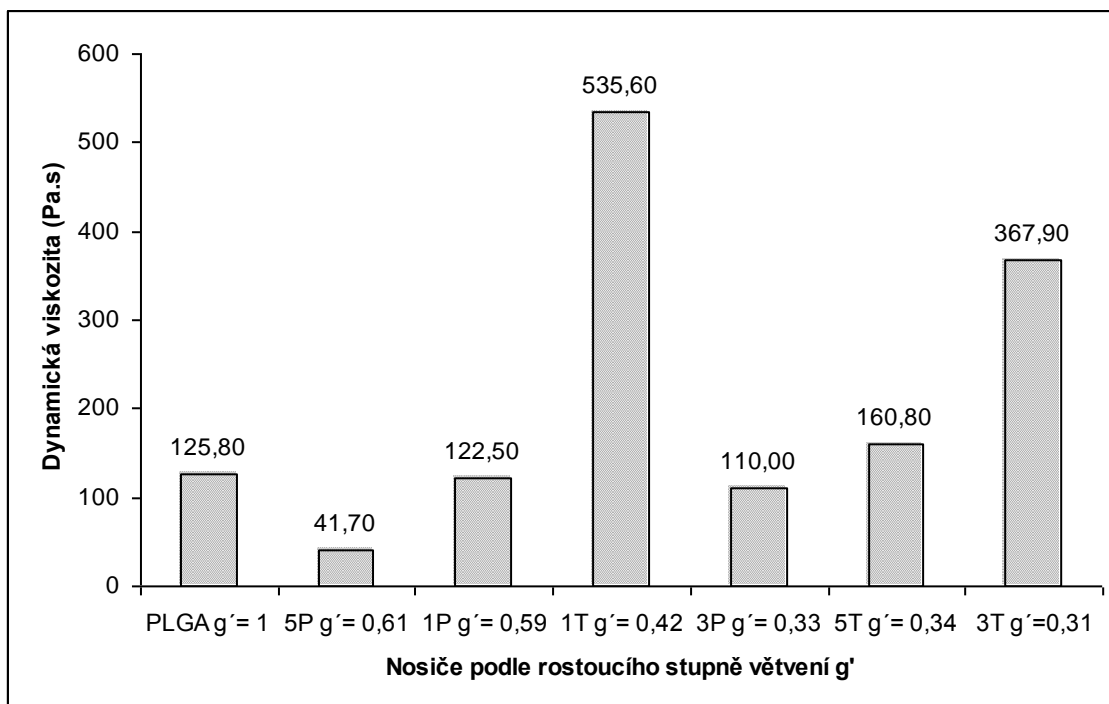
Obr.15: Porovnání dynamické viskozity testovaných nosičů plastifikovaných 30 % triethylcitrátu (vřetenno 14, 37°C, 3 ot./min.)



Obr.16 : Vztah mezi molární hmotností a dynamickou viskozitou plastifikovaných nosičů



Obr.17: Vztah mezi stupněm větvení a dynamickou viskozitou plastifikovaných nosičů



7. DISKUZE

Testované větvené oligoestery byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie stupňovou kopolymerací ternární směsi složené z ekvimolárního podílu kyseliny glykolové a kyseliny D,L-mléčné, doplněné pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem v koncentraci 1 %, 3 % nebo 5 %. V důsledku různého typu a koncentrace větvící složky mají jednotlivé polymery různý stupeň větvení, různou molární hmotnost a tedy odlišnou hydrofilitu, stupeň bobtnání a eroze. Charakteristiky testovaných nosičů jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Charakteristika testovaných nosičů

Označení polymeru	Poměr LA/GA/M(D) [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	η_w [ml/g]	T_g (°C)	g'
1P	49,5/49,5/1,0	4 200	8 400	9,1	26,6	0,59
3P	48,5/48,5/3,0	8 700	12 700	6,5	22,2	0,33
5P	47,5/47,5/5,0	2 200	2 700	4,6	12,7	0,61
1T	49,5/49,5/1,0	3 800	15 200	9,4	25,3	0,42
3T	48,5/48,5/3,0	7 900	20 600	8,5	21,7	0,31
5T	47,5/47,5/5,0	5 800	11 900	6,5	17,2	0,34
PLGA	50,0/50,0/0	1 833	4 086	-	17,0	1,00

M_nčíselný průměr molární hmotnosti

M_whmotnostní průměr molární hmotnosti

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

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

Pro lineární polymery dosahuje g' hodnoty 1,0 a klesá směrem k nule s rostoucím stupněm větvení. V tabulce 10 jsou uvedeny průměrné hodnoty g' počítané z experimentálně stanovené hodnoty vnitřní viskozity a hodnoty vnitřní viskozity počítané z hodnoty M_w a Markovy-Houwinkovy (MH) rovnice pro lineární

poly(DL-mléčnou) kyselinu. Ta byla stanovena čtyřnásobnou analýzou vzorku poly(DL-mléčné) kyseliny: $\eta = 5,22 \times 10^{-2} M^{0,629}$ [ml/g].

U vzorků větvených pentaerytritolem a tripentaerythritolem stupeň větvení a molární hmotnost vzrůstá při zvýšení koncentrace větvicího monomeru z 1 % na 3 %. Při použití 5 % se však již pravděpodobně projevuje přebytek hydroxylových skupin a stupeň větvení i molární hmotnost klesají.³⁹

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

7.1. Adhezivita plastifikovaných oligoesterů

Byla měřena síla F_{max} , potřebná k odtržení vzorku od podkladu, jako míra adhezivních vlastností (Tab.2 – 8). Testy adheze byly realizovány při kontaktní době 60 s, kontaktní síle 5 N a rychlosti odtržení vzorku od podkladu 100 mm/min. Adhezivita jednotlivých testovaných nosičů je ovlivněna molární hmotností a stupněm větvení.

U nosičů větvených tripentaerythritolem byla naměřena vyšší adhezivní síla než u nosičů větvených pentaerythritolem (Obr.10). Všechny tři nosiče větvené tripentaerythritolem mají molární hmotnost vyšší než 10 000 g/mol, jedná se tedy o polymerní látky. Z nosičů plastifikovaných pentaerythritolem má molární hmotnost vyšší než 10 000 g/mol pouze nosič 3P. Vztah mezi molární hmotností M_w a adhezivní silou F_{max} je znázorněn na Obr. 11. Z grafu je patrná jistá tendence růstu adhezivní síly s rostoucí molární hmotností nosiče. Nejvyšší adhezivní sílu mají nosiče 1T a 3T, které mají nejvyšší hodnotu M_w .

Nejednoznačný vliv na adhezivitu nosičů má stupně větvení. Na Obr. 12 jsou jednotlivé nosiče seřazeny podle rostoucího stupně větvení. Nejnižší adhezivní sílu mají nejméně

větvené nosiče 5P a 1P, se stupněm větvení g' přibližně 0,60. Významně vyšší adhezivní síla byla naměřena u více větvených nosičů s hodnotami g' v rozmezí 0,4 – 0,3.

Byla měřena adhezivita nevětveného nosiče PLGA, tvořeného 50 % kyseliny mléčné a 50 % kyseliny glykolové (Tab.2). Zjištěná adhezivní síla F_{max} byla porovnána s adhezivní silou větvených nosičů. Nevětvený nosič má adhezivitu vyšší než nosiče větvené pentaerythritolem, ale nižší než nosiče větvená tripentaerythritolem (Obr. 10). Molární hmotnost M_w nevětveného nosiče PLGA je pouze 4086 g/mol, jedná se tedy o oligoester. V porovnání s adhezivou dalších dvou testovaných oligoesterů (5P, 1P) má adhezivní sílu nejvyšší, dokonce vyšší, než nosič 3P s molární hmotností $M_w = 12700$ g/mol. (Obr. 11). Stupeň větvení g' lineárního oligoesteru PLGA je roven jedné. Adhezivita tohoto nevětveného nosiče je však v porovnání v nejméně větvenými nosiči 5P a 1P vyšší (Obr. 12).

V rámci diplomové práce⁴⁰ byla testována adhezivita oligoesterových nosičů větvených mannitolem (Tab.11).

Tab. 11: Charakterizace oligoesterových nosičů větvených mannitolem (M), testovaných v rámci diplomové práce⁴⁰

Označení nosiče	Poměr LA/GA/M [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	Stupeň větvení* $M_w(\text{Sec})/M_w$	T_g (°C)
3M	48,5/48,5/3,0	2600	3800	1,08	23,7
5M	47,5/47,5/5,0	1600	2200	1,36	21,0
8M	46/46/8,0	1400	1500	1,38	19,2

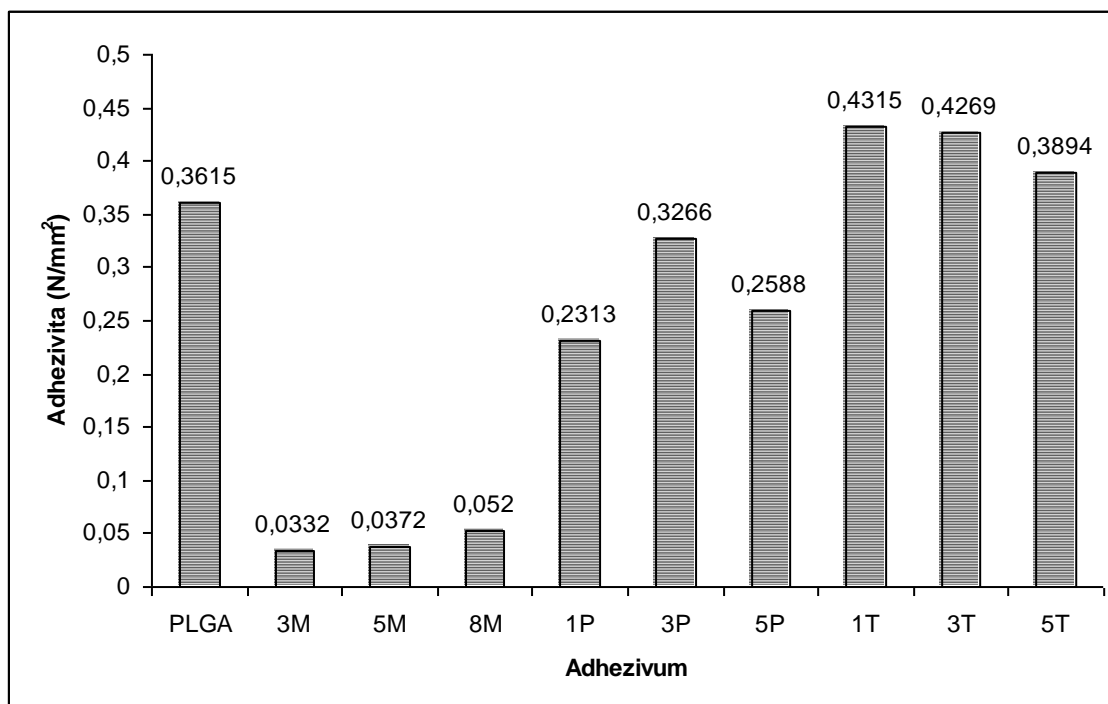
* nevětvená poly(D,L-mléčná) má hodnotu $M_w(\text{Sec})/M_w = 1,50$

Z důvodu možnosti porovnání výsledků diplomové a rigorózní práce byla naměřená adhezivní síla F_{max} v jednotkách Newton vtažena k velikosti adhezivní plochy. V testech provedených v rámci diplomové práce byla použita kruhová kontaktní plocha o průměru 28,04 mm, ale v testech provedených v rámci této rigorózní práce měla kontaktní plocha průměr 20,11 mm. Byl vyjádřen parametr $\varnothing F_{max}/S$ v jednotkách N/mm^2 a použit pro srovnání výsledků.

Z obrázku 18 vyplývá, že adhezivita nosičů větvených mannitolem, testovaných v rámci diplomové práce, byla řádově nižší než adhezivita nevětveného oligoesteru PLGA i adhezivita nosičů větvených pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem, testovaných

v rámci předložené rigorózní práce. Důvodem je patrně nízká molární hmotnost M_w těchto nosičů v porovnání s nosiči testovanými v rigorózní práci (je srovnatelná pouze s nosičem 5P). Molární hmotnost i stupeň větvení nosičů větvených mannitolem roste v pořadí 8M→5M→3M. Adhezivní síla v tomto pořadí naopak klesá (Obr. 18). U nosičů větvených pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem podobná lineární závislost nebyla zjištěna.

Obr.18 : Porovnání adhezivní síly nosičů větvených různými typy větvicí složky



7.2. Dynamická viskozita plastifikovaných oligoesterů

V experimentální části předložené rigorózní práce byla na digitálním viskozimetru Brookfield DV-E s adaptérem pro malé objemy vzorků měřena dynamická viskozita oligoesterů plastifikovaných 30 % koncentrací triethylcitrátu. Bylo použito vřeteno č. 14. Vzorky byly temperovány na 37°C.

Hodnoty dynamické viskozity plastifikovaných oligoesterů jsou uvedeny v Tab. 9. Se zvyšující se rychlostí otáčení vřetena se u většiny vzorků hodnoty viskozity prakticky nemění. Z toho vyplývá, že se jedná většinou o newtonské systémy, u kterých je viskozita konstantní. U vzorků 1P a 1T viskozita s rostoucí rychlostí otáčení vřetena klesá. V rozsahu 0,6 – 2,0 RPM u vzorku 1T a 1,0 – 10 RPM u vzorku 1P je možno hodnotit systémy jako neneutonské (Obr.13 a 14).

Z obr.15 je patrné, že nosiče větvené pentaerythritolem mají nižší viskozitu než nosiče větvené tripentaerythritolem. Nosiče s tripentaerythritolem patří mezi polymery, všechny tři mají molární hmotnost vyšší než 10 000 g/mol. Z nosičů s pentaerythritolem má molární hmotnost přes 10 000 g/mol pouze nosič 3P. Je tedy možné pozorovat obdobný vztah mezi viskozitou a molární hmotností, jako mezi adhezivitou a molární hmotností (Obr.16). Nejnižší viskozitu má oligoester 5P s molární hmotností $M_w = 20700$ g/mol. Přibližně trojnásobnou hodnotu viskozity mají nosiče s molární hmotností kolem 10 000 g/mol. Nejvyšší hodnotu viskozity mají polymerní nosiče s nejvyšší molární hmotností.

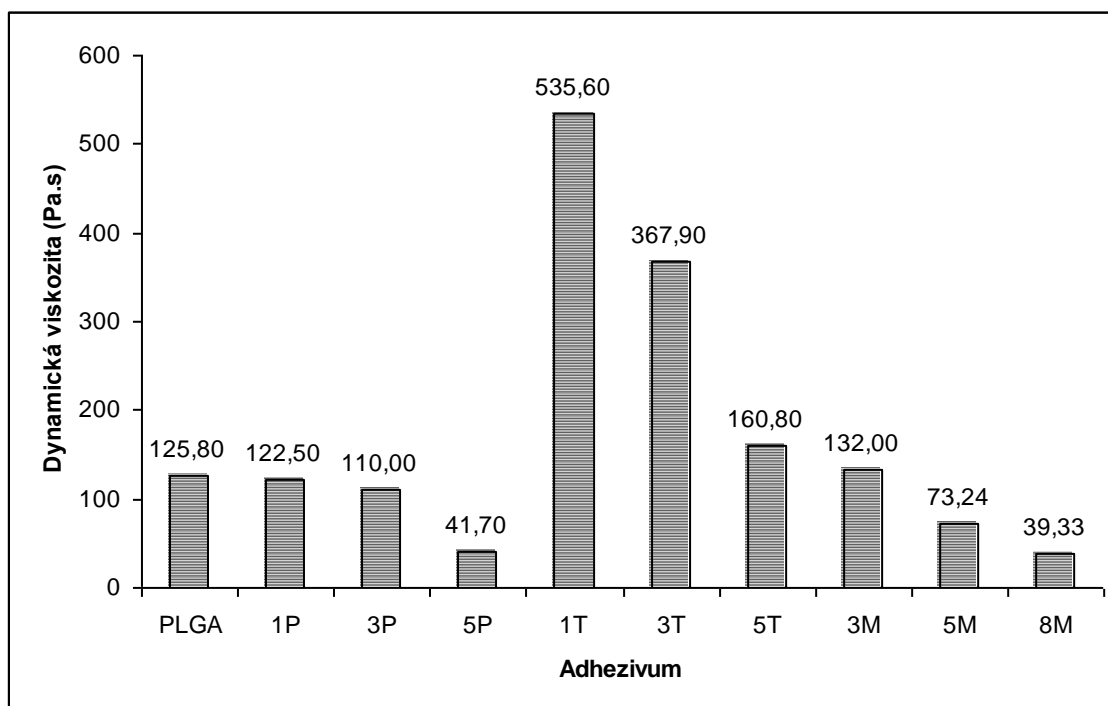
Na obr. 17 je zobrazena viskozita nosičů seřazených podle rostoucího stupně větvení. Z obrázku je zřejmé, že nelze vyvodit jednoznačný vztah mezi stupněm větvení nosiče a viskozitou. Konstatovat lze snad jedině to, že nejnižší viskozita byla naměřena u nosiče 5P s nejnižším stupněm větvení $g' = 0,61$. Avšak nosič 1P se srovnatelným stupněm větvení ($g' = 0,59$) má adhezivní sílu trojnásobnou.

Dynamická viskozita lineárního oligoesteru tvořeného 50% kyseliny mléčné a 50% kyseliny glykolové je 125,83 Pa·s, což je srovnatelné s oligoesterovým nosičem 1P, který má ovšem dvojnásobnou molární hmotnost a přibližně poloviční hodnotu stupně větvení. Tato skutečnost potvrzuje nejednoznačný vztah mezi dynamickou viskozitou na jedné straně a molární hmotností a stupněm větvení na straně druhé.

V rámci diplomové práce⁴⁰ byla měřena dynamická viskozita oligoesterových nosičů větvených mannitolem (3M, 5M, 8M). Tyto nosiče s nízkou molární hmotností a

nízkým stupněm větvení (viz. Tab.11) mají hodnotu viskozity srovnatelnou s nosiči větvenými pentaerythritolem (Obr. 19).

Obr. 19: Porovnání dynamické viskozity nosičů větvených různým typem větvicí složky



8. ZÁVĚRY

Z výsledků získaných v experimentální části předložené rigorózní práce lze vyvodit následující závěry:

1. Nosiče větvené tripentaerythritolem mají vyšší adhezivní sílu než nosiče větvené pentaerythritolem. Byla zjištěna tendence růstu adhezivní síly s rostoucí molární hmotností nosiče.
2. Nejnižší adhezivní sílu mají nejméně větvené nosiče 5P a 1P, se stupněm větvení g přibližně 0,60. Významně vyšší adhezivní síla byla naměřena u více větvených nosičů s hodnotami g v rozmezí 0,4 – 0,3.
3. Adhezivita nosičů větvených mannitolem, testovaných v rámci diplomové práce, byla řádově nižší.
4. Plastifikované nosiče jsou většinou newtonské systémy s konstantní viskozitou. Pouze v rozsahu 0,6 – 2,0 RPM u vzorku 1T a 1,0 – 10 RPM u vzorku 1P se jedná o systémy plastické.
5. Dynamická viskozita plastifikovaných nosičů roste s jejich molární hmotností. Vztah mezi viskozitou a stupněm větvení není jednoznačný.
6. Dynamická viskozita oligoesterových nosičů větvených mannitolem (3M, 5M, 8M) je srovnatelná s viskozitou nosičů větvených pentaerythritolem.

9. SOUHRN

Teoretická část se zabývá bioadhezí perorálně podaných látek (konkrétně peptidů a proteinů), jejími omezeními a možnostmi zlepšení, další kapitola charakterizuje v současnosti nejčastěji používaná bioadheziva. Podrobněji je rozebrána cytoadheze, na konci teoretické části je věnována pozornost endocytóze a transcytóze.

Experimentální část práce zkoumá reologické a adhezivní vlastnosti plastifikovaných oligoesterů kyseliny D,L-mléčné a glykolové větvených pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem. Adhezivita připravených vzorků byla měřena na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell jako maximální síla F_{max} , potřebná pro odtržení vzorku od podkladu. Tyto hodnoty byly přepočítány na velikost kontaktní plochy a porovnány s výsledky získanými v diplomové práci. Viskozita vzorků byla měřena na viskozimetru Brookfield DV-E s adaptérem pro malé množství vzorku při 37°C teplotě vřetenem č.14. Naměřené hodnoty z obou experimentů byly porovnány s hodnotami plastifikovaného lineárního oligoesteru tvořeného ekvimolárním množstvím kyselin L-mléčné a glykolové měřeného za stejných podmínek.

Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že vzorky větvené tripentaerythritolem mají vyšší adhezivní sílu než nosiče větvené pentaerythritolem, adhezivní síla roste s rostoucí molární hmotností nosiče. Adhezivita nosičů větvených mannitolem, testovaných v rámci diplomové práce, byla řádově nižší.

Kromě vzorků 1P a 1T mají ostatní nosiče hodnotu viskozity konstantní, jde tedy o newtonské systémy. Dynamická viskozita plastifikovaných nosičů roste s jejich molární hmotností. Vztah mezi viskozitou a stupněm větvení není jednoznačný. Dynamická viskozita oligoesterových nosičů větvených mannitolem je srovnatelná s viskozitou nosičů větvených pentaerythritolem.

SUMMARY

Theoretic part deals with bioadhesion of peroral substances (concretely peptides and proteins), its limitations and improvement feasibilities. Next chapter describes today most used bioadhesives. Cytoadhesion is analysed in more detail; theoretic part is concluded with characterisation of endocytosis and transcytosis.

Experimental part of thesis investigates rheologic and adhesive properties of plasticized oligoesters of D,L-lactic acid and glycolic acid in ratio 1:1 branched with pentaerythritol or tripentaerythritol. Adhesivity was measured on the Material testing machine T1-FR050TH.A1K Zwick/Roell as maximal force F_{max} required to detach the polymer system from substrate. These values were converted to the size of the contact area and compared with values gained in diploma thesis. Viscosity of samples was measured using viscosimeter Brookfield DV-E with an adaptor for small sample amount by 37°C temperature with spindle 14. Measured values from both of the experiments were compared with values of plasticized linear oligoester formed by equimolar amount of L-lactic acid and glycolic acid measured during equal conditions.

From the outcomes of made experiments ensues that samples branched with tripentaerythritol have higher adhesive force than carriers branched with pentaerythritol, adhesive force grows with raising carrier molar weight. Adhesivity of mannitol branched carriers tested during diploma thesis was low order.

Except from 1P and 1T samples the viscosity value of the other carriers is constant, thus we can speak about newton systems. Dynamic viscosity of plasticized carriers grows with their raising molar weight. The relation between viscosity and branching degree is not definite. Dynamic viscosity of oligoester carriers branched with mannitol is comparable to the viscosity of pentaerythritol branched carriers.

10. LITERATURA

- ¹ Allen, A., Cuncliffe, W. J., Pearson, J. P., Sellers, L. A., Ward, R.: Studies on gastrointestinals mucus. *Scand. J. Gastroenterol.* 19, 1984, 101.
- ² Lipkin, M.: Proliferation and differentiation of normal and diseased gastrointestinal cells: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed. Johnson, L. R., Ed., Raven Press, New York, 1987, 255.
- ³ Gruber, P., Rubinstein, A., Li, V. H. K., Bass, P., Robinson, J. R.: Gastric emptying of nondigestible solids in the fasted dog. *J. Pharm. Sci.*, 76, 1987, 117.
- ⁴ Bjork, E., Isaksson, U., Edman, P., Artursson, P.: Starch microspheres induce pulsatile delivery of drugs and peptides across the epithelial barrier by reversible separation of the tight junctions. *J. Drug. Target.*, 2(6), 1995, 501-507.
- ⁵ Lehr, C. M.: From sticky stuff to sweet receptors-achievements, limits and novel approaches to bioadhesion. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 21(2), 1996, 139-148.
- ⁶ Nangia, A.: *Bioadhesives for Targeted Oral Drug Delivery*. Drug Delivery Report, 2006.
- ⁷ Aiba, S.: Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 14, 1992, 225-228.
- ⁸ Schipper, N. G. M., Vårum, K. M., Artursson, P.: Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs.1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Res.* 13, 1996, 1686-1692.
- ⁹ Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S. S., Illum, L.: Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 11, 1994, 1358-1361.
- ¹⁰ Kas, H. S.: Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. *J. Microencaps.*, 14, 1997, 689-711.
- ¹¹ Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J.: Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 1997, 125-132.
- ¹² Peppas, N. A., Buri, P. A.: Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Controlled Release*, 2, 1985, 257-275.

-
13. Suzuki, Y., Ikura, H., Yamashita, G., Nagai, T.: Powdery pharmaceutical preparation and powdery preparation to the nasal mucosa and method for administration thereof. Japanese Patent, 1985, 1 286881.
 14. Thumwanit, V., Kedjarune, U.: Cytotoxicity of polymerized commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aust. Dent. J.*, 44, 1999, 248-52.
 15. Singla, A. K., Chawla, M., Singh, A.: Potential applications of Carbomer in oral mucoadhesive controlled drug delivery system. A review, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 26(9), 2002, 913-924.
 16. Batchelor, H.: Novel Bioadhesive Formulations in Drug Delivery. The Drug Delivery Companies Report, 2004.
 17. Beachey, E. A.: Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, 143, 1981, 325.
 18. Pethica, B. A.: The physical chemistry of cell adhesion. *Exp. Cell Res.*, 8, 1961, 123-140.
 19. Pusztai, A.: Plant lectins-biological functions. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, 22(4), 1987, 355-375.
 20. Pusztai, A. J., Palmer, R.: Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): The toxic principle. *J. Sci. Fd. Agric.*, 28, 1977, 620.
 21. King, T. P., Pusztai, A. J., Clarke, E. M. W.: Immunocytochemical localization of ingested kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in rat gut. *Histochem. J.*, 12, 1980, 201.
 22. King, T. P., Pusztai, A. J., Clarke, E. M. W.: Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) induced lesions in rat small intestine: light microscope studies. *J. Comp. Path.*, 90, 1980, 585.
 23. Hendriks, H. G. C. J. M., Kik, M. J. L., Koninkx, J. F. J. G., van den Ingh, T. S. G. A. M., Mouwen, J. M. V. M.: Binding of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) isolectins to differentiated human colon carcinoma Caco-2 cells and their effect on cellular metabolism. *Gut.*, 32, 1991, 196.
 24. Pusztai, A. J.: *Plant Lectins*. University Press, Cambridge, 1991.
 25. Woodley, J. F., Naisbett, B.: The potential of lectins for delaying the intestinal transit of drugs. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 15, 1988, 125.
 26. Lehr, C. M., Bouwstra, J. A., Kok, W.: Bioadhesion by means of specific binding of tomato lecithin. *Pharm. Res.*, 9(4), 1992, 547-553.

-
27. Gabor, F., Stangl, M., Wirth, M.: Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *J. Control Release*, 55(2-3), 1998, 131-142.
28. Izhar, M., Nuchamowitz, Y., Merelman, D.: Adherence of *Shigella Flexneri* to guinea pig intestinal cells is mediated by mucosal adhesin. *Infect. Immun.*, 35, 1982, 1110.
29. Ashkenazi, S.: Adherence of non-fimbriated entero invasive *Escherichia coli* O124 to guinea pig intestinal tract in vitro and in vivo. *J. Med. Microbiol.*, 21, 1986, 117.
30. Bridges, J. F., Woodley, J. F., Duncan, R., Kopeček, J.: Soluble N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers as a potential oral, controlled-release, drug delivery system. I. Bioadhesion to the rat intestine in vitro. *Int. J. Pharm.*, 44, 213, 1988.
31. Haltner, E., Easson, J. H., Lehr, C. M.: Lectins and bacterial invasion factors for controlling endo- and transcytosis of bioadhesive drug carrier systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44(1), 1997, 3-13.
32. Marlin, S. D., Staunto, D. E., Springer, T. A., Stratowa, C., Sommergruber, W., Merluzzi, V. J.: A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature*, 344, 1990, 70.
33. Simionescu, M., Ghitescu, L., Fixman, A., Simionescu, N.: How plasma macromolecules cross the endothelium. *News Physiol. Sci.*, 2, 1987, 97.
34. Pratten, M. K., Duncan, R., Lloyd, J. B.: Adsorptive and passive pinocytotic uptake. In Ockleford, C. J., Whyte, A.: *Coated Vesicles*, Eds. University Press, Cambridge, 1980, 179.
35. Shen, W.-C., Wan, J., Ekrami, H.: Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 8, 1992, 93.
36. Goldstein, J. L., Brown, M. S.: Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.*, 249, 1974, 5153.
37. Feller, M., Behnke, D., Gruenstein, E.: Relationship between lectin monosaccharide specificity and binding to the plasma membrane of human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, 586, 1979, 315.

-
- ^{38.} Prokelová, I.: Adhezivní vlastnosti větvených oligoesterů, Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005, 90 str.
- ^{39.} Podzimek, Š.: Charakterizace větvených oligoesterů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem. Synpo Pardubice, 2006, s.3
- ^{40.} Podzimková, Š.: Měření adheze oligoesterových nosičů II., Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2007, 98 str.