

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**ADHEZIVNÍ VLASTNOSTI VĚTVENÝCH  
OLIGOESTERŮ PLASTIFIKOVANÝCH  
TRIETHYLCITRÁTEM A LIBERACE LÉČIV  
Z TĚCHTO NOSIČŮ**

Rigorózní práce

Hradec Králové 2010

Mgr. Petra Dvořáková

Především bych chtěla poděkovat PharmDr. Evě Šnejdrové, PhD. za umožnění vypracovat rigorózní práci pod jejím vedením. Děkuji jí za poskytnutí cenných rad a odbornou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mi v průběhu měření jakkoliv podali pomocnou ruku.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Petra Dvořáková

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>4</b>
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>5</b>
<b>3. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>6</b>
<b>4. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>7</b>
4.1. BIOADHEZE.....	7
4.2. BIOLOGICKÉ SUBSTRÁTY .....	9
4.3. POLYMERY POUŽÍVANÉ V TERAPEUTICKÝCH SYSTÉMECH LÉČIV .....	11
4.4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIOADHEZIVNÍ VLASTNOSTI POLYMERŮ .....	13
4.5. LIBERACE .....	16
4.5.1. <i>Difúzně řízené terapeutické systémy.....</i>	<i>18</i>
4.5.2. <i>Terapeutické systémy citlivé na změny prostředí (řízené bobtnáním).....</i>	<i>19</i>
4.5.3. <i>Biodegradabilní terapeutické systémy.....</i>	<i>22</i>
4.6. KYSELINA POLYGLYKOLOVÁ A POLYMLÉČNÁ.....	24
4.7. PLASTIFIKÁTORY .....	33
4.8. LÉČIVA POUŽITÁ V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI .....	36
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>41</b>
5.1. POUŽITÉ SUROVINY.....	41
5.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	41
5.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	41
5.4. LIBERACE LÉČIV .....	42
5.5. MĚŘENÍ ADHEZE.....	47
<b>6. VÝSLEDKY .....</b>	<b>49</b>
6.1. TABULKY .....	49
6.2. GRAFY .....	57
<b>7. DISKUZE .....</b>	<b>62</b>
7.1. OLIGOESTERY VĚTVENÉ DIPENTAERYTHRITOLEM JAKO NOSIČE LÉČIV .....	62
7.2. ADHEZIVITA OLIGOESTERŮ VĚTVENÝCH DIPENTAERYTHRITOLEM.....	65
<b>8. ZÁVĚRY.....</b>	<b>69</b>
<b>9. SOUHRN .....</b>	<b>70</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>72</b>

# 1. ÚVOD

Bioadheze je definována jako stav, kdy dva materiály, z nichž alespoň jeden je biologického původu, drží pohromadě po delší dobu interfaciálními (meziplošnými) silami. Bioadheziva se dostala do zájmu farmaceutických věd pro jejich schopnost optimalizovat targeting léčiv. Targeting léčiv může být optimalizován v místě působení (například na rohovce nebo uvnitř ústní dutiny) nebo v místě absorpce (například v tenkém střevě nebo v nosní dutině). Bioadheziva mohou být také použita přímo jako terapeutické látky, aby pokrývala a chránila poškozené tkáně (například žaludeční vředy nebo poranění na sliznici dutiny ústní) nebo mohou působit jako lubrikační látky (například v dutině ústní, oku a pochvě). Vhodný výběr polymeru je nezbytný pro vývoj úspěšného terapeutického systému. Léčiva inkorporovaná do polymerních systémů jsou uvolňována buď difúzí přes polymerní matrici, nebo erozí polymerního materiálu, nebo kombinací těchto dvou procesů.

Předložená rigorózní práce studuje adhezivní a liberační vlastnosti plastifikovaných větvených oligoesterů a tematicky navazuje na předešlé práce, ve kterých byly za stejných zkušebních podmínek testovány buď jiné oligoesterové nosiče,<sup>1,2</sup> nebo jiné plastifikátory.<sup>3,4</sup>

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem mé rigorózní práce bylo studium adhezivních vlastností větvených terpolymerů kyseliny D,L-mléčné, glykolové a dipentaerythritolu a studium liberace antimykotika flukonazolu a antivirotika acikloviru z těchto oligoesterových nosičů. Inkorporací vybraných léčiv do degradabilní adhezivní matrice je dosaženo prodlouženého uvolňování léčiva v místě aplikace na rozdíl od klasických lékových forem.

Úkol rigorózní práce lze rozdělit do následujících bodů:

1. Příprava matric pro měření adheze a průběhu liberace: plastifikace oligoesterů kyseliny D,L-mléčné, glykolové a dipentaerythritolu triethylcitrátem v koncentraci 30% a inkorporace 4% modelového léčiva (aciklovir, flukonazol).
2. Měření adhezivní plasticity plastifikovaných oligoesterů na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell jako maximální síly  $F_{\max}$  potřebné pro odtržení vzorku od podkladu při kontaktní síle 10 N, době kontaktu 60 s a rychlosti odtržení adheziva od podkladu 100 mm/min.
3. Příprava fosfát citrátového pufru o pH 7,0 jako liberačního média vhodného pro liberaci léčiv.
4. Provedení modifikovaného disolučního testu za statických podmínek při 37°C.
5. Stanovení množství uvolněného léčiva ve vzorcích disoluční kapaliny naměřením hodnot absorpance spektrofotometricky při zvolené vlnové délce.

### 3. SEZNAM ZKRATEK

- 0,5D.....oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 0,5% dipentaerythritolu  
1D.....oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 1% dipentaerythritolu  
2D.....oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 2% dipentaerythritolu  
3D.....oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 3% dipentaerythritolu  
5D.....oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 5% dipentaerythritolu  
8D.....oligoester kyseliny D,L-mléčné, glykolové a 8% dipentaerythritolu  
DNA.....deoxyribonukleová kyselina  
D-PLA.....kyselina polymléčná složená z D-izomerů  
D,L-PLA....kyselina polymléčná složená z racemické směsi izomerů  
L-PLA.....kyselina polymléčná složená z L-izomerů  
PGA.....kyselina polyglykolová  
PLA.....kyselina polymléčná  
PLGA.....kopolymer kyseliny mléčné a glykolové  
TEC.....triethylcitrát  
 $T_g$ .....teplota skelného přechodu  
 $T_m$ .....teplota tání

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

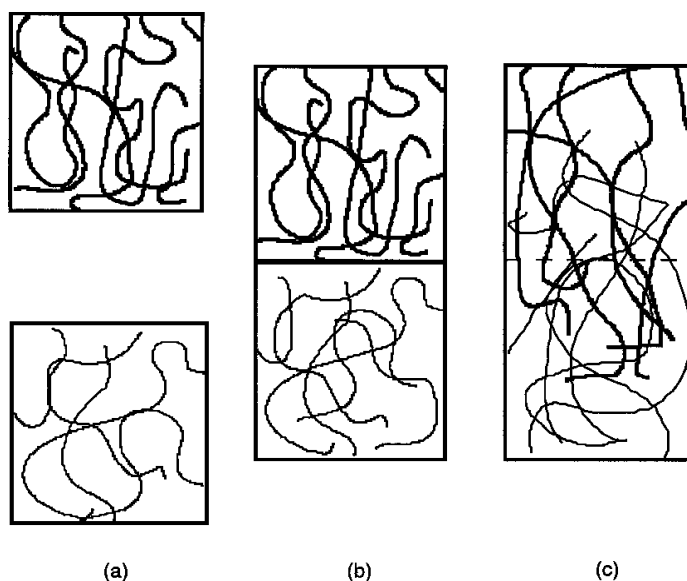
### 4.1. Bioadheze

Bioadheze je popisována jako přilnutí *adheziva*, syntetické nebo biologické makromolekuly, k *substrátu*, biologické tkáni. Pojem bioadheze je obecný. Adhezivní vazby se mohou vytvořit s epitelální buněčnou vrstvou, souvislou mukózní vrstvou, nebo kombinací těchto vrstev. Rozlišujeme tedy bioadhezi k mukóznímu povrchu, mukoadhezi a buněčně specifickou bioadhezi, cytoadhezi.<sup>5</sup>

Proces adheze je zpravidla popisován ve dvou fázích:<sup>6</sup>

**fáze 1 – kontaktní fáze:** mezi adhezivem a substrátem nastává úzký kontakt (smáčení)

**fáze 2 – fáze konsolidační:** na upevnění a zesílení adhezivní vazby se podílejí různé fyzikálně-chemické interakce, dochází k interdifúzi a interpenetraci adheziva a substrátu



**Obr. 1:** Schematické znázornění mechanismu bioadheze: mukoadhezivum a mucinový glykoprotein a) před kontaktem, b) při kontaktu a c) jejich interpenetrace.<sup>7</sup>

Mukoadhezivum a mukózní membrána spolu nejdříve musí přijít do styku, aby vytvořily těsný, bezprostřední kontakt. Pokud se adhezivum přibližuje k povrchu, působí na něj jak odpudivé, tak přitažlivé síly. Odpudivé síly vznikají působením osmotického tlaku jako následek interpenetrace elektrickou dvojrůstvou, sterických

efektů a také elektrostatických interakcí, jestliže mají povrch a částice stejný náboj. Přitažlivé síly vznikají z van der Waalsových interakcí, povrchové energie a elektrostatických interakcí, jsou-li povrch a částice nabitý opačně. Výsledná síla, která je daná rozdílem těchto opačně působících sil, se mění v závislosti na povaze adheziva, podmínkách v místě aplikace a se vzdáleností mezi povrchem a adhezivem.<sup>8</sup> Jedná se o mezifázový jev, během kterého se uplatňuje povrchová energie a rozprostírání obou fází, hleny a mukoadheziva. Bezprostředního kontaktu, který je nutný pro silnou adhezivní vazbu, je dosaženo v případě, že je *rozprostírací koeficient*  $S$  jedné ze dvou fází pozitivní. Rozprostírací koeficient vyjadřuje rozdíl mezi *prací adheze*  $W_a$  (síla působící mezi molekulami různých látek) a *prací koheze*  $W_c$  (síla působící mezi molekulami jedné látky) jedné z těchto dvou fází:

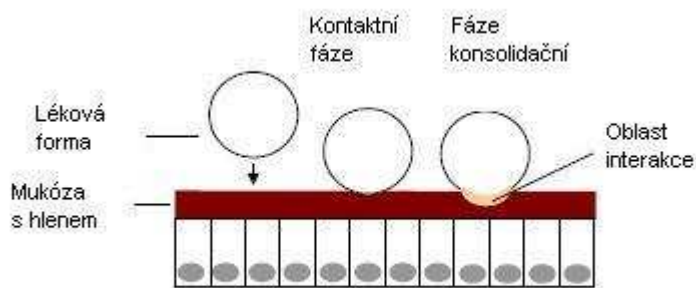
$$S = W_a - W_c$$

Je-li  $S \geq 0$ , dochází k rozprostírání adheziva po substrátu.<sup>9</sup>

Pokud je požadována silná nebo prodloužená adheze, např. pro větší adheziva, která jsou vystavená vlivům zevního prostředí, jako je světlo nebo dynamika v místě aplikace, je nutná druhá fáze – fáze konsolidační.<sup>10</sup> Pro dosažení silné adheze je nutné, aby se změnila fyzikální vlastnosti vrstvy hleny, jinak dochází působením negativních vnějších vlivů k přerušení adhezivního spoje. Tato fáze mukoadheze zahrnuje vzájemné propletení řetězců obou fází na značné vzdálenosti. Výsledkem je vzrůst adhezivní síly. Vzdálenost interpenetrace je dána rovnicí:

$$s = \sqrt{2Dt}$$

kde  $s$  je *difúzní vzdálenost*,  $D$  je *difúzní koeficient* a  $t$  je *kontaktní čas*.<sup>9</sup>



**Obr. 2:** Dvě fáze mukoadheze.<sup>11</sup>



## 4.2. Biologické substráty

**Mukózní membrány (mukózy)** jsou nejvlhčí povrchy pokrývající stěny různých tělních dutin, například gastrointestinálního a dýchacího traktu. Skládají se z vrstvy pojivové tkáně (lamina propria), nad kterou je vrstva epitelu, a z povrchu, který je obvykle zvlhčen přítomností vrstvy hlenu. Epitel může být buď jednovrstevný (charakteristický pro žaludek, tenké a tlusté střevo a průdušky), nebo vícevrstevný/stratifikovaný (nacházející se v jícnu, pochvě a rohovce).<sup>12</sup>

Mukóza dutiny ústní je komplexní série tkání, které vykazují široký rozsah propustností. Struktura sliznice se v různých oblastech dutiny ústní liší. Výsledkem toho jsou její rozdílné bariérové vlastnosti. Z toho vyplývá, že struktura mukózy v dutině ústní je velmi důležitá pro targeting léčiv. Léčiva podávaná přes mukózu dutiny ústní se dostávají do systémové cirkulace prostřednictvím sítě artérií a kapilár. Dáseň a tvrdé patro jsou lemovány žvýkací mukózou, kde se nachází epitel se zrohovatělým povrchem obsahující keratin. Labiální a bukální mukóza, spodní část dutiny ústní, měkké patro a spodní strana jazyka jsou lemovány nekeratinizovaným vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Tyto oblasti jsou tedy hlavním místem absorpce v dutině ústní. Důležitou funkcí je obnova buněk. Tloušťka epitelu v dutině ústní se mění v závislosti na umístění a druhu. Bukální epitel je složen přibližně ze čtyřiceti až padesáti buněčných vrstev, zatímco sublinguální tkáň obsahuje těchto vrstev podstatně méně. U lidí má bukální mukóza tloušťku 500 - 800  $\mu\text{m}$ , zatímco spodní část dutiny ústní, přední část jazyka a dásně mají tloušťku 100 - 200  $\mu\text{m}$ .<sup>13</sup>

Sliznice dutiny ústní je pokrytá strukturou na bázi gelu, známou jako mukus. Mukus neboli hlen slouží jako spojovací článek mezi adhezivem a membránou. Proto, během procesu adheze, všechny bioadhezivní materiály musí interagovat s vrstvou hlenu.

Hlen je glykoprotein, po chemické stránce se skládá z rozsáhlé peptidové kostry s vedlejšími oligosacharidovými řetězci, mnoho z nich je zakončeno kyselinou sialovou nebo sulfonovou nebo L-fukosou. Oligosacharidové řetězce jsou kovalentně vázané s hydroxyaminokyselinami, serinem a threoninem, podél polypeptidové kostry. Okolo 25% polypeptidové kostry je bez sacharidů, tzv. „nahá“ proteinová oblast, která je náchylná k enzymatickému štěpení. Zbývajících 75% polypeptidové kostry je hustě glykosylováno. Při fyziologickém pH může nést síť hlenu významný negativní náboj díky přítomnosti kyseliny sialové a zbytkům kyseliny sulfonové. Velká hustota

negativních nábojů totiž významně přispívá k bioadhezi. Na složité povaze hleny se podílí disulfidové můstky, fyzikální propletení a sekundární vazby (elektrostatické a vodíkové vazby, hydrofóbní interakce). Z toho důvodu může být hlen považován za makromolekulární seskupení spojené příčnými vazbami, které umožňují vznik agregátové struktury. Glykoproteinové frakce udělují hleny viskózní nebo gelové vlastnosti, a to díky jeho schopnosti zadržovat vodu, např. pojme až čtyřicetinasobek vody. Za fyziologických podmínek jsou reologické vlastnosti glykoproteinu v širokém rozsahu, včetně gelové struktury. Hlen má silné kohezivní vlastnosti a je pevně vázán na povrch epitelálních buněk jako souvislá vrstva gelu.<sup>14</sup>

Mucus vedle dutiny ústní pokrývá lumenální povrch gastrointestinálního, respiračního, urogenitálního traktu a oční tkáň. Funkce hleny se mění v závislosti na jednotlivých orgánech. Na vystavených površích tvoří hlen nejzvnějšší linii ochrany proti cizím patogenům, toxinům a částicím z vnějšího prostředí.<sup>15</sup> V gastrointestinálním traktu hlen ve funkci lubrikantu napomáhá transportu tráveniny. Na povrchu orgánů slouží hlen také jako lubrikant, minimalizuje tak tření orgánů mezi sebou.<sup>16</sup> Hlen vykonává četné funkce, je kontinuálně vylučován buď gobletovými buňkami, nebo speciálními exokrinními žlázami s jadrky hlenových buněk. Měření reologických vlastností hleny, včetně viskozity a elasticity, je často používáno k popisu konzistence hleny. Změny v reologických vlastnostech hleny mohou značně ovlivnit jeho schopnost plnit funkci lubrikantu, bariéry nebo ochranné vrstvy proti infekci.<sup>17</sup>

Hlen je neneutonský, tixotropní gel, který se odlišuje od klasických pevných látek a kapalin odezvou na smykové napětí. Při nízkém napětí se hlen chová jako pružná pevná látka, zatímco při vysokém napětí jako viskózní kapalina a ireverzibilně se deformuje.

Reologické vlastnosti hleny se mění v závislosti na složení hleny a jeho glykosylaci, obsahu mucinu a míře hydratace hleny.<sup>18,19</sup>

**Buněčná membrána** se skládá z lipidové dvojvrstvy, do níž jsou vmezeřeny makromolekuly bílkovin a sacharidů. Její struktura je stále popisována modelem fluidní mozaiky. Proteiny a sacharidy se v tomto modelu mohou volně pohybovat lipidovou dvojvrstvou membrány a jen některé z nich jsou k ní zčásti připevněné.

Hlavními složkami buněčné membrány jsou lipidy (cholesterol, fosfolipidy, sfingolipidy), proteiny a sacharidy. Sacharidy jsou navázány na proteiny nebo lipidy a vytvářejí tak s nimi buď glykoproteiny, nebo glykolipidy. Struktury obsahující

polysacharidy, které se vyskytují na vnějším povrchu buněk, jsou nazývány jako glykokalyx. Lektiny, proteinové receptory buněčné membrány, jsou schopny se specificky vázat na glykokalyx nebo na polysacharidy glykoproteinů. Má se za to, že lektiny jsou částečně zodpovědné za komunikační proces mezi buňkami. Jelikož pouze malé procento lipidů nese kladný náboj, buněčná membrána je celkově nabita záporně stejně jako mukus (hlen). Vyplývá z toho, že adhezivní síly mezi membránou a vrstvou hleny musí být natolik silné, aby překonaly síly repulzní. Dochází ke vzniku indukovaného dipólu, a to má za následek nárůst adhezivní síly mezi tkání a hlenem.<sup>20</sup>

### 4.3. Polymery používané v terapeutických systémech léčiv

Při vývoji úspěšného terapeutického systému léčiv je nezbytný vhodný výběr polymeru. Zvolen může být buď nebiodegradabilní, nebo biodegradabilní polymer. Hlavní nevýhodou nebiodegradabilních polymerů je podmínka chirurgického zákroku po uvolnění veškerého léčiva. Nebiodegradabilní polymery mohou být tedy použity pouze v případě, kdy je odstranění implantátu snadné (například oční implantát). Naproti tomu biodegradabilní polymery nevyžadují chirurgický zákrok, a proto jsou v terapeutických systémech léčiv upřednostňovány. Je však nutné brát v úvahu skutečnost, že biodegradabilní materiál vytváří degradací vedlejší produkty, které musí být tolerovány tak, aby nevyvolávaly žádnou nebo jen minimální nežádoucí reakci organismu. Biodegradabilní polymery jsou buď přírodního, nebo syntetického původu. Syntetické polymery mají obecně řadu výhod. Lze u nich téměř libovolně v širokém rozsahu volit jejich vlastnosti. Další výhodou je snadná dostupnost výchozích surovin.

Nejběžněji používanými syntetickými biodegradabilními polymery jsou polyestery skládající se z homopolymerů nebo kopolymerů kyseliny glykolové a mléčné. Největší výhodou těchto biodegradabilních polymerů je, že se postupně štěpí na biologicky přijatelné molekuly, které jsou metabolizovány a z organismu odstraňovány cestou přirozených metabolických pochodů. Polylaktidy, polyglykolidy a jejich kopolymery se postupně štěpí až na kyselinu mléčnou a glykolovou, které vstupují do Krebsova cyklu (cyklus trikarboxylových kyselin), kde jsou dále štěpeny na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O a z organismu vyloučeny. Původně byly tyto polymery používány jako vstřebatelný šicí materiál.<sup>21,22</sup> Dnes nacházejí široké uplatnění v chirurgii (švy, svorky), ortopedických fixačních pomůckách (klouby, šrouby, stehy, vazy), dentálních

pomůckách (řízená regenerace tkáně) a v kardiovaskulární (stenty, transplantáty) a intestinální (stomické kroužky) oblasti.<sup>23</sup>

**Tab. 1:** Vlastnosti některých vybraných biodegradabilních polymerů.<sup>23</sup>

<b>Polymer</b>	<b>Bod tání [°C]</b>	<b>Teplota skelného přechodu [°C]</b>	<b>Moduly elasticity [Gpa]<sup>a</sup></b>	<b>Doba rozpadu [měsíce]<sup>b</sup></b>
PGA	225 – 230	35 – 40	7,0	6 – 12
LPLA	173 – 178	60 – 65	2,7	> 24
DLPLA	amorfní	55 – 60	1,9	12 – 16
85/15 DLPLG	amorfní	50 – 55	2,0	5 – 6
75/25 DLPLG	amorfní	50 – 55	2,0	4 – 5
65/35 DLPLG	amorfní	45 – 50	2,0	3 – 4
50/50 DLPLG	amorfní	45 – 50	2,0	1 – 2

**a.....** moduly pružnosti v tahu nebo ve smyku

**b.....** čas potřebný na kompletní rozpad hmoty

Mezi všeobecná kritéria pro výběr polymeru jako biomateriálu patří odpovídající mechanické vlastnosti a doba rozpadu, které jsou nutné pro danou aplikaci. Ideální polymer by měl být syntetizován tak, aby:

- měl odpovídající mechanické vlastnosti
- nevyvolával zánětlivou nebo toxickou reakci
- byl po splnění svého účelu v těle beze zbytku metabolizován
- byl snadno zpracovatelný do konečného produktu
- měl přijatelné podmínky uchovávání
- byl dobře sterilizovatelný

Mechanické vlastnosti biodegradabilních polymerů jsou ovlivňovány faktory, jako jsou například druh monomeru a iniciátoru, zvolené reakční podmínky a přítomnost aditiv. Tyto faktory mohou ovlivňovat hydrofilitu, krystalinitu, bod tání, teplotu skelného přechodu, molekulovou hmotnost, strukturu a čistotu výsledného polymeru.<sup>24</sup>

V bioadhezivních systémech mohou být tedy používány různorodé polymery, vedle již výše zmíněného dělení dále rozlišujeme ve vodě rozpustné polymery, nerozpustné hydrokoloidní polymery, ionogenní (ionické) i neionogenní (neionické)

polymery, a také nerozpustné hydrogely. Biodegradabilní polymery mohou být také rozděleny podle způsobu degradace na enzymaticky a hydrolyticky degradabilní. Většina přírodních polymerů podléhá enzymatické degradaci, zatímco syntetické polymery podléhají degradaci hydrolytické. Mezi hydrolyticky biodegradabilní polymery řadíme například poly( $\alpha$ -estery) (polyglykolidy, polylaktidy, polylaktid-co-glykolidy, polydioxany, polykaprolaktony), polyuretany, polyesteramidy, polyorthoestery, polyanhydridy, polyfosfoestery. Proteiny a polyaminokyseliny (například kolagen, albumin, fibrin) a polysacharidy patří mezi enzymaticky biodegradabilní polymery.<sup>25</sup>

#### 4.4. Faktory ovlivňující bioadhezivní vlastnosti polymerů

➤ *Molekulová hmotnost a konformace polymeru*

Podle Chena a Cyra adhezivní síla roste s molekulovou hmotností polymeru nad 100 000 Da, jak je patrné v případě PEG polymerů. Molekula polymeru musí mít adekvátní délku, aby mohlo dojít k interpenetraci řetězců. Je také nezbytné vzít v úvahu velikost a prostorové uspořádání molekuly polymeru. Například, pro sodnou sůl karmelosy je kritická molekulová hmotnost 78 600 Da. Tato molekulová hmotnost je požadovaná, aby došlo k interpenetraci a propletení.<sup>26</sup> Hranice molekulové hmotnosti se posouvá v závislosti na konformaci polymeru. U polyethylenoxidu adhezivní síla roste až k molekulové hmotnosti 4 000 000 Da, kdy polyethylenoxid obsahuje molekuly s vysoce lineární konfigurací, která přispívá k interpenetraci. Naproti tomu, u dextranů s molekulovou hmotností 19 500 000 Da naměříme podobnou bioadhezivní sílu jako u dextranů s molekulovou hmotností 200 000 Da. Pokud molekuly dextranu vykazují konformaci náhodného klubka, pak je mnoho aktivních skupin adheziva chráněno uvnitř tohoto klubka a jsou nedostupné pro proces adheze.<sup>27</sup>

➤ *Hustota zesítní*

Polykarbofil, dobře známé mukoadhezivum, je polymer kyseliny polyakrylové. Lineární segmenty jsou zesítněné divinylglykolem.<sup>28</sup> Předpokládá se, že hustota zesítní polykarbofilu bude ovlivňovat mukoadhezi množstvím řetězců polyakrylové kyseliny v daném objemu stejně tak dobře jako pohyblivostí segmentů polymerního řetězce. Nárůstem zesítní dochází k poklesu adhezivní síly, který se projevuje snížením

difúzního koeficientu a pohyblivostí a flexibilitou jednotlivých segmentů. To má za následek redukcí rozsahu interpenetrace.<sup>29</sup>

➤ *Náboj a ionizace*

Pro hydrofilní ionická bioadheziva je důležitou charakteristikou druh náboje a jeho hustota. Anionické polymery se váží na mukózu pomocí vodíkových vazeb. V kyselém prostředí, pokud jsou karboxylové skupiny přeměněny na anionickou formu, je tato vazba ještě zesílena. Kationické polymery způsobují buněčnou agregaci a další toxické reakce buněk. Z toho vyplývá, že kationické polymery jsou mnohem více toxické než polymery anionické, které jsou díky tomu před nimi preferovány.<sup>30</sup>

➤ *Koncentrace polymeru*

Zvyšováním koncentrace polymeru dochází k významnému poklesu adhezivní síly. V koncentrovaném roztoku polymeru se stočené molekuly stávají špatně dostupnými pro rozpouštědlo. Následkem toho se makromolekuly k sobě přiblíží stočené a zmenší se délka řetězce dostupná pro interpenetraci.

➤ *Hodnota pH*

Ukázalo se, že významný vliv na mukoadhezi má také hodnota pH.<sup>30</sup> Hodnota pH ovlivňuje náboj na povrchu hleny i polymeru. Hlen bude mít na svém povrchu rozdílnou hustotu náboje, a to v závislosti na pH. Může za to rozdíl v disociaci funkčních skupin polypeptidové kostry (poloviční podíl sacharidů a poloviční podíl aminokyselin). Robinson a kolektiv zjistili, že hodnota pH média je kritická pro hydrataci lehce zesíťovaných kopolymerů kyseliny polyakrylové. Zdánlivá hodnota pKa polymeru je přibližně 4,7.<sup>31</sup> Maximální hodnota adheze byla zaznamenána při pH 5 a 6. Naopak minimální hodnota adheze byla naměřena při pH 7. Toto chování bylo přisuzováno rozdílu v hustotě nábojů při odlišných hodnotách pH. Proto je hustota náboje hleny i polymeru ovlivněna hodnotou pH, která dále ovlivňuje bioadhezi.

➤ *Hydratace*

Přítomnost fixních nábojů, které vznikají uvnitř makromolekulární sítě polymeru, stanovuje sílu bobtnání či osmotický tlak. Osmotický tlak pohání rozpouštědlo do gelu polymeru z méně koncentrovaného vnějšího roztoku. Přítomnost opačně nabitých iontů redukuje fixní náboje polymeru. Z toho důvodu přítomnost

různých druhů iontů v roztoku polymeru může významně ovlivňovat bioadhezivní sílu. Bobtnání polymeru přispívá k jeho bioadhezivitě.<sup>32</sup> Domněnka, že s postupujícím bobtnáním roste bioadhezivní síla, není pravdivá. Adhezivní síla je optimální pouze při určitém stupni hydratace.<sup>33</sup> Dostatečné množství vody je nezbytné pro hydrataci mukoadheziva. Poté, co je mukoadhezivum vystaveno místu působení za účelem vytváření sekundárních vazeb, v přítomnosti vody bobtná a vytváří gel. Následkem toho vznikají póry dostatečné velikosti a umožní pohyblivost všech flexibilních polymerních řetězců pro interpenetraci. Pokud je stupeň hydratace vysoký, adhezivita se ztrácí. Je to pravděpodobně způsobeno tvorbou neadhezivního slizu v přítomnosti velkého množství vody.

➤ *Obměna vrstvy hlenu*<sup>34</sup>

Obměna vrstvy hlenu je neustále se opakující proces, který limituje dobu setrvání bioadhezivního materiálu na mukózní membráně. V gastrointestinálním traktu závisí doba obměny vrstvy hlenu na přítomnosti potravy.

➤ *Zdravotní stav jedince*

Zdravotní stav jedince může ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti hlenu. Týká se to celé řady onemocnění, například vředové žaludeční choroby, ulcerózní kolitidy, cystické fibrózy, bakteriálních a houbových infekcí, zánětů, ale také běžného nachlazení.

## 4.5. Liberace<sup>22</sup>

O řízené liberaci mluvíme, když je polymer, ať již přírodního nebo syntetického původu, kombinován s léčivem nebo jinou účinnou látkou takovým způsobem, aby účinná látka byla z materiálu uvolňována požadovaným způsobem. Uvolňování účinné látky může být konstantní, cyklické, nebo může být vyvoláno prostředím či dalšími vnějšími vlivy. V každém případě, účelem terapeutického systému je dosáhnout efektivnější terapie a eliminovat možnost poddávkování i předávkování. Mezi další výhody používání terapeutických systémů můžeme zařadit udržování plazmatické koncentrace během požadovaného období, dále potřebu méně častého podávání, optimální užití léku a zvýšení compliance pacienta. I přes četné výhody těchto systémů, bychom neměli opomíjet potenciální nevýhody, jako jsou možná toxicita, nebiokompatibilita použitého materiálu, toxické produkty degradace, požadavek chirurgického zákroku k implantaci nebo odstranění terapeutického systému, možnost dyskomfortu ze strany pacienta a vyšší cena v porovnání s tradičními farmaceutickými přípravky.

Systémy s řízenou liberací léčiv mohou být velice důležité v situacích, kdy tradiční perorální nebo injekční léčivé přípravky nemohou být použity. Jedná se například o situace vyžadující pomalé uvolňování hydrofilních léčiv, rychlejší uvolňování hydrofobních léčiv, targeting léčiv na specifické místo, targeting léčiv využívajících systém nanočástic nebo dvou či více účinných látek, systémy založené na nosičích, které se mohou rozpouštět nebo odbourávat a být tak rychle eliminovány.

Ideální terapeutický systém by měl být inertní, biokompatibilní, mechanicky odolný, komfortní pro pacienta a bezpečný z hlediska náhodného uvolňování. Dále by měl být podáván a odstraňován z organismu přirozenou cestou. Jeho výroba a sterilizace by měla být nenáročná.

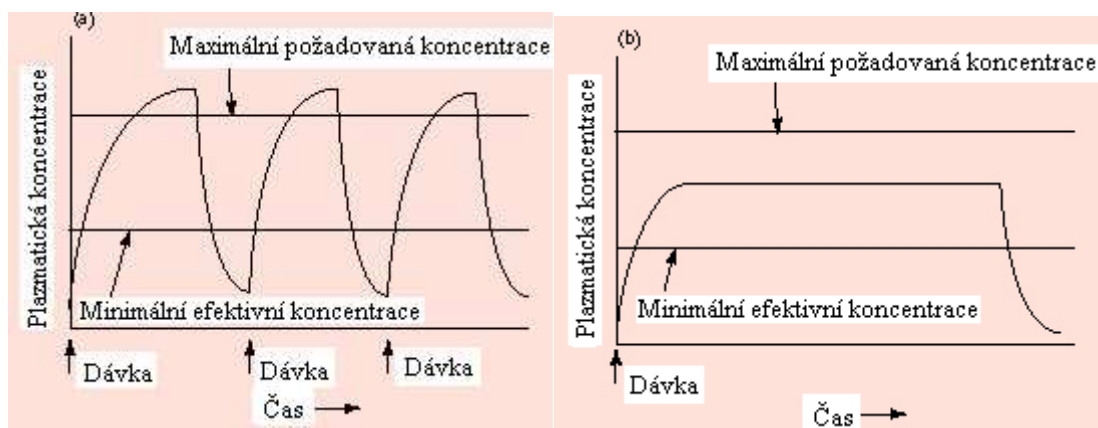
Terapeutické systémy s řízeným uvolňováním léčiv byly vytvořeny s cílem dosáhnout takového profilu liberace, aby zajistily vysokou plazmatickou koncentraci léku po delší časový úsek. S tradičními lékovými formami (např. tablety nebo injekce) to není možné, neboť koncentrace stoupá po každé aplikaci léku a klesá do té doby, než dojde k další aplikaci (viz obr. 3a). Konvenční perorální a intravenózní způsoby podání léku tedy neposkytují ideální farmakokinetické profily, zvláště u léků s prokázanou vysokou toxicitou a/nebo úzkým terapeutickým okénkem.



U terapeutických systémů s řízeným uvolňováním léčiv, navržených pro podávání léku v delších časových intervalech, je hladina léku v krvi konstantní po dostatečně dlouhou dobu, dokud se nedocílí požadovaného terapeutického efektu (viz obr. 3b). V závislosti na lékové formě a aplikaci, se tato doba pohybuje někde v rozmezí od 24 hodin po dobu jednoho měsíce až pěti let.

Současné terapeutické systémy léčiv mohou (kromě schopnosti prodloužení doby uvolňování léčivé látky) reagovat na změny v biologickém prostředí a nasměrovat nebo zastavit targeting léků na základě těchto změn. Materiály jsou vyvinuté tak, aby mohly být použité v cílených terapeutických systémech, kde jednotlivé léčivé přípravky mohou být nasměrovány ke konkrétní buňce, tkáni nebo místu působení.

**Obr. 3:** Závislost plazmatické koncentrace léčiva na čase:<sup>22</sup>



**a)** tradiční terapeutické systémy

**b)** řízené terapeutické systémy

Rozlišujeme 3 primární mechanismy, kterými mohou být účinné látky uvolňovány z polymeru: difúze, degradace a bobtnání následované difúzí. Mohou se vyskytovat všechny najednou nebo jen některý z těchto mechanismů.

Difúze nastává, pokud léčivo nebo jiná účinná látka prochází přes polymerní matici. K difúzi může docházet na makroskopické úrovni (skrz póry v matici polymeru) nebo na molekulární úrovni (mezi řetězci polymerů).

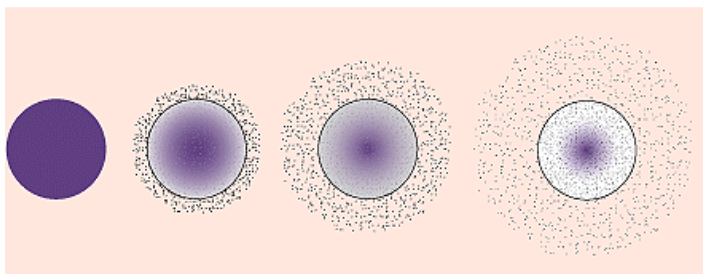
K degradaci polymerů dochází enzymatickým rozkladem, hydrolýzou (objemová, povrchová) nebo jejich kombinací.

Pro dané léčivo, je kinetika liberace z polymerní matrice řízena převážně třemi faktory: typem polymeru, morfologií polymeru a použitými pomocnými látkami.

#### 4.5.1. Difúzně řízené terapeutické systémy

U difúzně řízených systémů, je implantát v podstatě stabilní v biologickém prostředí a nemění svůj rozměr bobtnáním ani degradací. Druh polymeru a pomocných látek je volen s ohledem na použité léčivo tak, aby bylo možné jeho rozptýlení póry či makromolekulární strukturou implantátu.

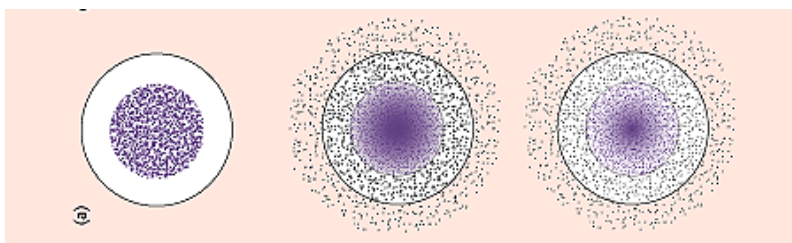
Matricový terapeutický systém: polymer a léčivo byly smíseny, aby vytvořily homogenní soustavu označovanou také jako matricový systém. K difúzi dochází, když léčivo prochází polymerní maticí do vnějšího prostředí. S postupem liberace se koncentrace léčiva snižuje, léčivo dosahuje větší vzdálenosti, a proto potřebuje k uvolnění delší difúzní čas.



**Obr. 4:** Liberace léčiva z typického matricového systému v závislosti na čase.<sup>22</sup>

Rezervoárový terapeutický systém: U rezervoárových systémů může být rychlost uvolňování léčiva konstantní. Rezervoár – ať již pevná látka, zředěný roztok nebo vysoce koncentrovaný roztok léčiva uvnitř polymerní matrix – je obklopený filmem či membránou z materiálu regulujícího rychlost liberace. Vrstva polymeru obklopující rezervoár je jedinou strukturou efektivně limitující liberaci léčiva. Protože tento polymerní obal je v podstatě jednotný a má neměnnou tloušťku, rychlost difúze léčiva může být udržována po celou dobu existence systému konstantní.

**Obr. 5:** Liberace léčiva z typického rezervoárového systému.<sup>22</sup>



a) implantáty či perorální systémy

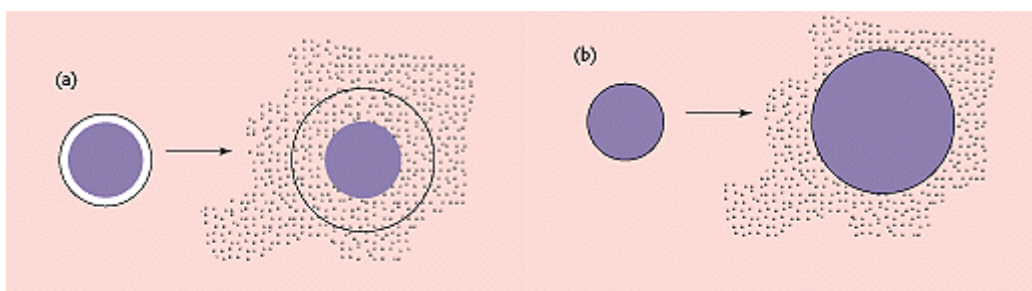


**b)** transdermální systémy (léčivo se uvolňuje pouze z jedné strany)

#### 4.5.2. Terapeutické systémy citlivé na změny prostředí (řízené bobtnáním)

Některé systémy mohou být navrženy tak, že jsou schopné uvolnit léčivou látku až po umístění do vhodného biologického prostředí. Tyto systémy jsou zpočátku suché. Teprve po vložení do těla dochází k absorpci vody či jiné tělní tekutiny a systém začíná bobtnat. Přes nabobtnalou síť polymeru je umožněna difúze léčiva do vnějšího prostředí. Většina materiálů, používaných v těchto systémech řízených bobtnáním, je založená na hydrogelech. Jedná se o polymery, které pokud jsou umístěné ve vodě nebo jiných biologických tekutinách, mají schopnost bobtnat, aniž by došlo k jejich rozpouštění. Tyto hydrogely mohou absorbovat velké množství tekutiny (60 – 90%).

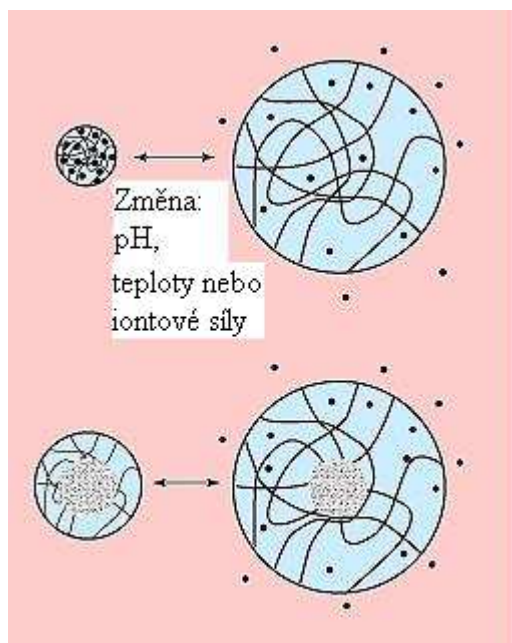
**Obr. 6:** Targeting léčiv z terapeutického systému řízeného bobtnáním.<sup>22</sup>



**a)** rezervoár

**b)** matrice

Nabobtnání polymeru či jeho zmenšení může být vyvoláno například změnou hodnoty pH, teploty, či iontovou silou. Některé z těchto hydrogelových materiálů citlivých na změnu prostředí jsou uvedené v tabulce 2. Pro většinu těchto polymerů, jsou strukturální změny reverzibilní. Obr. 7 ilustruje základní změny ve struktuře těchto terapeutických systémů. Pro perorální podání je ideální použití systémů, kdy léčivo není uvolňováno při nízkých hodnotách pH v žaludku, ale spíše při vysokých hodnotách pH v horním úseku tenkého střeva (k bobtnání polymerů dochází při vysokých hodnotách pH).



**Obr. 7:** Targeting léčiv z terapeutických systémů citlivých na změny prostředí.<sup>22</sup>

**Tab. 2:** Polymery citlivé na změny prostředí určené pro targeting léčiv:<sup>35</sup>

<b>Podnět</b>	<b>Hydrogel</b>	<b>Mechanismus</b>
pH	Acidický nebo bazický hydrogel	Změna pH → bobtnání → uvolnění léčiva
Iontová síla	Ionogenní hydrogel	Změna iontové síly → změna koncentrace iontů uvnitř gelu → změna bobtnání → uvolnění léčiva
Chemická látka	Hydrogel obsahující elektron – akceptorové skupiny	Sloučeniny poskytující elektrony → vytváření náboj/transferového komplexu → změna bobtnání → uvolnění léčiva
Enzymový substrát	Hydrogel obsahující imobilizované enzymy	Přítomnost substrátu → enzymatická přeměna → produkt mění bobtnání gelu → uvolnění léčiva
Magnetický	Magnetické částice dispergované v alginátových mikrosférách	Aplikace magnetického pole → změna pórů v gelu → změna bobtnání → uvolnění léčiva
Tepelný	Tepelně citlivý hydrogel poly(N-isopropylakrylamid)	Změna teploty → změna interakcí polymer – polymer a voda – polymer → změna bobtnání → uvolnění léčiva
Elektrický	Polyelektrolytový hydrogel	Aplikace el. pole → nabití membrány → elektroforéza nabitého léčiva → změna bobtnání → uvolnění léčiva
Ultrazvukové ozařování	Hydrogel ethylen – vinyl alkoholu	Ultrazvukové ozařování → vzrůst teploty → uvolnění léčiva

### 4.5.3. Biodegradabilní terapeutické systémy

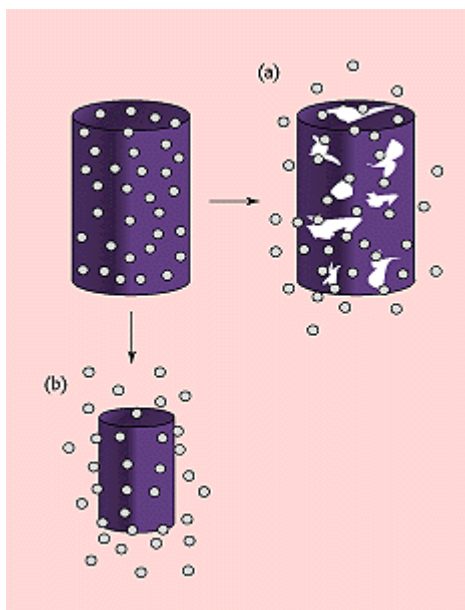
Na rozdíl od výše zmíněných systémů řízených bobtnáním je u biodegradabilních terapeutických systémů uvolňování léčiva zcela závislé na změně chemické struktury. Většina biodegradabilních polymerů je odbourávána hydrolyzou polymerních řetězců za vzniku netoxických (tělu vlastních) monomerů. Příkladem může být degradace polylaktidů, polyglykolidů nebo jejich kopolymerů, při které se polymery nakonec rozpadnou na kyselinu mléčnou a glykolovou. Ty následně vstupují do Krebsova cyklu a jsou dále štěpeny na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , které jsou vyloučeny z organismu.

Degradace může probíhat objemovou hydrolyzou, při níž polymer difunduje stejnoměrným způsobem přes matrici, jak je schematicky znázorněno na obr. 8a. Dalším typem je povrchová degradace, ke které dochází například u polyanhydridů a polyorthoesterů. Degradace nastává pouze na povrchu polymeru, rychlost uvolňování léčiva je úměrná ploše povrchu terapeutického systému (viz obr. 8b).

Biodegradabilní materiály jsou nejčastěji používány ve formě mikročastic, které nalézají využití v perorálních a v subkutánních injekčních terapeutických systémech.

**Obr. 8:** Targeting léčiv z biodegradabilních systémů.<sup>22</sup>

a) objemová eroze, b) povrchová eroze



### **3 klíčové výhody polymerního terapeutického systému:<sup>21</sup>**

#### *1) Lokalizovaný targeting léků*

Terapeutický systém může být implantován přímo na místo, kde je působení léku potřebné a mohou tak být redukovány systémové nežádoucí účinky. Stává se to obzvláště důležité u léků s vysokou toxicitou (např. chemoterapeutika).

#### *2) Prodloužené uvolňování léčiva*

Enkapsulované léčivo je uvolňováno po dostatečně dlouhé období a eliminuje tak potřebu častějšího podávání. Tato vlastnost může zlepšit compliance pacienta, hlavně u léků určených pro léčbu chronických onemocnění (např. nedostatek určitých proteinů vyžadující častější aplikace injekcí).

#### *3) Stabilizace léčiva*

Polymer může ochránit léčivo před fyziologickým prostředím, a tím zlepšit stabilitu in vivo. Tato specifická vlastnost dělá polymery atraktivní pro targeting nestabilních léků (např. proteiny).

## 4.6. Kyselina polyglykolová a polyléčná

Polyglykolová kyselina (PGA), polyléčná kyselina (PLA) a kopolymery kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) nacházejí široké uplatnění jako nosiče v řízených terapeutických systémech léčiv.<sup>36</sup>

S využitím těchto polymerů za účelem pomalého uvolňování léčiv v organismu jsou však spojeny i mnohé problémy. Tyto polymery jsou obecně pomalu hydrolyticky degradovány v kyselém prostředí žaludku, ale na druhou stranu jsou mnohem lépe degradovány v alkalickém prostředí střev.<sup>37</sup>

**PGA** je syntetický, biodegradabilní a termoplastický polyester. Je známa od roku 1954 jako pevný, vlákna tvořící polymer. Její použití bylo zpočátku omezeno kvůli hydrolytické nestabilitě.

### Fyzikální a chemické vlastnosti

Teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) u PGA se uvádí mezi hodnotami 35°C – 40°C a teplota tání ( $T_m$ ) v rozmezí 225°C – 230°C. PGA vykazuje vysoký stupeň krystalinity, okolo 45% – 55%, proto je ve vodě nerozpustná. Rozpustnost tohoto polyesteru je poněkud jedinečná, neboť jeho vysokomolekulární forma je nerozpustná ve většině organických rozpouštědel (aceton, dichlormethan, chloroform, ethylacetát, tetrahydrofuran) s výjimkou vysoce fluorovaných (hexafluoroisopropanol), zatímco nízkomolekulární oligomery se natolik liší ve fyzikálních vlastnostech, že jsou rozpustné více. Vlákna PGA vykazují vysokou pevnost a moduly elasticity.<sup>38</sup>

### Syntéza

Polymer může být syntetizován až poté, co je získáno dostatečné množství monomeru. V případě PGA je monomer získán extrakcí a purifikací z rostlin nebo připraven syntézou v laboratoři.

K syntéze polymerů kyseliny glykolové mohou být použity dvě rozdílné metody. První metodou je polykondenzace kyseliny glykolové. Při kondenzačních reakcích spolu jednotky monomerů reagují za uvolnění malé molekuly, nejčastěji vody. Jelikož kyselina glykolová obsahuje dvě funkční skupiny, které se mohou zúčastnit kondenzační reakce, může sama polymerovat.<sup>39</sup> Polykondenzace glykolové kyseliny je nejjednodušším procesem vhodným k přípravě PGA, ale není nejúčinnější, neboť



poskytuje nízkomolekulární produkt. Nejdříve je glykolová kyselina zahřívána při atmosférickém tlaku a při teplotě okolo 175°C – 185°C, která je udržována po celou dobu destilace. Poté je tlak redukován na 150 mm rtuťového sloupce za konstantní teploty po dobu asi dvou hodin a tím je získána nízkomolekulární PGA. Reakce je charakterizována časným úbytkem monomerů z roztoku a pomalou tvorbou vysokomolekulárních sloučenin.<sup>38</sup> Glykolová kyselina má navíc velkou tendenci cyklodimerizovat na glykolid, čímž kondenzační reakce končí. Díky těmto nevýhodám je upřednostňována druhá metoda přípravy PGA, a to polymerace za otevření kruhu glykolidu (ROP). Polymerace glykolidu, cyklického diesteru kyseliny glykolové, je typicky realizována ve velkém při teplotě 220°C po dobu 4 hodin. To má za následek 96% přeměnu na polymer o molekulové hmotnosti v rozsahu 10<sup>4</sup> – 10<sup>6</sup> daltonů. Výsledným produktem reakce je tedy vysokomolekulární polymer. ROP může být také použita pro tvorbu kopolymerů s ostatními  $\alpha$ -hydroxykyselinami obecného tvaru  $-\text{[O-CH(R)-CO-]}$ . Další metody kopolymerizace zahrnují ABA blokové formace kopolymerů s monoesterovou skupinou polyethylenglykolu nebo mastných kyselin.<sup>39</sup>

## Degradace

Na degradaci PGA se podílí také mechanismy hydrolytické degradace, eroze a bioabsorpce. Hydrolytická degradace je převládajícím mechanismem rozpadu PGA a má za následek ztrátu mechanické síly. Existuje mnoho teorií o hydrolytické degradaci PGA. Tyto teorie mají dvě centrální dogmata. První, kdy amorfní oblast polymeru je rychle degradována, to má za následek významnou ztrátu mechanických vlastností během několika dnů až týdnů. Druhé, kdy krystalická oblast zbývajících fragmentů degraduje mnohem pomaleji, přesto krystalinita zůstává měřitelná až do doby, než dojde ke kompletní degradaci materiálu.

Na základě pozorování a výpočtů rozlišujeme čtyři stádia degradace. První stádium degradačního procesu je charakterizováno homogenní difúzí roztoku do vzorku. Dále také ostrým poklesem teploty skelného přechodu ( $T_g$ ). Druhým stádiem je homogenní hydrolýza. Během tohoto stádia je roztok absorbován a dochází k relativně malým hmotnostním ztrátám. Řetězová hydrolýza redukuje zlomky polymerů ke kritické molekulové hmotnosti, která je ještě schopná difúze z pevné látky. Konec druhého stupně a začátek třetího stupně se vyznačuje významným poklesem lokálního pH. Tento pokles pH je funkcí difúze oligomeru z kostry polymeru. Během

čtvrtého stádia zůstávají pouze malé krystalické fragmenty, stádium je zakončeno odstraněním stop PGA.<sup>39</sup>

Švy z PGA ztrácí asi 50% své pevnosti po dvou týdnech a 100% za 4 týdny, k úplné absorpci dochází během 4 - 6 měsíců.<sup>23</sup>

**PLA** je biodegradabilní, termoplastický, alifatický polyester, který se získává z obnovitelných přírodních zdrojů (kukuřice, cukrová třtina).<sup>40</sup> Laktid je cyklický dimer mléčné kyseliny, který existuje ve dvou optických izomerech, D a L. L-laktid je přirozeně se vyskytující izomer a D,L-laktid je syntetická směs D-laktidu a L-laktidu. L-PLA je semikrystalický polymer. D,L-PLA je amorfní polymer skládající se z obou izomerních forem mléčné kyseliny, a tudíž není schopen utvořit organizovanou krystalickou strukturu.

### **Fyzikální a chemické vlastnosti**

L-PLA má stupeň krystalinity okolo 37%, teplotu tání ( $T_m$ ) v rozmezí 175°C – 178°C a teplotu skelného přechodu ( $T_g$ ) 60°C – 65°C. Rychlost degradace L-PLA je mnohem nižší než u D,L-PLA, a aby došlo ke kompletní absorpci, je potřeba alespoň dvou let.<sup>23</sup>

### **Syntéza PLA polymerů**

Primárním prekurzorem těchto polymerů je mléčná kyselina. Většina mléčné kyseliny je vyráběna fermentací. Existují dvě hlavní cesty přípravy polymerů odvozených od mléčné kyseliny: polykondenzace samotných enantiomerů kyseliny mléčné nebo jejich polykondenzace spolu s dalšími hydroxykyselinami, nebo polymerace za otevření kruhu laktidu, cyklického dimeru. PLA homopolymery získané polykondenzací jsou nízkomolekulární. K získání vysokomolekulárních řetězců je nejučinnější cestou polymerace za otevření kruhu (ROP) laktidů, cyklických dimerů mléčné kyseliny. Díky jejich dimerické struktuře a přítomnosti dvou chirálních center, existují rozdílné diastereoizomery laktidu.<sup>41</sup>

### **Degradace PLA polymerů**

Pokud je terapeutický systém vyrobený z polymeru kyseliny mléčné umístěn do vodného prostředí, absorbuje vodu a nastává hydrolytické štěpení esterových vazeb a také autokatalýza. Absorpce vody je tedy kritickým faktorem. Po určitou dobu zůstanou

částečně degradované makromolekuly nerozpustné v okolním vodném prostředí, a degradace probíhá homogenně. Jakmile molekulová hmotnost některé z částečně degradovaných makromolekul poklesne natolik, že dochází k rozpouštění vytvořených oligomerů, začíná difúze těchto oligomerů uvnitř celého objemu.

Tento proces, který kombinuje difúzi, chemickou reakci a disoluci, má za následek rozdíl mezi poměrem rychlostí povrchové a objemové degradace. V prostředí pufrů dochází k neutralizaci koncových karboxylů, což může přispět ke snížení rychlosti povrchové degradace.

Mechanismus heterogenní degradace poskytuje informaci o chování polymerů kyseliny mléčné, u kterých jsou přítomná aditiva či další molekuly (oligomery, léčivo, iniciátor a zbytky rozpouštědla). Můžeme zmínit případ léčiva inkorporovaného v PLA terapeutickém systému, nebo když implantovaná matrix absorbuje sloučeniny z tělní tekutiny. Každá elektrostatická interakce mezi matrix PLA a acidickými, bazickými nebo amfoterními molekulami může výrazně ovlivnit charakteristické rysy degradace, a to změnou přirozené acidobazické rovnováhy díky přítomnosti koncových karboxylových skupin. U sloučenin acidické povahy můžeme očekávat rychlejší hydrolyzu esterových vazeb. Na rozdíl od toho, v případě bazických sloučenin, mohou být pozorovány dva efekty: katalytické štěpení esterových vazeb, pokud je v nadbytku bazická sloučenina, a to s ohledem na karboxylové konce řetězců a naopak pokles rychlosti degradace. Bylo prokázáno, že u menšího polymeru je pomalejší degradační rychlost. Také, že pórovité systémy degradují pomaleji než normální systémy.

Degradace matric odvozených od kyseliny mléčné a uvolnění nízkomolekulárních sloučenin z těchto matric závisí mnohem více na experimentálních podmínkách než jiné typy polymerní matrix. Koncept heterogenní degradace ve vodném prostředí pomáhá porozumět in vivo chování PLA polymerů.<sup>41</sup>

**PLGA** je syntetický kopolymer kyseliny mléčné ( $\alpha$ -hydroxypropanové) a glykolové (hydroxyetanové). Kyselina mléčná obsahuje asymetrický (chirální) uhlík, a proto existuje ve dvou optických izomerech: l(+) mléčná kyselina a d(-) mléčná kyselina. Kyselina mléčná je v přírodě přítomna buď jako meziprodukt, nebo konečný produkt metabolismu sacharidů. Je široce rozšířena u všech živých organismů (člověka, zvířat, rostlin a mikroorganismů). Kyselina glykolová se v přírodě vyskytuje omezeně. PLGA našla rozsáhlé uplatnění v medicíně díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě, snadné regulaci vlastností a jednoduchosti zpracování.<sup>42</sup>

### **Fyzikální a chemické vlastnosti**

Nespornou výhodou PLGA kopolymerů je, že mohou být navrženy tak, aby získaly požadované specifické vlastnosti. Široké spektrum technických vlastností může být získáno obměnou tří klíčových vlastností kopolymeru: složení (poměr laktid/glykolid), stereoizomerní složení laktidu (L- nebo D,L-laktid) a molekulová hmotnost.

#### ➤ *Rozpustnost*

Rozpustnost v běžných organických rozpouštědlech je důležitá pro snadnější charakteristiku polymeru, jeho zpracování a aplikaci. PLGA obsahující méně než 50% jednotek kyseliny glykolové je rozpustná v nejběžnějších organických rozpouštědlech, jako jsou například halogenované uhlovodíky (chloroform a dichlormethan), ethylacetát, aceton, dioxan a tetrahydrofuran. PLGA obsahující 50% a více jednotek kyseliny glykolové je ve většině organických rozpouštědel nerozpustná, proto jsou pro charakteristiku a zpracování těchto polymerů používána neobvyklá rozpouštědla (např. hexafluoroisopropanol).

#### ➤ *Krystalinita*

Krystalinita ovlivňuje rychlost degradace a mechanické vlastnosti PLGA. Krystalinita PLGA závisí na chemickém složení (poměr laktid/glykolid) a stereoizomerním složení jednotek kyseliny mléčné v kopolymeru. PLGA skládající se z 0% – 75% jednotek kyseliny glykolové je amorfni. Krystalinita, teplota skelného přechodu a bod tání PLGA kopolymerů jsou uvedeny v tabulce 1.

#### ➤ *Teplotní stabilita*

PLGA kopolymery jsou termoplastické materiály, které vykazují adekvátní tepelnou stabilitu za nepřítomnosti vlhkosti. Díky této vlastnosti mohou být roztavením zpracovány na výrobu švů, ortopedických fixací a terapeutických systémů.

PLGA degraduje na laktid a glykolid poté, co je delší dobu vystavena teplotě nad 200°C za přítomnosti dusíku nebo vakua. Při nižších teplotách je tepelná degradace funkcí času a teploty a je podstatně urychlena nečistotami, residuálními monomery a vlhkostí.

➤ *Mechanické vlastnosti*

Mechanické vlastnosti (síla, pevnost a pružnost) PLGA závisí na chemickém složení (poměr laktid/glykolid), stereochemii laktidu, molekulové hmotnosti a zpracování. Krystalické polymery, jako jsou poly(L-laktid) a polyglykolid, vykazují významně vyšší mechanickou sílu než amorfni poly(DL-laktid) a amorfni nebo méně krystalická PLGA.<sup>42</sup>

### **Syntéza PLGA**

PLGA může být připravena přímou polykondenzací kyseliny mléčné a glykolové. Polykondenzační reakce může probíhat v roztoku nebo v roztaveném/pevném stavu. Avšak je obtížné dosáhnout tak vysokého stupně dehydratace, který je požadován pro produkci vysokomolekulárních polymerů, že polykondenzace v pevném stavu je považována za nevhodnou metodu. Co se týká polykondenzace v roztoku, tak rozpouštědla představují komplikace, jak ze strany kontroly procesu, tak čištění konečného produktu. Proto je preferována polykondenzace probíhající v roztaveném stavu. Systém polykondenzace v roztaveném stavu zahrnuje dva rovnovážné stavy:

- dehydratace/hydratace esterové vazby
- kruhové/řetězové uspořádání

Při běžné polykondenzaci v roztaveném stavu dochází k depolymeraci, neboť reakční podmínky jako je vysoká teplota a vakuum mohou navodit dehydrataci a tvorbu cyklických diesterů. Tím se brání dalšímu růstu polymerního řetězce a nemůže tak být získán vysokomolekulární polymer. Kvůli tomuto problému volíme polykondenzační metodu v roztaveném/pevném stavu, kdy v prvním kroku jsou připraveny oligomery dehydratací monomerů a v druhém kroku jsou polymerovány za podmínek vakua a použití katalyzátorů. Dále za podmínek vysokého vakua kondenzace pokračuje a vzniká pevný stav, má se za to, že v tuto chvíli polymerační reakce převažuje nad depolymerací či jinými vedlejšími reakcemi.

Při polykondenzační metodě v roztaveném/pevném stavu mohou být získány vysokomolekulární polymery srovnatelné s polymery, které se připravují polymerací za otevření kruhu cyklických diesterů.

Metodu polymerace za otevření kruhu cyklických diesterů laktidu a glykolidu je nezbytné volit v případě, kdy potřebujeme připravit vysokomolekulární PLGA v relativně krátkém reakčním čase. Laktidy a glykolidy jsou připraveny tepelnou degradací oligomerů kyseliny mléčné a glykolové, a jsou komerčně dostupné. Polymerační reakce za otevření kruhu může být provedena při teplotách vyšších než je bod tání polymeru (polymerace v roztaveném stavu), nebo při teplotách nižších než je bod tání polymeru (polymerace v pevném stavu), nebo v roztoku. Vysokomolekulární polymery mohou být syntetizovány za použití různých katalyzátorů jako je práškový zinek, Lewisovy kyseliny nebo organokovové sloučeniny (např. octan cínatý). Iniciační reakce zahrnuje nukleofilní atak katalyzátorů na jednu z karbonylových skupin laktidu nebo glykolidu vedoucí k otevření kruhu a tvorbě aktivních forem, aby vytvořily polymerní řetězec. PLGA získaná polymerací za otevření kruhu je přesněji označovaná jako poly(laktid-co-glykolid). Používáním rozdílných směsí stereoizomerů laktidu a stereokopolymerů (PLA a PLGA polymery obsahující jednotky L- a D-mléčné kyseliny) mohou být syntetizovány polymery s rozdílnými fyzikálními a biologickými vlastnostmi.<sup>42</sup>

## Degradace

PLGA degraduje in vitro hydrolyzou esterových vazeb a finálními produkty jsou kyselina mléčná a glykolová. Degradaci PLGA lze rozdělit do dvou stupňů. Během prvního stupně dochází k náhodnému hydrolytickému štěpení esterových vazeb, které vede k redukci molekulové hmotnosti. Proces štěpení řetězců je kinetiky 1. řádu (rychlost závisí na okamžité koncentraci výchozí látky a s časem klesá). Druhý stupeň je charakterizován výrazným úbytkem hmoty polymerní matrice a je doprovázen zvýšenou rychlostí řetězového štěpení. Váhový úbytek začíná, když polymer degraduje na úroveň, kdy fragmenty řetězců jsou natolik malé, že dochází k jejich rozpouštění v degradačním médiu a k difúzi z polymerní matrice. Neboť esterifikace koncových karboxylových kyselin, za účelem redukce jejich počáteční koncentrace, ukázala, že zpomaluje degradaci, je rozštěpení řetězců způsobeno autokatalýzou koncových karboxylových skupin.

Původně byla hydrolytická degradace považována za homogenní proces (objemová eroze). Ale nakonec se ukázalo, že degradace PLGA (jak in vitro, tak in vivo) je procesem heterogenním, neboť k degradaci jádra dochází rychleji než k povrchové erozi.<sup>42</sup> Vert a jeho spolupracovníci představili koncept heterogenní

degradace PLGA související s fenoménem: difúze – reakce – disoluce, rozpustné oligomery, které nakonec vznikají v průběhu degradace polymeru, se mohou uvolňovat rychleji z povrchu než z vnitřku matrix, to má za následek menší autokatalytický efekt vyčerpáním karboxylových skupin a následně nižší degradační rychlost na povrchu než uvnitř matrix. Podle modelu difúze – reakce – disoluce, u relativně velkých PLA systémů, které degradují heterogenním mechanismem, dochází k rychlejší degradaci než u relativně malých PLA systémů, které degradují homogenním mechanismem.<sup>43</sup>

In vivo degradace PLGA pokračuje hydrolýzou esterových vazeb jako in vitro degradace. V průběhu počátečních stádií degradace může dojít k nežádoucí reakci organismu, kdy dochází ke kumulaci buněk kolem polymerního implantátu, buňky mohou produkovat volné radikály a kyselé produkty a urychlit hydrolýzu polymeru. Enzymově katalyzovaná PLGA degradace in vivo a in vitro vykazuje rozdíly. Degradace in vitro je urychlena enzymy, zatímco u in vivo degradace se enzymová hydrolýza neprokázala. Nejen enzymy tělu vlastní mohou ovlivnit PLGA degradaci. Jevy jako absorpce proteinů, lipidů a větší rozpustnost PLGA oligomerů v krvi mohou být zdroji rozdílů mezi in vitro a in vivo degradací. V případě pokročilé degradace ztrácí implantát soudržnost a začíná se rozpadat matrix polymeru, a živé tkáně se aktivně podílí na další degradaci. Dostatečně malé fragmenty jsou pohlceny fagocyty, konečnými produkty hydrolýzy jsou laktát a glykolát. Konečným stádiem in vivo degradace je eliminace, kdy je L-laktát konvertován na CO<sub>2</sub> a pyruvát, který vstupuje do Krebsova cyklu. D-laktát není metabolizován a je detekován pouze v exkretách. Glykolát je vyloučen přímo do moči nebo oxidován na glyoxylát, který je dále přeměněn na glycin, serin a pyruvát. Pyruvát pak může vstoupit do Krebsova cyklu.

*Faktory ovlivňující rychlost degradace PLGA jsou následující:*

- charakteristika polymeru: chemické složení (poměr laktid/glykolid), zastoupení monomerů, chemické složení koncových skupin, molekulová hmotnost, distribuce molekulové hmotnosti, čistota polymeru (reziduální monomery)
- charakteristika terapeutického systému: velikost, tvar, porozita a přítomnost přísad (např. acidických nebo bazických sloučenin, plastifikátorů nebo léčiv)
- zpracování tavením, chlazení/temperování a sterilizace
- prostředí, ve kterém se degradace uskutečňuje: místo implantace v organismu, pH a teplota

Chemické složení a stereoizomerie laktidu patří mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují degradaci PLGA. Na degradaci PLGA má vliv i hydrofilita a krystalinita

polymeru.<sup>42</sup> Miller, Brady a Cutright zjistili, že PLGA (50:50) degraduje nejrychleji, degradační rychlost klesá se zvyšováním obsahu laktidu nebo glykolidu v kopolymeru.<sup>44</sup> Vliv chemického složení na degradaci PLGA může být vysvětlen také na základě hydrofility a krystalinity kopolymeru. Zvyšováním hydrofility roste degradační rychlost PLGA, zatímco se vzrůstající krystalinitou klesá. Hydrofilita roste se vzrůstajícím podílem hydrofilnějšího glykolidu v kopolymeru a krystalinita roste s podílem jednotek glykolidu nebo L-laktidu nad 75%. Navíc, vazby glykolidu jsou hydrolyzovány rychleji než vazby laktidu a to může přispět k urychlení degradace. Děje se tak pouze se zvyšováním obsahu glykolidu od 0% - 50%. Nicméně s dalším zvyšováním obsahu glykolidu, krystalinita kopolymeru stoupá a převažuje její vliv na degradaci nad hydrofilitou. Díky změně poměru laktid/glykolid a stereoizomerii laktidu, se pohybuje doba degradace těchto polymerů od několika týdnů až po dobu dvou let.

Nejen podíl monomeru, ale také uspořádání dvou monomerů v kopolymeru může ovlivnit degradaci PLGA kopolymerů obsahujících převážně jednotky glykolidu. Jelikož je glykolid více reaktivní než laktid, kopolymery budou spíše obsahovat bloky jednotek glykolidu než náhodnou sekvenci glykolid a laktid. Při stejném podílu monomerů, se u kopolymerů s homogenní strukturou očekává rychlejší degradace než u kopolymerů s heterogenní strukturou.

Doba degradace polylaktid-co-glykolidu se zvyšuje s průměrnou molekulovou hmotností ( $M_w$ ) kopolymeru. Bez ohledu na průměrnou  $M_w$ , distribuce  $M_w$  může také ovlivnit degradaci PLGA. Široká distribuce  $M_w$  signalizuje přítomnost relativně velkého počtu koncových karboxylových skupin, které mohou usnadnit autokatalytickou degradaci polymerních řetězců. Chemické složení koncových řetězců by mohlo významně ovlivnit degradaci PLGA a závisí na typu katalyzátoru/iniciátoru použitého při polymerizaci, ale může být také modifikováno po přípravě PLGA.

Například se udává, že octan cínatý je příčinou modifikace koncového řetězce esterifikací alkoholových koncových skupin kyselinou oktanovou a vytváří se hydrofobní rezidua. Takové modifikace nenastanou se zinkem nebo laktátem zinečnatým jako iniciátory, a následkem toho, tyto iniciátory poskytují PLGA polymery s rozdílnými fyzikálně-chemickými a degradačními vlastnostmi, ve srovnání s octanem cínatým.<sup>42</sup>



## 4.7. Plastifikátory

Primární funkcí plastifikátorů je zlepšit flexibilitu a zpracovatelnost polymerů. Plastifikátory jsou sloučeniny, které vytvářejí sekundární vazby s polymerními řetězci a tím je od sebe oddalují. Tímto způsobem plastifikátory redukují řetězec polymer - polymer sekundárními vazbami a poskytují makromolekulám větší pohyblivost, výsledkem je měkčí, snadněji deformovatelná hmota. Plastifikátory jsou inkorporovány v amorfních částech polymerů, zatímco struktura a velikost krystalické části zůstává nezměněná. Předpokládá se, že plastifikátory redukují moduly elasticity, tažnou sílu, tvrdost, hustotu, viskozitu v roztaveném stavu, teplotu skelného přechodu, elektrostatický náboj a vnitřní odpor polymeru, a zároveň zvyšují jeho flexibilitu, prodloužení v lomu, tuhost, dielektrickou konstantu a faktor síly.

Ideální plastifikátory by měly být vysoce kompatibilní s polymery, stabilní při vysokých i nízkých teplotách prostředí, dostatečně zvlhčující v širokém rozsahu teplot, odolné vůči slunečnímu ultrafialovému (UV) záření, rezistentní vůči migraci a vyluhování, levné a měly by splňovat bezpečnostní a zdravotní předpisy.

Současný trh nabízí početný sortiment plastifikátorů s řadou vlastností, které mohou být vybírány pro konkrétní aplikace, aby splnily kritické potřeby materiálu.

Plastifikátory mohou být buď vnitřní, nebo vnější. Molekuly vnějších plastifikátorů nejsou vázány s polymerními řetězci primárními vazbami, a proto může dojít k jejich ztrátě odpařením, migrací nebo extrakcí. Na druhou stranu, vnitřní plastifikátory jsou přirozenou součástí polymeru a zůstávají též součástí produktu.

Plastifikátory mohou být také rozděleny na primární a sekundární. Primární plastifikátory jsou používány výhradně jako plastifikátor nebo jako hlavní složka plastifikátoru. Sekundární plastifikátory jsou typicky míchány s primárními, aby zlepšily některé jejich vlastnosti a/nebo zajistily nižší cenu.<sup>45</sup>

Dále plastifikátory dělíme na ve vodě rozpustné a nerozpustné. Mezi plastifikátory ve vodě rozpustné řadíme například triethylcitrát a triacetin. Acetyltriethylcitrát, acetyltributylcitrát, dibutylftalát, dibutylsebakát, diethylftalát a tributylcitrát jsou příklady ve vodě nerozpustných plastifikátorů.<sup>46</sup>

Koncept plastifikátorů byl poprvé představen koncem 19. století. Výrobci celuloidu (filmu) nebo celuloidových laků nejdříve používaly pro účely plastifikace kafr a ricinový olej, ale ty byly nedostatečné. Objev triphenylfosfátu v roce 1912, později

používaného jako náhrada kafrového oleje, byl významným přelomem, který odstartoval éru esterových plastifikátorů. Nejdůležitějším produktem, který byl výsledkem tohoto raného objevu, je trikresylfosfát. Ten se stále ještě dodnes používá. Tributylfosfát byl po určité období považován za derivát celulosy, ale nakonec byl nahrazen méně těkavými produkty. Zároveň byly vyvinuty acetáty glycerinu, ale díky jejich těkavosti dopadly stejně jako tributylfosfát. Estery kyseliny ftalové našly uplatnění jako plastifikátory poprvé v roce 1920 a ve 21. století se staly největší skupinou plastifikátorů. Dibutylftalát (DBP) získal dominantní postavení mezi plastifikátory a udržel si ho po dobu mnoha let až dodnes, platí to i pro disperze polyvinylacetátu. Di(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP) byl na trh uveden v roce 1930 a stal se nejpoužívanějším plastifikátorem od roku 1930.

Legislativa v potravinářském průmyslu, zdraví a bezpečnost práce a komerční aspekty vedly k rozvoji obrovské řady v současné době dostupných plastifikátorů. Původně bylo k dispozici několik esterů mastných kyselin, benzoáty, vínany a chlorované uhlovodíky, které splňovaly nové bezpečnostní předpisy. Brzy poté byly syntetizovány estery kyseliny adipové, azelaové a sebakové. Velké množství vysoce výkonných plastifikátorů je nyní produkováno systematickou esterifikací alifatických nebo aromatických karboxylových kyselin.

Mezi nejfrekventovanější plastifikované polymery patří PVC, poly(vinylbutyral) neboli PVB, polyvinylacetát neboli PVA, akryláty, deriváty celulosy, nylon, polyamidy a některé kopolyamidy. Stupeň plastifikace polymerů je z velké části závislý na chemické struktuře plastifikátoru, která zahrnuje chemické složení, molekulovou hmotnost a funkční skupiny. Plastifikátory s nízkou molekulovou hmotností a malým počtem polárních skupin všeobecně poskytují vyšší flexibilitu a plastifikaci. Plastifikátory jsou vybírány na základě následujících kritérií:

- kompatibilita plastifikátoru s daným polymerem
- charakteristické rysy výroby
- požadované tepelné, elektrické a mechanické vlastnosti konečného produktu
- odolnost vůči vodě, chemikáliím, slunečnímu záření, zvětrávání, nečistotám, mikroorganismům
- vliv plastifikátoru na reologické vlastnosti polymeru
- toxicita
- cena

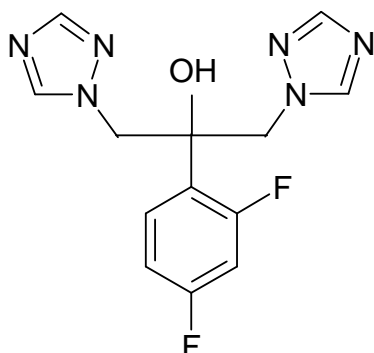
Celosvětově nejběžněji používanými plastifikátory jsou estery kyseliny ftalové (např. DEHP, diisodecylftalát neboli DIDP, diisotridecylftalát neboli DITDP a diisononylftalát neboli DINP). Ftaláty tvoří 92% celosvětově vyprodukovaných plastifikátorů a DEHP představuje 51% ftalátů.

Fosfáty patří mezi nejdříve známé PVC plastifikátory. Jsou méně hořlavé než ftaláty, pravděpodobně díky tomu, že jsou tvořeny kondenzačními reakcemi za tepla polyfosforečnými kyselinami. V závislosti na jejich základní molekulární struktuře, mohou být estery fosfátů seskupeny do tří hlavních kategorií: trialkyl, triaryl a alkyl/aryl fosfáty. Na trhu je vedle ftalátů a fosfátů ještě několik tříd komerčně dostupných plastifikátorů, které nabízejí další vlastnosti polymerním materiálům.

Estery alifatických dikarboxylových kyselin (adipáty, azeláty, sebakáty) mají vysokou schopnost plastifikace PVC a PVA a poskytují vynikající nízkou teplotní flexibilitu. Nicméně jsou účinné pouze v úzkém rozsahu  $M_w$ . Tyto typy esterů s  $M_w$  300-350 mají sklon být příliš nestálé pro mnoho aplikací, zatímco s  $M_w$  nad 400 jsou inkompatibilní s polymery. Estery monokarboxylových kyselin a polyolů vykazují také dobré vlastnosti plastifikace. Epoxidované estery mastných kyselin byly používány jako plastifikátory a také jako stabilizátory pro PVC, a to díky jejich schopnosti vytvářet vazby s chlorovodíkem, který se vytváří při rozkládání PVC. Trimelitáty, nasycená kyselina sulfonová a fenylestery, polyestery, chlorované uhlovodíky, estery alifatických/aromatických monokarboxylových kyselin jako jsou benzoáty a různé elastomery byly také po dlouhé období používány jako plastifikátory.

Vývoj plastifikátorů pokračuje s požadavkem speciálních aplikací. Tento vývoj byl nedávno zahrnut díky sporům ohledně bezpečnosti mnoha tradičních plastifikátorů. To vedlo k postupnému vývoji nových plastifikátorů zahrnujících estery kyseliny citronové, oligomerní a polymerní plastifikátory, epoxidované sojové oleje, PVC/EVA (ethylenvinylacetát) roubované polymery a terpolymery. K dispozici je celá řada plastifikátorů v závislosti na procesu výroby a požadavcích na použití konečného produktu.<sup>45</sup>

## 4.8. Léčiva použitá v experimentální části



**Obr. 9:** Vzorec flukonazolu

**Flukonazol** patří do skupiny antimykotik (antifungální látky), které působí specificky na houbové organismy (kvasinky a vláknité houby). Je to látka syntetického původu a je řazena mezi deriváty triazolu. Do klinické praxe byl zaveden v roce 1989. Používá se v terapii jak povrchových, tak především systémových mykóz.<sup>47</sup> Je prokázáno, že flukonazol je velmi bezpečným léčivem a přínos u něj převažuje nad rizikem.<sup>48</sup> Nevýhodou ale je, že má pouze fungistatický účinek a může se na něj při dlouhodobém podávání vyvinout rezistence.<sup>47</sup> Farmakologická aktivita je vázaná na přítomnost aromatického pětičlenného heterocyklu (triazolu). Mechanismem účinku se flukonazol řadí mezi inhibitory syntézy ergosterolu (základní složka plazmatické membrány houbové buňky), který prostřednictvím fluidity membrány ovlivňuje její funkčnost. Flukonazol vstupuje do buňky a ve fázi demethylace ergosterolu selektivně inhibuje enzym cytochrom P-450 14 $\alpha$ -demethylázu, který se podílí na přeměně lanosterolu na ergosterol. Vazby na atom železa (součást enzymu) se účastní atomy dusíku heterocyklu. To má za následek ukládání sterolu nesoucího na C14 methylovou skupinu, tedy změnu složení plazmatické membrány, kdy je ergosterol neadekvátně nahrazen jiným steroidem, a tím je poškozena funkčnost membrány, včetně enzymové aktivity na ní vázané. Výsledkem je zpomalení až zastavení růstu buňky. Flukonazol se vyznačuje nižší lipofilitou a zvýšenou penetrací do CNS a dalších tkání. Jeho hodnota pKa je 1,5.<sup>47,49</sup>

## **Lékové interakce flukonazolu<sup>50</sup>**

Některé z předpokládaných nežádoucích účinků flukonazolu mohou být přisuzovány lékovým interakcím. Ve většině případů je možné předpovědět lékové interakce na základě mechanismu účinku interagujících látek, kdy jsou známy farmakodynamické účinky a farmakokinetické vlastnosti. Flukonazol je inhibitorem CYP 450 3A4 a 2C9, díky triazolové struktuře.

Interakce *flukonazolu* s následujícími skupinami léčiv:

### ***Tricyklická antidepressiva (TCA) – amitriptylin, nortriptylin***

Flukonazol může interferovat s amitriptylinem demethylací na izoformě CYP 2C9. To má za následek inhibici demethylace amitriptylinu a významný vzrůst jeho plazmatické koncentrace.

### ***Antihistaminika – terfenadin, astemizol***

Podání flukonazolu v denní dávce 400mg a vyšší při léčbě terfenadinem je kontraindikováno. Současné podání flukonazolu v dávkách nižších než 400mg denně by mělo být monitorováno, neboť hrozí zvýšení plazmatické koncentrace terfenadinu. Též se doporučuje monitorovat plazmatické koncentrace astemizolu při podávání flukonazolu.

### ***Antivirotika (anti HIV léčiva) – didanosin, zidovudin***

Flukonazol zvyšuje sérovou koncentraci zidovudinu a to pravděpodobně inhibicí jeho metabolismu. Jinak nejsou známy žádné interakce.

### ***Antibakteriální látky – rifampicin, rifabutin***

Rifampicin jako silný induktor CYP 450 3A4 snižuje plazmatickou hladinu flukonazolu zvýšením jeho eliminace. Flukonazol může naopak zvýšit hladinu rifabutinu, nejspíš inhibicí CYP 450 3A4.

### ***Benzodiazepiny – midazolam, triazolam***

Flukonazol zvyšuje koncentraci a tím i účinek midazolamu. Metabolismus midazolamu je inhibován silněji, pokud je podán perorálně na rozdíl od intravenózního podání. Flukonazol může zvyšovat účinek triazolamu, i když ne v takové míře jako například ketokonazol nebo itrakonazol.

### ***Cyklosporin***

Flukonazol (v dávkách vyšších než 100mg/den) zvyšuje hladinu cyklosporinu a výsledkem může být toxicita léčiva. Je to způsobeno nejspíš inhibicí CYP 3A4. Proto by měly být koncentrace cyklosporinu a sérového kreatininu častěji monitorovány.

### ***GI účinné látky – cisaprid***

Podání cisapridu s flukonazolem je kontraindikováno díky výskytu srdečních příhod. Ty jsou výsledkem zvýšené sérové hladiny cisapridu.

### ***Hydrochlorothiazid***

Zvýšení hladiny flukonazolu je připisováno poklesu renální clearance.

### ***Perorální kontraceptiva***

Hladina ethinylestradiolu a levonorgestrelu může být po podání flukonazolu zvýšena, či snížena. Klinický význam těchto účinků v současnosti není zatím přesně znám.

### ***Perorální antidiabetika – tolbutamid, glipizid***

Flukonazol redukuje metabolismus tolbutamidu i glipizidu a zvyšuje tak jejich plazmatickou koncentraci. Pokud je flukonazol užíván v kombinaci s deriváty sulfonylurey, měla by být monitorována glykémie.

### ***Fenytoin***

Flukonazol může zvyšovat plazmatickou koncentraci fenytoinu, což může vést u některých pacientů až k jeho toxicitě, pravděpodobně inhibicí jaterního metabolismu fenytoinu přes CYP 450 2C9.

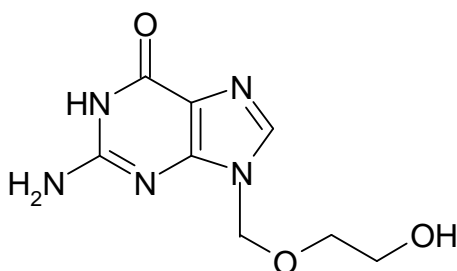
### ***Warfarin***

Flukonazol zvyšuje účinek warfarinu inhibicí jeho jaterního metabolismu. Účinnější S-enantiomer je metabolizován cestou přes CYP 2C9 a méně účinný R-enantiomer je metabolizován CYP 3A4. Flukonazol inhibuje obě dvě tyto cesty.

## **Deriváty flukonazolu**

Při hledání nových látek se zlepšeným antimykotickým profilem pro potenciální topickou aplikaci, byly navrženy dvě třídy derivátů flukonazolu: (a) estery karboxylových kyselin a (b) fosfodiesterů a fosfotriesterů mastných alkoholů nebo sacharidů; mastné alkoholy a sacharidy byly konjugovány s flukonazolem prostřednictvím fosfátového můstku. Léčiva aplikovaná na kůži jsou slabě absorbována. Absorpce léčiv z pokožky může být zlepšena zvýšením jejich lipofility. Tento lékový přístup byl založen na domněnce, že deriváty flukonazolu zvýší lipofilitu flukonazolu, který tak bude pomaleji biotransformován hydrolýzou a/nebo enzymatickým rozkladem flukonazolu a karboxylové kyseliny, mastného alkoholu nebo sacharidových analogů. Tím dojde k postupnému uvolňování flukonazolu z konjugovaných esterů, což má za následek možnost méně častého podávání analogů konjugovaných esterů. Navíc,

řada vybraných karboxylových kyselin a mastných alkoholů má sama o sobě antifungální aktivitu. Z toho vyplývá zvýšení celkové antifungální aktivity a/nebo rozšíření spektra účinku. Deriváty flukonazolu zajistí větší koncentraci neporušeného konjugovaného esteru k průniku do infikovaných buněk díky lipofilní povaze mastných kyselin a alkoholů. Kromě toho mají deriváty flukonazolu i další výhody. Rozvoj rezistence k těmto konjugátům, které mají dvě aktivní složky působící na rozdílné cíle, bude méně pravděpodobný než ke každé sloučenině zvlášť.<sup>51</sup>



**Obr. 10:** Vzorec acikloviru

**Aciklovir** se řadí mezi antivirotika. Antivirotika jsou chemoterapeutika, jejichž rozdílné chemické struktury umožňují zásah do různých fází vývojového cyklu virů v hostitelské buňce, hlavně se využívá rozdílů v mechanismech a kinetice syntézy virových a buněčných struktur. Chemickou strukturou patří mezi acyklické analogy nukleosidů (konkrétně guanosinu), které obsahují přírodní bázi a obměněnou molekulu sacharidu. Mechanismem účinku aciklovir inhibuje syntézu nukleových kyselin, kdy ve formě aktivního trifosfátu přednostně inhibuje virem kódovanou DNA-polymerázu, tím zpomaluje množení virů.<sup>52</sup> Je vychytáván infikovanými buňkami, ve kterých je konvertován virově specifickou thymidinkinázou na monofosfátový derivát, který je pak buněčnými enzymy konvertován na účinnou trifosfátovou formu. Aciklovir je mnohem účinnější proti virové DNA-polymeráze než proti buněčné DNA-polymeráze.<sup>53</sup> Používá se parenterálně, per os i lokálně a to u těžkých infekcí vyvolaných herpetickými viry (Herpes simplex, Herpes zoster).<sup>52</sup> Méně účinný je proti cytomegalovirům a viru Epstein-Barr. Je zvláště vhodný u herpetických genitálních a mukokutánních infekcí u pacientů trpících AIDS. Aciklovir aplikovaný povrchově ve formě roztoku se osvědčil také pro léčbu herpetické keratitidy. Pokud je

podán perorálně ve vysokých dávkách, vede k rychlému uzdravení (do 24h) dětí trpících závažnými formami planých neštovic. Podaný intravenózně je lékem volby u herpetické encefalidity. Aciklovir se vylučuje převážně nezměněn močí, to znamená, že dávky u pacientů s renální insuficiencí musí být sníženy. Přípravky pro povrchové nebo perorální podání jsou prakticky bez nežádoucích účinků, avšak u intravenózních přípravků se vyskytuje tromboflebitida a to přibližně u 3% pacientů. U 1% nemocných, zvláště pacientů s poškozenou funkcí ledvin, byly pozorovány neurologické symptomy (např. agitace, třes, dezorientace) a symptomy psychiatrické (např. depersonalizace a halucinace).<sup>53</sup>



## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Použité suroviny

0,5D = Oligoester kys. D,L-mléčné, glykolové a 0,5% dipentaerythritolu (FaF UK HK)

1D = Oligoester kys. D,L-mléčné, glykolové a 1% dipentaerythritolu (FaF UK HK)

2D = Oligoester kys. D,L-mléčné, glykolové a 2% dipentaerythritolu (FaF UK HK)

3D = Oligoester kys. D,L-mléčné, glykolové a 3% dipentaerythritolu (FaF UK HK)

5D = Oligoester kys. D,L-mléčné, glykolové a 5% dipentaerythritolu (FaF UK HK)

8D = Oligoester kys. D,L-mléčné, glykolové a 8% dipentaerythritolu (FaF UK HK)

TEC = triethylcitrát (Merck)

Kyselina citronová bezvodá a monohydrát (Lachema)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lachema)

Azid sodný (Fluka)

Aceton čistý (Penta, ČR)

Mucin z prasečích žaludků, typ III (Sigma-Aldrich, USA)

### 5.2. Použité přístroje

Horkovzdušná sušárna HS 61 A

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

Analytické digitální váhy KERN, max. 220g, d = 0,1mg

Digitální váhy KERN

Spektrofotometr HELIOS GAMA/ DELTA

Stolní digitální pH metr HANNA model pH 223

### 5.3. Příprava vzorků

Připravila jsem směs o hmotnosti 5,0 g složenou z 66% oligoesterového nosiče, 30% triethylcitrátu a 4% léčiva. Nejdříve jsem si do malé kádinky navázila 3,3 g oligoesteru a dala do sušárny roztavit při teplotě 60°C. Po jeho změknutí jsem přidala 1,5 g triethylcitrátu. Směs jsem opět zahřívala a průběžně ji homogenizovala kopistkou. Nakonec jsem přidala 0,2 g léčiva a směs jsem důkladně zhomogenizovala. Takto jsem připravila vzorky od každého z testovaných oligoesterových nosičů. Nejprve jsem je

použila pro měření adhezivitu, ze zbylého množství jsem připravila tři matrice pro měření disoluce. Na dno scintilační lahvičky jsem navážila na analytických vahách 150,0 mg, přelila 15,0 g fosfát citrátového pufru a dala je do termostatu temperovat na 37°C. V pravidelných časových intervalech jsem odebírala vzorky disoluční kapaliny, kterou jsem odlila do dalších scintilačních lahviček a připravila na pozdější měření. Poté jsem opět dovážila 15,0 g fosfát citrátového pufru a vrátila zpět do termostatu.

#### **5.4. Liberace léčiv**

Jako liberační médium pro léčiva flukonazol a aciklovir jsme zvolili fosfát citrátový pufr o pH 7,0. S pomocí chemických tabulek Merck jsem zjistila, že 1000 ml pufru se připraví smísením x dílů roztoku A se 100 – x díly roztoku B. Pro přípravu 1000 ml fosfát citrátového pufru pH 7,0 se použije 190 ml 0,1M roztoku kyseliny citronové monohydrátu (roztok A) a 810 ml 0,2M roztoku hydrogenfosfátu sodného dihydrátu (roztok B). Na základě toho jsem si vypočítala množství surovin potřebné pro přípravu 3000 ml pufru. K dispozici jsem měla pouze hydrogenfosfát sodný dodekahydrát a používala jsem kyselinu citronovou bezvodou i monohydrát, to znamená, že jsem množství odečtené z tabulek musela přepočítat. 0,1M roztok A jsem připravila navážením 11,95 g kyseliny citronové bezvodé do kádinky a doplněním destilovanou vodou do objemu 570 ml. Dále jsem si připravila 0,2M roztok B, a to navážením 174,06 g hydrogenfosfátu sodného dodekahydrátu a doplněním do objemu 2430 ml čištěnou vodou. Roztok A jsem smíchala s roztokem B, pořádně zamíchala a změřila hodnotu pH digitálním pH metrem. Odchytku v pH jsem eliminovala buď přidávkem malého množství kyseliny citronové, nebo hydrogenfosfátu sodného.

#### **Flukonazol**

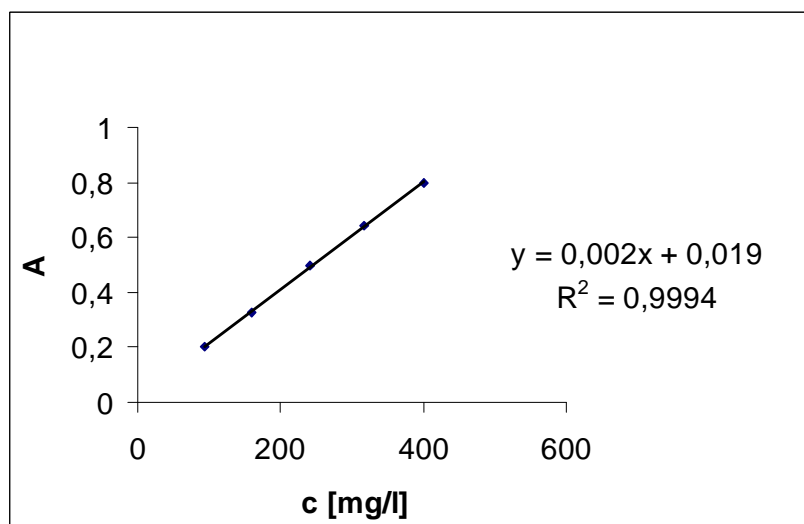
Pro sestavení kalibrační přímky flukonazolu jsem si připravila zásobní roztok o koncentraci 400 mg/l. Navážila jsem si 100,0 mg flukonazolu do odměrné baňky o objemu 250 ml a po rysku doplnila fosfát citrátovým pufrem a důkladně promíchala. Roztok jsem musela vložit do ultrazvukové lázně na dobu 5 minut při teplotě 50°C, neboť léčivo tvořilo velmi těžce rozpustné shluky částic. Za tuto dobu došlo k úplnému rozpuštění léčiva. Zásobní roztok jsem postupně ředila na roztoky o koncentraci 92 – 400mg/l (viz tab. 3). Poté jsem změřila absorbanci jednotlivých roztoků proti fosfát

citrátovému pufru při vlnové délce 261 nm. Nakonec jsem z naměřených hodnot absorbance sestrojila kalibrační přímku, zjistila její rovnici a hodnotu korelačního koeficientu.

**Tab. 3:** Hodnoty absorbance roztoků *flukonazolu* při vlnové délce 261 nm:

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

**Obr. 11:** Kalibrační přímka *flukonazolu* při vlnové délce 261 nm



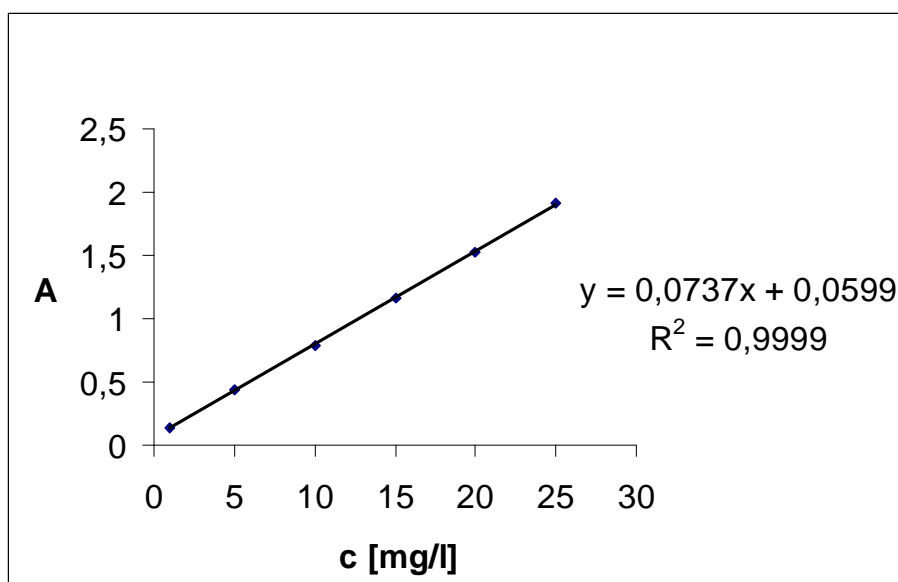
## Aciklovir

K sestavení kalibrační přímky acikloviru jsem připravila zásobní roztok o koncentraci 25 mg/l. Do odměrné baňky o objemu 100 ml jsem navážila 2,5 mg acikloviru a po rysku doplnila fosfát citrátovým pufrům. Po chvíli míchání se aciklovir rozpustil. Zásobní roztok jsem dále ředila na roztoky o koncentraci 1–25mg/l (viz tab. 4). U takto připravených roztoků jsem změřila absorbanci proti fosfát citrátovému pufru při vlnové délce 256 nm. Na základě hodnot absorbance jsem poté sestrojila kalibrační přímku, zjistila její rovnici a hodnotu korelačního koeficientu.

**Tab. 4:** Hodnoty absorbance roztoků *acikloviru* při vlnové délce 256 nm

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

**Obr. 12:** Kalibrační přímka *acikloviru* při vlnové délce 256 nm



## **Flukonazol**

Ze vzorků disoluční kapaliny jsem stanovila množství uvolněného flukonazolu. Změřila jsem hodnotu absorbance spektrofotometricky při vlnové délce 261 nm. Intervaly odběru vzorků byly ze začátku krátké (3 hod., 6 hod.), aby se zachytil počátek liberace (burst efekt, lag time) a postupně se prodlužovaly (24 hod., 48 hod.) až do doby, dokud probíhalo uvolňování léčiva z matrice. Když se léčivo z matrice přestalo uvolňovat, nebo se již všechno uvolnilo, měření jsem ukončila.

## **Aciklovir**

Množství uvolněného acikloviru jsem ve vzorcích disoluční kapaliny stanovovala obdobně jako u flukonazolu, pouze s tím rozdílem, že hodnota absorbance byla měřena při vlnové délce 256 nm. Hodnota absorbance byla ovšem ve většině případů větší než 1,9, a tak jsem musela provádět ředění disoluční kapaliny fosfát citrátovým pufrům.

Pro měření absorbance jsem si nejdříve spustila spektrofotometr a musela jsem počkat 30 min na jeho zahřátí. Poté jsem nastavila vlnovou délku (pro flukonazol 261 nm a pro aciklovir 256 nm). Umístila jsem slepý vzorek do cely, zavřela kryt a vynulovala. Slepý vzorek jsem vyjmula a do cely umístila měřený vzorek. Zavřela jsem kryt a na displeji se zobrazila hodnota absorbance, kterou jsem si zaznamenala. U vzorků s flukonazolem byla hodnota absorbance ve všech případech měřitelná rovnou. Ale u vzorků s aciklovirem byla většina mimo měřitelné rozmezí, a tak jsem musela vzorky ještě ředit fosfát citrátovým pufrům.

Naměřenou hodnotu absorbance jsem dosadila do rovnice kalibrační přímky a s přihlédnutím na ředění vypočítala množství uvolněného léčiva ve vzorku disoluční kapaliny (v mg/15ml). Dále jsem vypočítala, kolik % léčiva se za daný časový úsek uvolnilo a to tak, že jsem množství uvolněného léčiva převedla na podíl liberovaného množství léčiva k celkovému množství léčiva v matrici v %. Průběh liberace jsem znázornila graficky jako závislost kumulativních % uvolněného léčiva (osa y) na čase (osa x).

### **Flukonazol**

Rovnice kalibrační přímky *flukonazolu*:

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

Výpočet uvolněného *flukonazolu*:

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

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

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

### **Aciklovir**

Rovnice kalibrační přímky *acikloviru*:

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

Výpočet uvolněného *acikloviru*:

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

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

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

kde  $x_1$ .....množství léčiva [mg/l]

$x_2$ .....množství léčiva v 15 ml [mg/l]

$x_{\%}$ .....podíl liberovaného léčiva [%]

D.....ředění vzorku

$m_n$ .....navážka matrice [mg]

y.....absorbance

## 5.5. Měření adheze

Na materiálovém zkušebním stroji firmy Zwick/Roell jsem u připravených vzorků změřila adhezi. Nejdříve jsem si stroj a k němu připojený počítač zapnula. Jako podkladový materiál jsme zvolili mucin, který jsme teprve museli upravit. Hydratovali jsme ho čistou vodou do požadované konzistence (1,0 g mucinu v třence jsme rozetřeli se 7,0 g vody). Mucin jsem poté nanasla kopistkou rovnoměrně na dolní kontaktní plochu stroje, na horní plochu jsem nanasla rovnoměrnou vrstvu vzorku. Před vlastním měřením jsem na počítači nastavila testovací parametry (kontaktní sílu 10 N, dobu kontaktu 60 s a rychlost odtržení 100 mm/min). Dále jsem nastavila výchozí vzdálenost horní a dolní plochy (LE), vynulovala sílu a odstartovala vlastní zkoušku adheze.

Horní plocha se začala z výchozí pozice LE 25 mm pohybovat směrem dolů rychlostí 25 mm/min do té doby, než se plochy k sobě přiblížily na zkušební vzdálenost 5 mm. Po dosažení této vzdálenosti se plochy přibližovaly jen rychlostí 10 mm/min, až se dostaly do kontaktu. Kontaktní síla byla 10N po dobu 60 s, pak došlo k odtržení horní plochy od dolní rychlostí 100 mm/min. Snímač síly zaznamenal hodnotu  $F_{\max}$  (tj. maximální sílu, která je nutná pro odtržení). S každým vzorkem jsem provedla sérii pěti zkoušek. Po každém měření jsem musela obě plochy očistit acetonem, vodou a náležitě osušit.

Obr. 13: Vzor protokolu testu adheze

**Zwick / Roell**

11.02.2009

**Zk. parametry:**

Zkoušel(a) : RP Dvořáková  
Materiál : mucin-3D  
Snímač síly : 2,5kN  
Jiná rychlost pro odlehčení : 100 mm/min  
Prodleva na ref. hodn. síly při zatěžování: 1:60  
Definování síly pro zatížení : 1:10

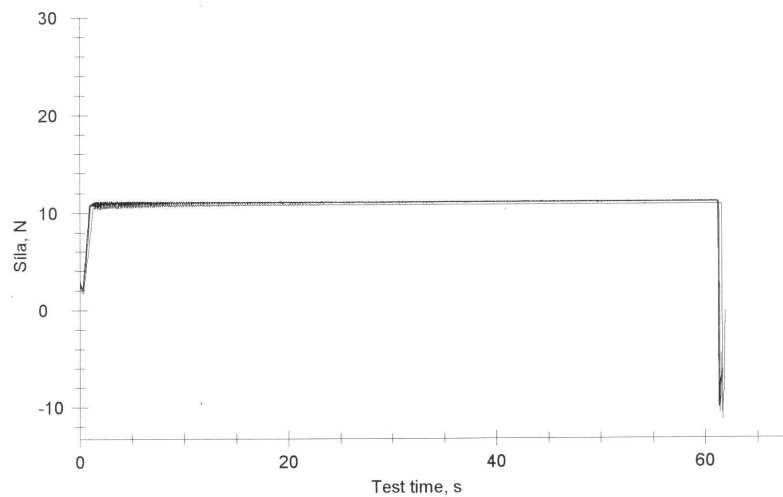
**Výsledky:**

Nr	Fa max. N
1	-11,34
2	-10,10
3	-10,41
4	-10,65
5	-10,06

**Statistika:**

Série n = 5	Fa max. N
$\bar{x}$	-10,51
s	0,52
v	-4,97

**Grafické záznamy zkoušek:**





## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. Tabulky

**Tab. 5:** Liberace flukonazolu z polymeru 3D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,131	1	0,840	13,70	14,23	14,23
	0,155	1	1,020	16,80		
	0,118	1	0,743	12,19		
6 hod	0,115	1	0,720	11,74	12,14	26,37
	0,153	1	1,005	16,55		
	0,085	1	0,495	8,13		
24 hod	0,270	1	1,883	30,70	32,27	58,64
	0,327	1	2,310	38,04		
	0,247	1	1,710	28,07		
48 hod	0,110	1	0,683	11,13	10,49	69,13
	0,077	1	0,435	7,16		
	0,126	1	0,803	13,17		
5 dnů	0,228	1	1,568	25,56	20,64	89,77
	0,151	1	0,990	16,30		
	0,182	1	1,223	20,07		
8 dnů	0,112	1	0,698	11,37	9,50	99,27
	0,088	1	0,518	8,44		
	0,090	1	0,533	8,68		
12 dnů	0,057	1	0,285	4,65	4,24	103,51
	0,067	1	0,360	5,87		
	0,037	1	0,135	2,20		

**Tab. 6:** Liberace flukonazolu z polymeru 5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,194	1	1,313	21,46	19,18	19,18
	0,156	1	1,028	16,93		
	0,173	1	1,155	19,16		
6 hod	0,293	1	2,055	33,60	22,27	41,45
	0,188	1	1,268	20,89		
	0,118	1	0,743	12,32		
24 hod	0,255	1	1,770	28,94	29,61	71,06
	0,267	1	1,860	30,65		
	0,254	1	1,763	29,24		
48 hod	0,069	1	0,375	6,13	8,70	79,76
	0,092	1	0,548	9,02		
	0,107	1	0,660	10,95		
5 dní	0,130	1	0,833	13,61	12,27	92,03
	0,116	1	0,728	11,99		
	0,109	1	0,675	11,20		
8 dní	0,075	1	0,420	6,87	7,29	99,32
	0,071	1	0,390	6,43		
	0,088	1	0,518	8,58		
12 dní	0,037	1	0,135	2,21	2,27	101,59
	0,032	1	0,098	1,61		
	0,043	1	0,180	2,99		

**Tab. 7:** Liberace flukonazolu z polymeru 8D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní
			[mg/15ml]			%
3 hod	0,643	1	4,680	76,67	64,95	64,95
	0,522	1	3,773	62,05		
	0,475	1	3,420	56,14		
6 hod	0,282	1	1,973	32,31	23,79	88,74
	0,137	1	0,885	14,56		
	0,218	1	1,493	24,50		
24 hod	0,110	1	0,683	11,18	9,93	98,67
	0,092	1	0,548	9,00		
	0,097	1	0,585	9,60		
48 hod	0,054	1	0,263	4,30	2,95	101,63
	0,035	1	0,120	1,97		
	0,040	1	0,158	2,59		

**Tab. 8:** Liberace acikloviru z polymeru 3D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,645	5	0,595	9,77	8,72	8,72
	0,624	5	0,574	9,57		
	0,466	5	0,413	6,82		
6 hod	0,395	2	0,136	2,24	2,34	11,06
	0,375	2	0,128	2,14		
	0,455	2	0,161	2,65		
24 hod	0,652	5	0,603	9,89	9,95	21,01
	0,684	5	0,635	10,59		
	0,618	5	0,568	9,37		
48 hod	0,899	1	0,171	2,80	2,80	23,81
	0,809	1	0,152	2,54		
	0,966	1	0,184	3,04		
5 dnů	0,613	5	0,563	9,24	9,46	33,27
	0,598	5	0,548	9,13		
	0,656	5	0,607	10,01		
8 dnů	0,695	5	0,646	10,61	11,34	44,61
	0,765	5	0,718	11,96		
	0,742	5	0,694	11,45		
12 dnů	1,122	5	1,081	17,74	18,05	62,66
	1,192	5	1,152	19,20		
	1,085	5	1,043	17,21		
22 dnů	0,884	10	1,677	27,53	26,89	89,56
	0,899	10	1,708	28,46		
	0,795	10	1,496	24,69		
46 dnů	0,294	10	0,476	7,82	8,00	97,55
	0,287	10	0,462	7,70		
	0,312	10	0,513	8,47		

**Tab. 9:** Liberace acikloviru z polymeru 5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

čas	A	ředění	ACV [mg/15ml]	ACV [%]	průměr	kumulativní %
3 hod	0,725	12	1,624	26,75	31,26	31,26
	0,969	12	2,220	36,81		
	0,810	12	1,832	30,23		
6 hod	0,685	12	1,527	25,14	23,10	54,36
	0,586	12	1,285	21,30		
	0,627	12	1,385	22,86		
24 hod	0,723	5	0,675	11,11	12,26	66,62
	0,801	5	0,754	12,50		
	0,843	5	0,797	13,15		
48 hod	0,633	5	0,583	9,60	9,06	75,68
	0,624	5	0,574	9,52		
	0,540	5	0,489	8,06		
5 dnů	0,722	5	0,674	11,10	12,48	88,16
	0,861	5	0,815	13,52		
	0,823	5	0,777	12,81		
8 dnů	1,201	2	0,464	7,65	7,30	95,46
	1,126	2	0,434	7,19		
	1,112	2	0,428	7,07		
12 dnů	1,110	1	0,214	3,52	3,37	98,83
	1,105	1	0,213	3,53		
	0,969	1	0,185	3,05		

**Tab. 10:** Liberace acikloviru z polymeru 8D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

čas	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní
			[mg/15ml]	[%]		%
3 hod	0,793	12	1,790	29,86	32,16	32,16
	0,801	12	1,810	29,75		
	0,975	12	2,235	36,88		
6 hod	1,049	12	2,416	40,29	36,23	68,39
	0,892	12	2,032	33,40		
	0,928	12	2,120	34,99		
24 hod	0,586	5	0,535	8,93	9,02	77,41
	0,559	5	0,508	8,35		
	0,642	5	0,592	9,78		
48 hod	1,240	2	0,480	8,01	8,18	85,59
	1,320	2	0,513	8,43		
	1,267	2	0,491	8,11		
5 dnů	0,985	5	0,941	15,70	9,53	95,12
	1,029	2	0,394	6,48		
	1,015	2	0,389	6,42		
8 dnů	0,799	1	0,150	2,51	2,54	97,67
	0,784	1	0,147	2,42		
	0,861	1	0,163	2,69		
12 dnů	0,438	1	0,077	1,28	1,20	98,87
	0,389	1	0,067	1,10		
	0,425	1	0,074	1,23		

**Tab. 11:** Adhezivita nosiče 0,5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

Měření č.	$F_{\max}$ [N]	$\bar{F}_{\max}$ [N]	s	$\bar{\varnothing}$ horní plochy trnu [mm]	$\bar{\varnothing} F/S$ [mN/mm <sup>2</sup> ]
1	4,79	5,53	0,53	20,11	17,42
2	5,76				
3	5,26				
4	5,68				
5	6,18				

**Tab. 12:** Adhezivita nosiče 1D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

Měření č.	$F_{\max}$ [N]	$\bar{F}_{\max}$ [N]	s	$\bar{\varnothing}$ horní plochy trnu [mm]	$\bar{\varnothing} F/S$ [mN/mm <sup>2</sup> ]
1	5,37	4,98	0,28	20,11	15,67
2	4,89				
3	4,61				
4	5,09				
5	4,92				

**Tab. 13:** Adhezivita nosiče 2D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

Měření č.	$F_{\max}$ [N]	$\bar{F}_{\max}$ [N]	s	$\bar{\varnothing}$ horní plochy trnu [mm]	$\bar{\varnothing} F/S$ [mN/mm <sup>2</sup> ]
1	7,24	6,65	0,58	20,11	20,94
2	7,17				
3	6,47				
4	6,55				
5	5,82				

**Tab. 14:** Adhezivita nosiče 3D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

Měření č.	$F_{\max}$ [N]	$\bar{\Phi} F_{\max}$ [N]	s	$\bar{\Phi}$ horní plochy trnu [mm]	$\bar{\Phi} F/S$ [mN/mm <sup>2</sup> ]
1	11,34	10,51	0,52	20,11	33,09
2	10,10				
3	10,41				
4	10,65				
5	10,06				

**Tab. 15:** Adhezivita nosiče 5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

Měření č.	$F_{\max}$ [N]	$\bar{\Phi} F_{\max}$ [N]	s	$\bar{\Phi}$ horní plochy trnu [mm]	$\bar{\Phi} F/S$ [mN/mm <sup>2</sup> ]
1	12,27	13,15	1,49	20,11	41,38
2	14,04				
3	13,55				
4	11,05				
5	14,81				

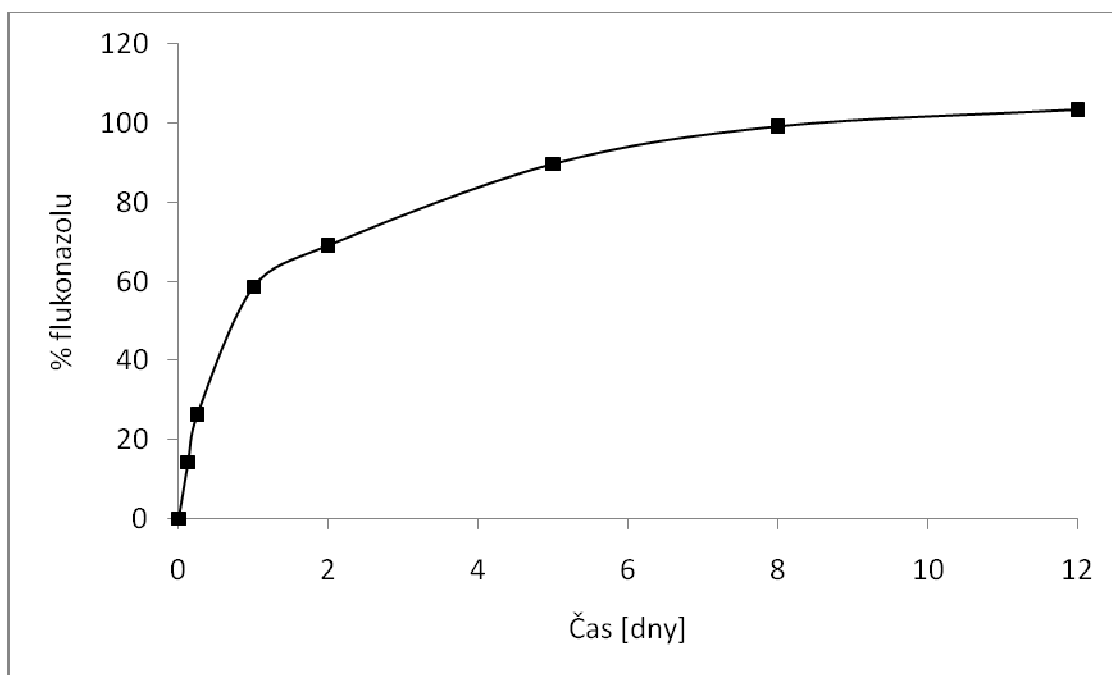
**Tab. 16:** Adhezivita nosiče 8D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.

Měření č.	$F_{\max}$ [N]	$\bar{\Phi} F_{\max}$ [N]	s	$\bar{\Phi}$ horní plochy trnu [mm]	$\bar{\Phi} F/S$ [mN/mm <sup>2</sup> ]
1	11,41	13,22	1,17	20,11	41,63
2	14,45				
3	12,79				
4	13,76				
5	13,70				

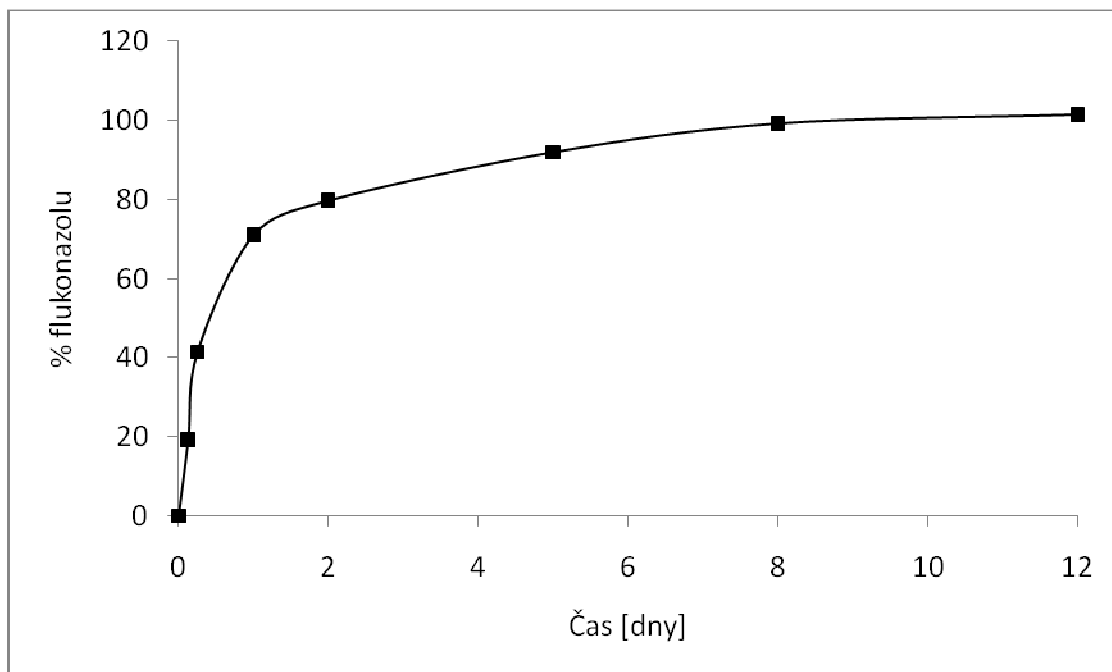


## 6.2. Grafy

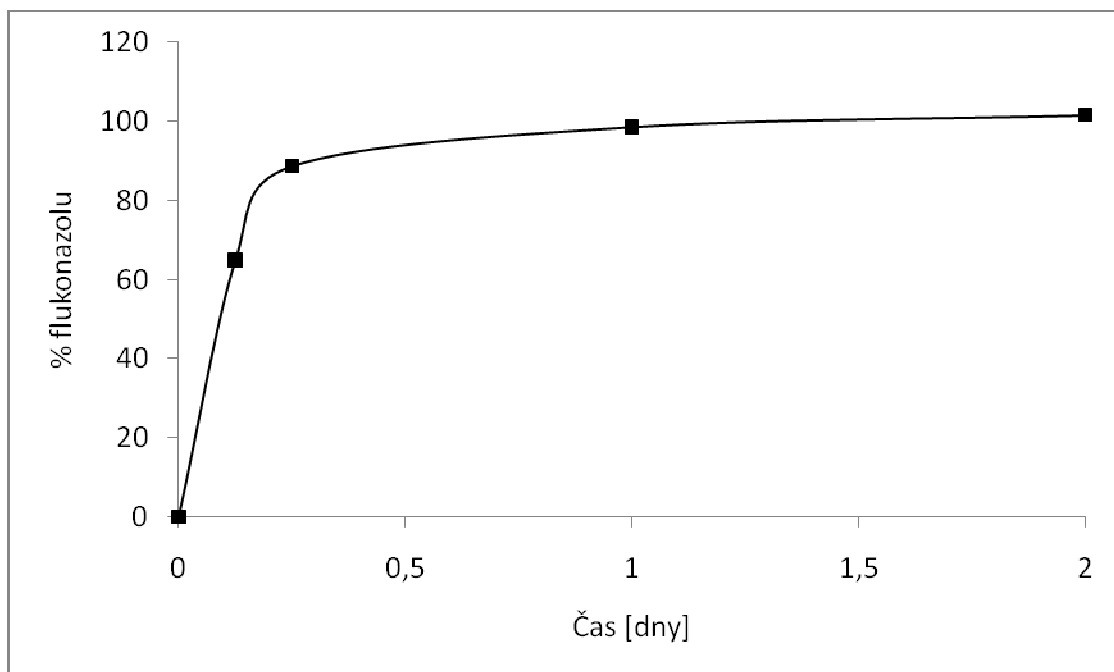
**Obr. 14:** Liberace flukonazolu z polymeru 3D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.



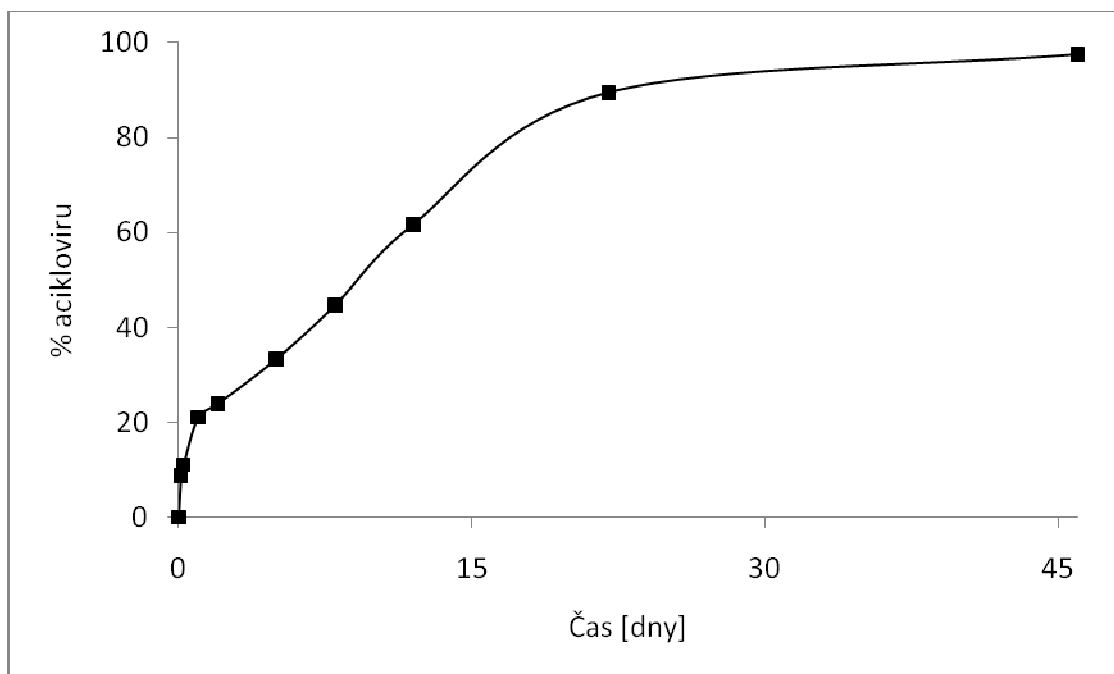
**Obr. 15:** Liberace flukonazolu z polymeru 5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.



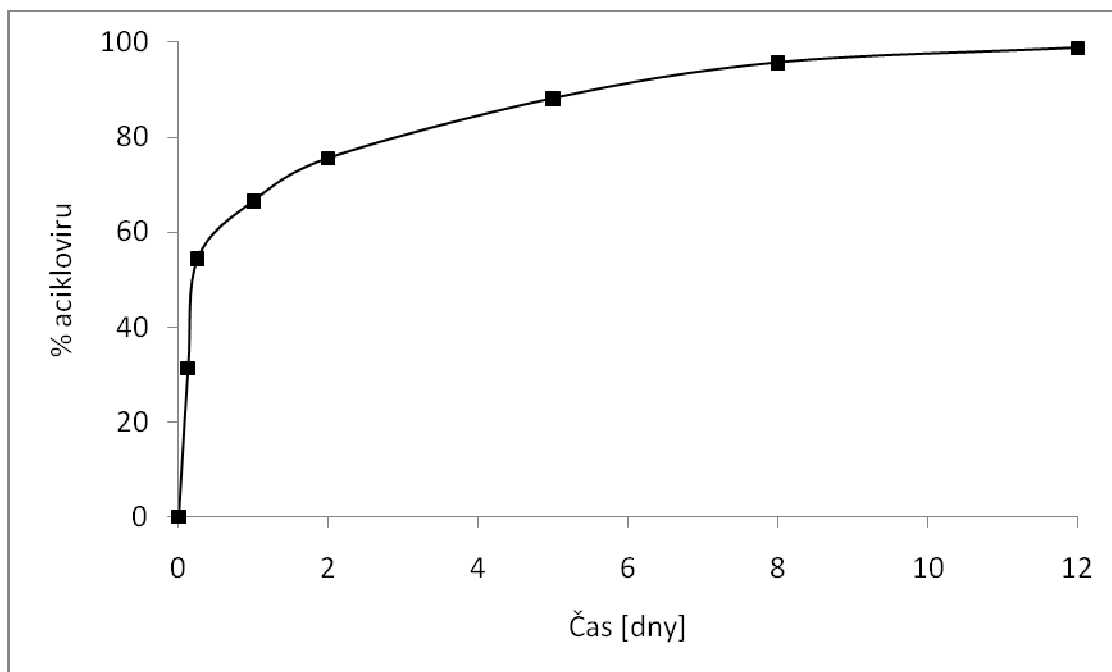
**Obr. 16:** Liberace flukonazolu z polymeru 8D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.



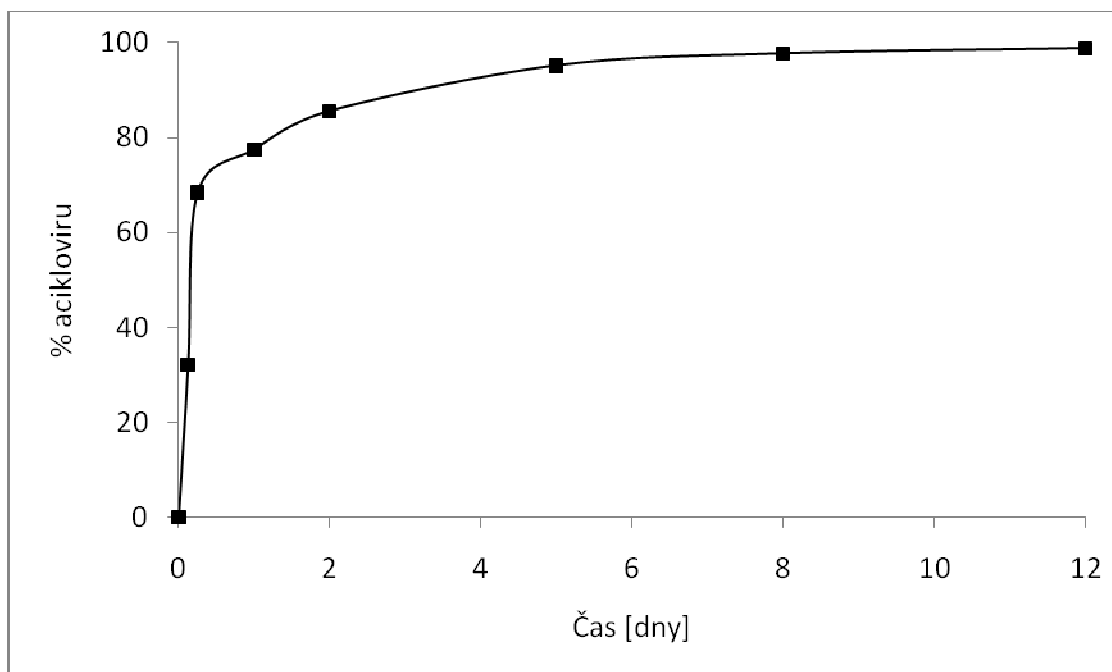
**Obr. 17:** Liberace acikloviru z polymeru 3D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.



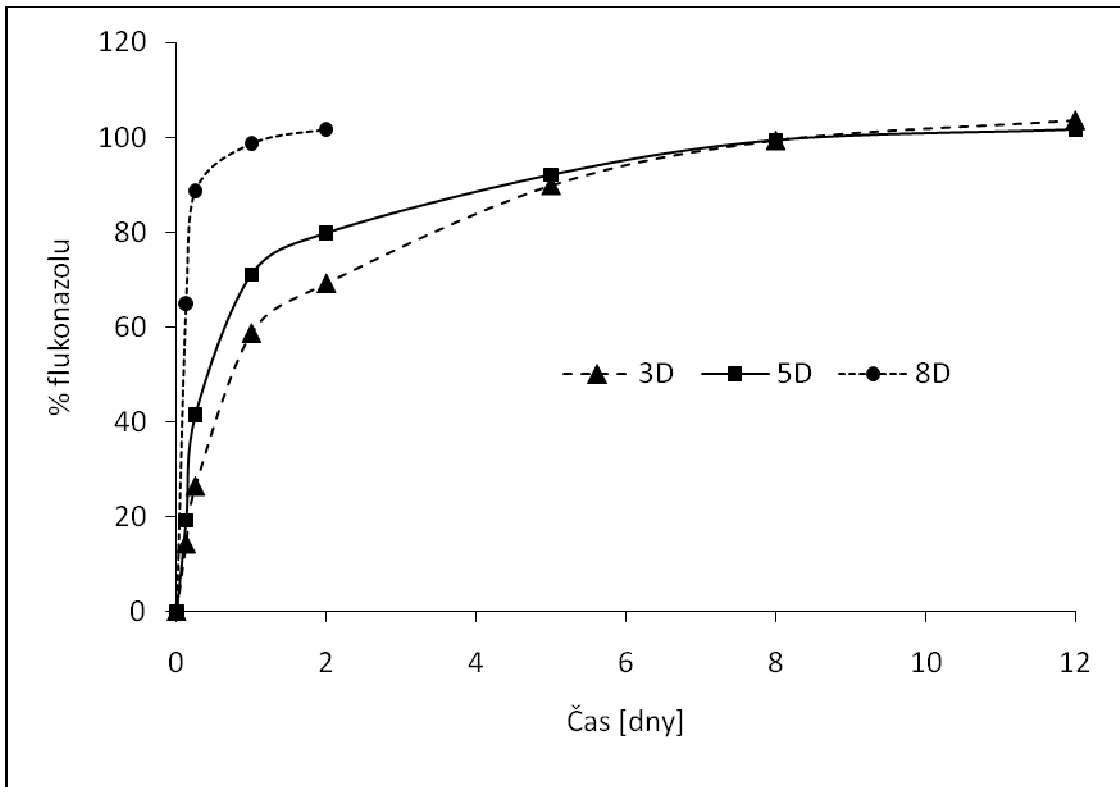
**Obr. 18:** Liberace acikloviru z polymeru 5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.



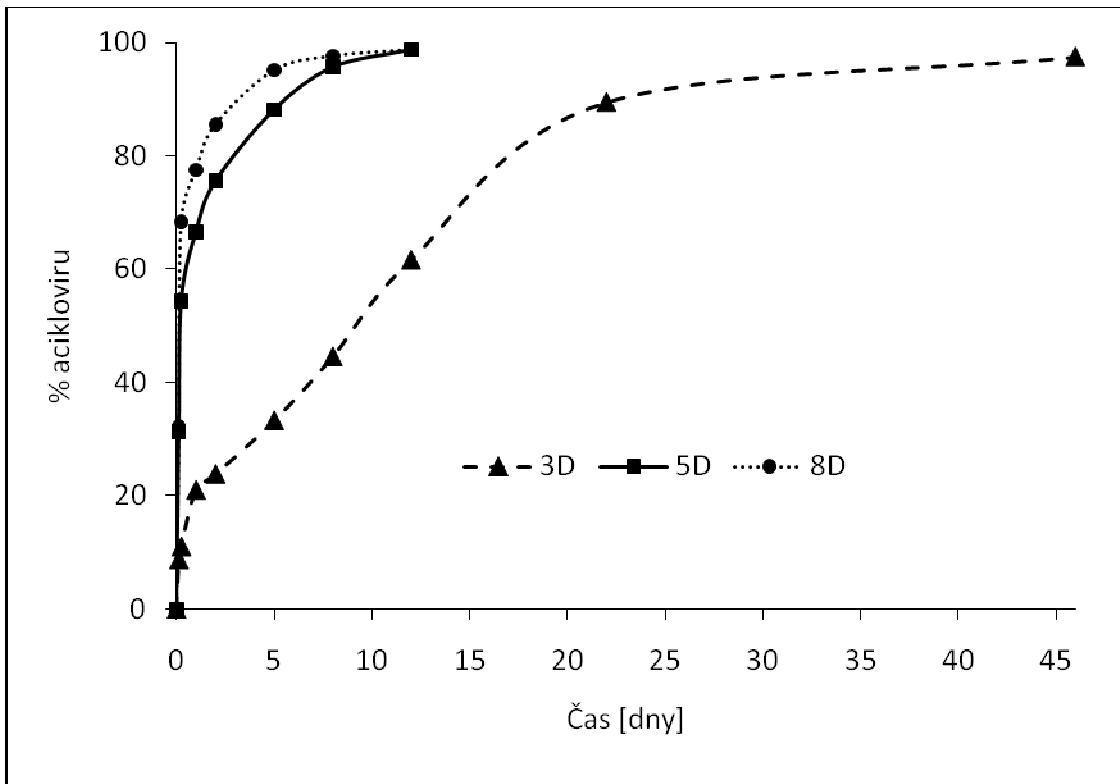
**Obr. 19:** Liberace acikloviru z polymeru 8D plastifikovaného 30% triethylcitrátu.



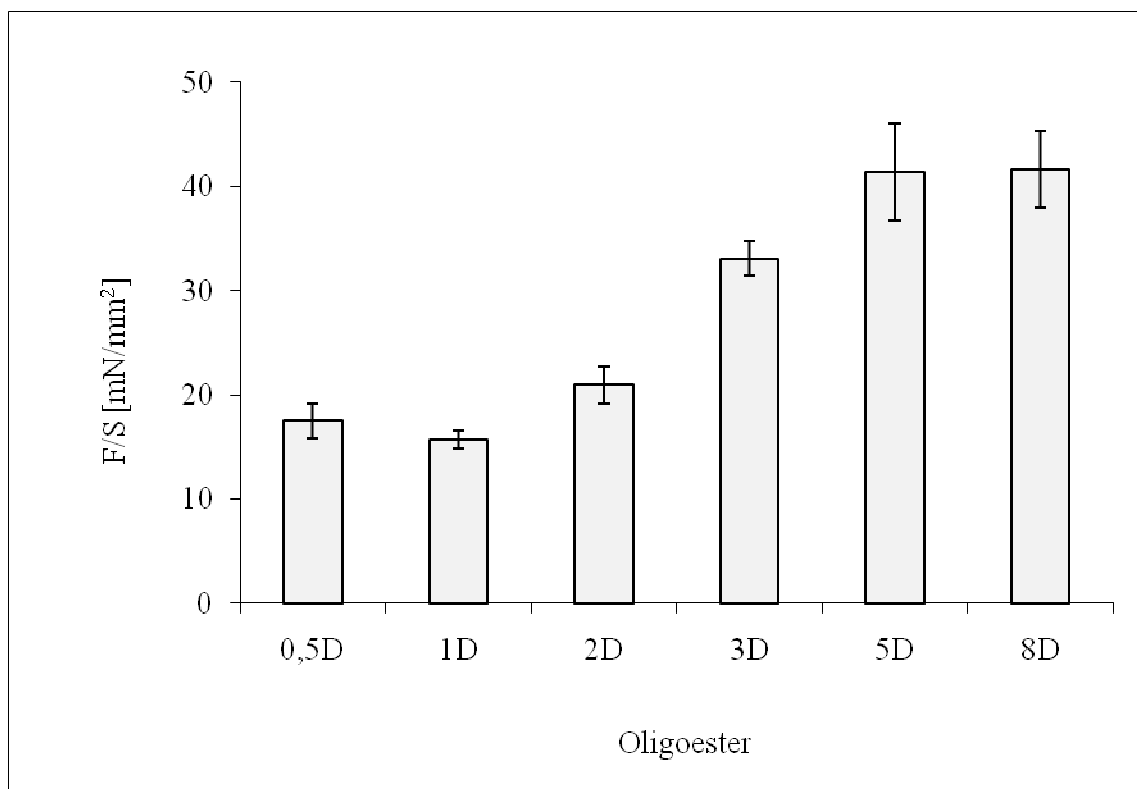
**Obr. 20:** Vliv koncentrace větvičí složky na průběh liberace flukonazolu.



**Obr. 21:** Vliv koncentrace větvičí složky na průběh liberace acikloviru.



**Obr. 22:** Adhezivita oligoesterových nosičů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 30% TEC.



## 7. DISKUZE

### 7.1. Oligoestery větvené dipentaerythritolem jako nosiče léčiv

V předložené rigorózní práci byly jako nosiče flukonazolu a acikloviru testovány oligoestery větvené dipentaerythritolem, pracovně označené 3D, 5D, 8D. Nosiče byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie v roce 2004. Jedná se o kopolymery kyseliny mléčné a glykolové v poměru 1:1 obsahující jako větvící složku dipentaerythritol v koncentraci 3%, 5% nebo 8%.

Ve firmě Synpo a.s. Pardubice bylo provedeno stanovení molární hmotnosti oligoesterů metodou SEC-MALS a výpočet stupně větvení. V tabulce 17 jsou uvedeny číselné ( $M_n$ ) a hmotnostní ( $M_w$ ) průměry molární hmotnosti a poměr hmotnostního průměru stanoveného pomocí konvenční SEC,  $M_w(\text{SEC})$  ke skutečné hodnotě stanovené pomocí SEC-MALS. Poměr  $M_w(\text{SEC})/M_w$  klesá s rostoucím stupněm větvení (pro lineární kyselinu poly-DL-mléčnou byla stanovena hodnota 1,50). Výsledky analýzy naznačují, že molární hmotnost nosičů klesá s rostoucím obsahem větvící složky. To je dáno vzrůstajícím přebytkem hydroxylů. Stupeň větvení s rostoucím obsahem dipentaerythritolu v reakční směsi vzrůstá.<sup>54</sup>

**Tab. 17:** Molární hmotnosti a poměr  $M_w(\text{SEC})/M_w$  oligoesterových nosičů.

Označení nosiče	$M_n$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	$M_w(\text{SEC})/M_w^*$
3D	3 600	5 300	1,19
5D	1 900	2 300	1,04
8D	1 400	1 700	0,94

*$M_n$  [g/mol] je číselně střední molární hmotnost,  $M_w$  [g/mol] je hmotnostně střední molární hmotnost a poměr  $M_w(\text{SEC})/M_w$  vyjadřuje stupeň větvení (nižší hodnota znamená vyšší stupeň větvení, lineární PLGA má hodnotu 1,5)*

Matrice byly připraveny již dříve vyzkoušenou metodou tavení nosičů v horkovzdušné sušárně při teplotě do 80°C. Jako plastifikátor byl použit triethylcitrát (TEC) v koncentraci 30%. Jedná se o běžně používaný plastifikátor polymerů, jehož výhodou je neškodnost prověřená dlouhodobým používáním a vysoká účinnost

při snižování teploty skelného přechodu alifatických oligoesterů.<sup>55</sup> TEC je mísitelný s většinou oligoesterových nosičů a může být použit téměř bez omezení.

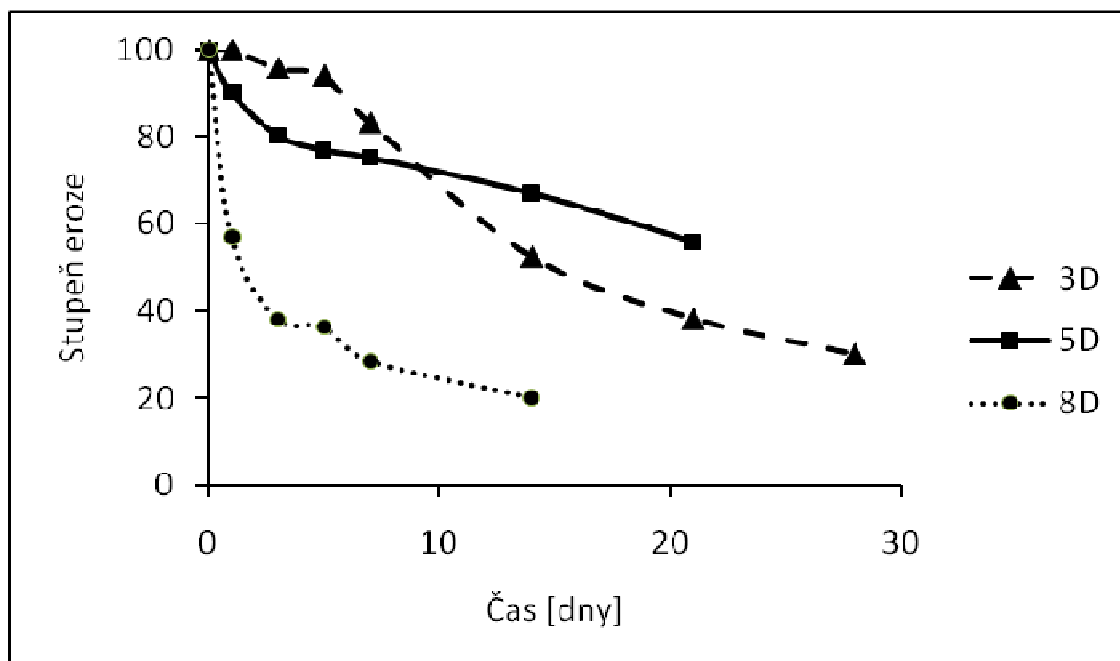
K plastifikovanému nosiči bylo přidáno léčivo (aciklovir nebo flukonazol) v koncentraci 4% z celkové hmotnosti matrice. Matrice o hmotnosti 150,0 mg byly studovány jako tvarově shodné tenké disky na dně scintilačních lahvíček. Shodný povrch všech matric byl zajištěn nahřátím dna scintilační lahvičky, čímž se matrice rovnoměrně rozprostřely po dně. Disolučním médiem pro liberaci léčiv byl zvolen fosfát citrátový pufr pH 7,0. V časových intervalech vhodně zvolených tak, aby byl zachycen celý průběh uvolňování léčiv, byly odebírány vzorky disolučního média a spektrofotometricky stanoveno množství uvolněného léčiva (Tab. 5-10).

Klíčovou vlastností při liberaci léčivých látek z oligoesterových nosičů je průběh jejich bobtnání a eroze. Pokud nosič bobtná ve velkém rozsahu, probíhá liberace difúzí molekul nebo iontů léčiva, případně desorpce. Při nižším stupni bobtnání se projevují obstrukční efekty. Pokud nosič nebobtná, průběh liberace se realizuje erozí a rozpouštěním matricového systému.

Větvené alifatické oligoestery relativně rychle hydrolyzují. Chemická nestabilita sloučenin je příčinou jednak nerovnovážného bobtnání, jednak eroze. Větvené oligoestery alifatických hydroxykyselin erodují již v počátečním stádiu působením vodného média. Dalším specifikem je eroze tělísek při zachování jejich integrity. S rostoucím stupněm větvení klesá stupeň bobtnání nosičů.

Průběh bobtnání a eroze byl studován v rámci rigorózní práce Šebestové.<sup>56</sup> Bylo zjištěno, že eroze nosiče 3D probíhala během prvních pěti dnů pomalu, poté došlo ke zrychlení a po 28 dnech zbývalo 30% materiálu. Průběh eroze korespondoval s průběhem bobtnání, zjištěný vyšší stupeň bobtnání po 5. dnu souvisel s rychlejší erozí materiálu. U nosiče 5D nastal rychlý úbytek hmotnosti za první den, následovaný výrazným zpomalením eroze. Pomalá eroze byla doprovázena nízkým stupněm bobtnání. Po 21 dnech zbývalo ještě 60% původní matrice. U nosiče 8D došlo během 3 dnů k rychlému rozpuštění přibližně poloviny matrice, po 3. dnu byla eroze velmi pomalá.

**Obr. 23:** Průběh eroze oligoesterů větvených dipentaerythritolem ve fosfát citrátovém pufru pH 6,0.<sup>56</sup>



Na Obr. 14 je znázorněn průběh liberace flukonazolu z nosiče 3D. Za první tři hodiny od počátku disolučního testu se z matrice uvolnilo 14% flukonazolu, za 24 hodin již téměř 60% inkorporovaného léčiva a celková doba liberace byla 12 dnů. Výrazně pomalejší byl průběh liberace acikloviru z oligoesteru 3D (Obr. 17). Na počátku se uvolnilo pouze 9% léčiva, za 24 hodin 21% léčiva a celková doba liberace byla 46 dnů.

Zvýšením koncentrace větvicí složky v reakční směsi z 3% na 5% dipentaerythritolu, vedlo k získání oligoesteru s nižší molární hmotností a vyšším stupněm větvení (Tab. 17). To ovlivnilo průběh eroze oligoesterových matric a liberace léčiv. Eroze oligoesteru 5D byla po dobu deseti dnů rychlejší než eroze oligoesteru 3D, proto i liberace léčiv z matrice tvořené oligoesterem 5D probíhala rychleji. Na počátku (po 3 hod.) se flukonazolu uvolnilo 20% a acikloviru dokonce 30%. Za 24 hod. se množství uvolněných léčiv vyrovnalo a bylo uvolněno přibližně 70%. Celková doba liberace flukonazolu i acikloviru z nosiče 5D byla 12 dnů.

Dalším zvýšením koncentrace větvicí složky v reakční směsi došlo k dalšímu snížení molární hmotnosti a zvýšení stupně větvení syntetizovaných oligoesterů (Tab. 17). Eroze oligoesteru 8D byla výrazně rychlejší, zejména v prvních třech dnech



(Obr. 23). Tomu odpovídala i rychlá liberace léčiv. Flukonazol se z matrice tvořené oligoesterem 8D uvolnil prakticky za 24 hodin (Obr. 16), aciklovir za 5 dnů (Obr. 19).

## 7.2. Adhezivita oligoesterů větvených dipentaerythritolem

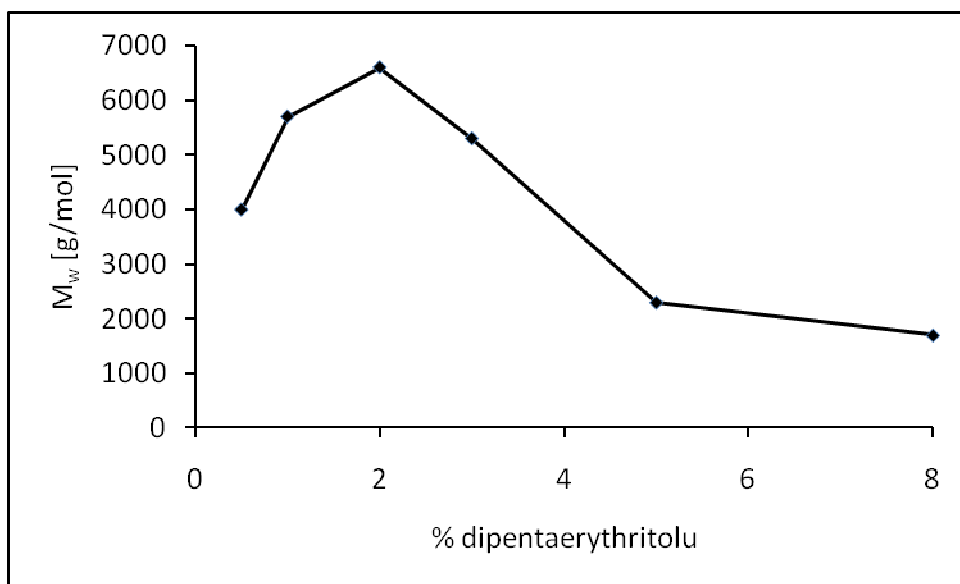
Na katedře farmaceutické technologie FaF UK byly v roce 2004 syntetizovány terpolymery kyseliny mléčné a glykolové, větvené 3%, 5% nebo 8% mannitolu nebo dipentaerythritolu. Tyto nosiče byly analyzovány v Synpo Pardubice (Tab. 17). Analýza ukázala, že zvolené koncentrace větvicí složky vedou k nosičům s nízkou molární hmotností. Čím vyšší byla koncentrace větvicí složky v reakční směsi, tím nižší byla molární hmotnost nosiče. S cílem získat nosiče s vyšší molární hmotností bylo při syntéze v roce 2006 použito pouze 0,5%, 1% nebo 2% dipentaerythritolu v reakční směsi. U dipentaerythritolu bylo možno při stejné reaktivitě všech hydroxylů předpokládat přímou závislost mezi jeho podílem v reakční směsi a stupněm větvení nosičů. Analýzou nově syntetizovaných nosičů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem<sup>57</sup> bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací dipentaerythritolu v řadě 0,5%→1%→2% molární hmotnost a stupeň větvení rostou (Tab. 18). Závislost molární hmotnosti oligoesterů  $M_w$  na koncentraci větvicí složky v reakční směsi uvádí Obr. 24.

**Tab. 18:** Číselné a hmotnostní průměry molární hmotnosti a průměrné větvicí poměry  $g'$  oligoesterových nosičů.

Označení nosiče	$M_n$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	$g'$
0,5D	2200	4000	0,70
1D	2500	5700	0,58
2D	4300	6600	0,52

$M_n$  [g/mol] je číselně střední molární hmotnost,  $M_w$  [g/mol] je hmotnostně střední molární hmotnost,  $g' = (\eta_{br} / \eta_{lin})$  je větvicí poměr stanovený z vnitřní viskozity lineárního (lin) a větveného (br) polymeru při shodné molární hmotnosti (lineární PLGA má  $g' = 1,0$ )

**Obr. 24:** Vliv koncentrace větvicí složky v reakční směsi na molární hmotnost  $M_w$  oligoesterů.<sup>54, 57</sup>



Byla měřena adhezivita oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 30% triethylcitrátu jako maximální síla při odtržení vzorku od modelového substrátu tvořeného mucinem z prasečích žaludků. Test adheze byl realizován při kontaktní síle 10 N, kontaktní době 60 s a rychlosti odtržení vzorku od podkladu 100 mm/min. Obr. 13 uvádí vzor protokolu z měření adheze. Při nastavených zkušebních parametrech byla zkouška provedena 5x. Síla potřebná k odtržení adheziva od substrátu byla vyjádřena jako  $F_{\max}$  v jednotkách Newton. Záporné znaménko vyjadřuje zpětný pohyb horní kontaktní plochy se vzorkem při odtržení od podkladu. S kladným znaménkem stroj registruje tlakovou sílu při kontaktu ploch.

Naměřená maximální síla při odtržení adheziva od podkladu byla vztažena k velikosti kontaktní plochy a vyjádřena v jednotkách  $\text{mN}/\text{mm}^2$  (Tab. 11-16). Je tak možno porovnávat výsledky získané při různých kontaktních plochách. Výsledky testů realizované při různých zkušebních parametrech srovnávat nelze.

Na Obr. 22 je porovnána adhezivita oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 30% triethylcitrátu. Adhezi viskózních soustav k substrátu vysvětluje teorie smáčení. Podle této teorie jsou adhezivní vlastnosti materiálu dány schopností rozprostřít se po substrátu a vytvořit s ním těsný kontakt. Adhezivní vlastnosti viskózních soustav jsou významně ovlivněny dynamickou viskozitou.

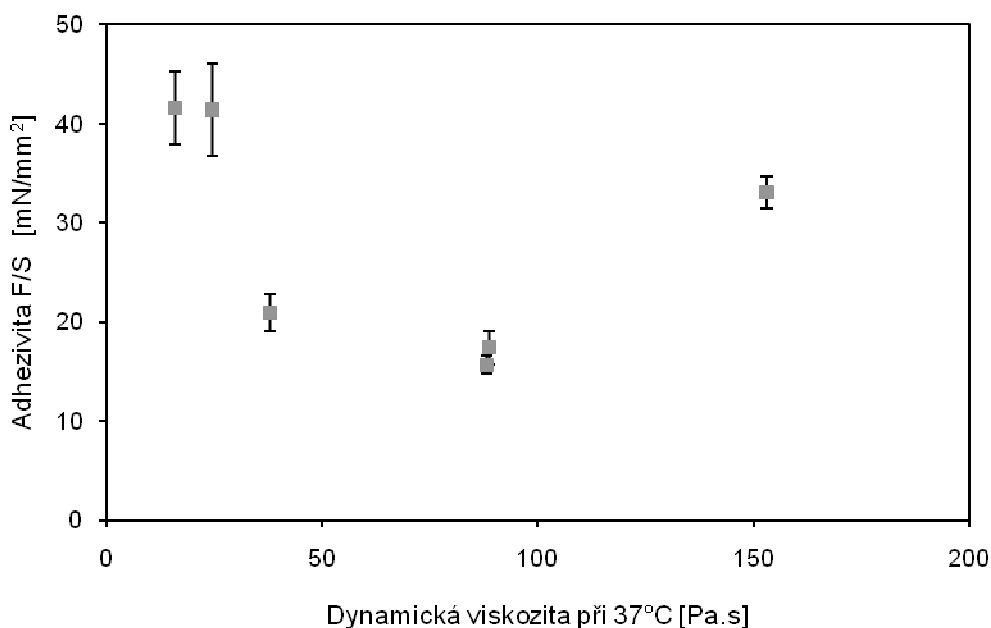
V diplomové práci<sup>58</sup> a v rigorózní práci Páblové<sup>59</sup> byla měřena dynamická viskozita oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 30% TEC.

**Tab. 19:** Dynamická viskozita  $\eta$  oligoesterů větvených dipentaerythritolem.<sup>58, 59</sup>

Oligoester	0,5D	1D	2D	3D	5D	8D
$\eta$ [Pa.s]	88,81	88,21	38,07	153,06	24,63	16,03

Bylo zjištěno, že polymery s extrémně vysokou hodnotou dynamické viskozity se nerozprostřou po substrátu, jejich adhezivní síla je neměřitelná. Například oligoester 3D plastifikovaný pouze 10% TEC má dynamickou viskozitu téměř 3000 Pa.s.<sup>3</sup> Naopak, je-li dynamická viskozita příliš nízká, i adhezivita může být zanedbatelná. Lze tedy konstatovat, že polymery, jejichž adhezivita závisí na rozprostření po substrátu, vykazují adhezivní vlastnosti v určitém rozmezí hodnot dynamické viskozity.

**Obr. 25:** Vztah mezi adhezivitou a viskozitou oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 30% triethylcitrátu.



Na Obr. 25 je znázorněn vztah mezi adhezivitou a viskozitou oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 30% triethylcitrátu. Dynamická viskozita všech testovaných oligoesterů byla v relativně úzkém rozmezí hodnot (přibližně 15 až 150 Pa.s). Tomu odpovídají hodnoty adhezivní síly vztažené

ke kontaktní ploše od  $16 \text{ mN/mm}^2$  do  $153 \text{ mN/mm}^2$ . Nejvyšší adhezivita byla zjištěna u oligoesterů 5D a 8D, které mají nízkou dynamickou viskozitu. Jelikož třetí nejvyšší adhezivitu měl oligoester 3D s nejvyšší hodnotou dynamické viskozity, lineární závislost mezi adhezivitou a viskozitou nelze konstatovat. Všechny testované oligoestery vykazovaly v testu adhezivní vlastnosti.

## 8. ZÁVĚRY

1. Při syntéze oligoesterů testovaných v předložené práci byla v reakční směsi použita různá koncentrace dipentaerythritolu ve funkci větvicí složky. U dipentaerythritolu bylo možno při stejné reaktivitě všech hydroxylů předpokládat přímou závislost mezi jeho podílem v reakční směsi a stupněm větvení nosičů. Při použití pouze 0,5%, 1% nebo 2% dipentaerythritolu molární hmotnost a stupeň větvení rostly. Při vyšších koncentracích dipentaerythritolu se stupeň větvení výrazně nezvyšoval, byly získány oligoestery s nízkou molární hmotností  $M_w$ . Zvýšením koncentrace dipentaerythritolu z 3% na 5% se molární hmotnost  $M_w$  snížila.
2. Větvené oligoestery alifatických hydroxykyselin erodují již v počátečním stádiu působením vodného média. Dalším specifickým je eroze tělísek při zachování jejich integrity. S rostoucím stupněm větvení klesá stupeň bobtnání nosičů. Liberace léčiv se realizuje erózou a rozpouštěním matricového systému.
3. Liberace acikloviru a flukonazolu z oligoesterů syntetizovaných z reakční směsi s relativně vysokou koncentrací dipentaerythritolu byla ovlivněna molární hmotností. S klesající  $M_w$  v řadě 3D→5D→8D se zvyšovala rychlost liberace.
4. Oligoestery větvené dipentaerythritolem a plastifikované 30% triethylcitrátu vykazovaly v testu dobré adhezivní vlastnosti. Adhezi viskózních soustav k substrátu vysvětluje teorie smáčení. Podle této teorie jsou adhezivní vlastnosti materiálu dány schopností rozprostřít se po substrátu a vytvořit s ním těsný kontakt. Nejvyšší adhezivita byla zjištěna u oligoesterů 5D a 8D, které mají relativně nízkou dynamickou viskozitu. Lineární závislost mezi adhezivitou a viskozitou však nelze konstatovat.

## 9. SOUHRN

Cílem rigorózní práce bylo studium adhezivních vlastností větvených terpolymerů kyseliny D,L-mléčné, glykolové a dipentaerythritolu, plastifikovaných 30 % triethylcitrátu, a liberace flukonazolu a acikloviru z těchto nosičů. V teoretické části této práce jsou popsány mechanismy bioadheze, biologické substráty, polymery používané v terapeutických systémech léčiv a mechanismy liberace léčiv. V experimentální části byla měřena adhezivita plastifikovaných oligoesterů. Jako modelový podklad byl použit hydratovaný mucin z prasečích žaludků. Mírou adhezivity je maximální síla  $F_{\max}$  [N], která je potřebná pro odtržení vzorku od podkladu. Tato síla byla vztažena k velikosti kontaktní plochy a vyjádřena v jednotkách  $\text{mN}/\text{mm}^2$ . Nejvyšší adhezivita byla zjištěna u oligoesterů 5D a 8D s nízkou dynamickou viskozitou. Lineární závislost mezi adhezivitou a dynamickou viskozitou však nelze konstatovat. Dále byla sledována liberace léčiv (flukonazolu a acikloviru) při  $37^\circ\text{C}$ , jako disoluční médium byl použit fosfát citrátový pufr pH 7,0. Průběh liberace je tedy ovlivněn molární hmotností nosičů. Z testovaných oligoesterů se jako vhodné nosiče léčiv nakonec jeví oligoestery s vyšší molární hmotností.

## SUMMARY

The aim of this thesis was the study of adhesive properties of branched terpolymers of D,L-lactic acid, glycolic acid and dipentaerythritol, and release of fluconazole and aciclovir from these carriers. All tested carriers were plasticized with 30% of triethyl citrate (TEC). In the theoretical part of this thesis mechanisms of bioadhesion, biological substrates, polymers used in drug delivery systems and mechanisms of drug release are described. In the experimental part adhesivity of plasticized oligoesters was measured. Hydrated mucin isolated from porcine stomach was used as a model substrate for bioadhesion. The rate of adhesivity is the maximal force  $F_{\max}$  [N], which is required for the detachment of tested samples from the substrate. This force was related to the size of the contact surface and expressed in units  $\text{mN}/\text{mm}^2$ . The highest adhesivity was measured in oligoesters labelled 5D and 8D, which had low dynamic viscosity. However, it is impossible to state linear relationship between adhesivity and dynamic viscosity. The release of fluconazole and aciclovir at  $37^\circ\text{C}$  was also studied in experimental part. Phosphate citrate buffer pH 7,0 was used as a medium of drug release. The process of drug release is influenced by molecular weight of carriers. Among tested branched plasticized oligoesters, the oligoesters with higher molecular weight appear to be suitable as drug carriers.

## 10. LITERATURA

---

1. Kapiasová, J.: Oligoesterové matrice s protimikrobními látkami II. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2006, 61.
2. Veselá, L.: Liberace léčiv z bioadhezivních nosičů. Rigorózní práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2009, 74.
3. Třešňáková, J.: Vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných 10% triethylcitrátu. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2009, 58.
4. Jiráková, I.: Vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných 20% triethylcitrátu. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2009, 57.
5. Ahuja, A., Khar, R.K., Ali, J.: Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23, 1997, 489 – 515.
6. Wu, S.: Formation of adhesive bond, *Polymer Interface and Adhesion*. Marcel Dekker Inc, New York, 1982, 359 – 447.
7. Huang, Y. et al.: Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethered structures and site-specific surfaces. *J. Control. Rel.* 65, 2000, 63 – 71.
8. Tur, K.M., Ch'ng, H.-S.: Evaluation of possible mechanisms of mucoadhesion. *Int. J. Pharm.* 160, 1998, 61 – 74.
9. Junginger, H.E.: Mucoadhesive Hydrogels. *Pharm. Ind.* 53, 1991, 1056 – 1065.
10. Mortazavi, S.A., Smart, J.D.: An investigation of some factors influencing the in-vitro assesment of mucoadhesion. *Int. J. Pharm.* 116, 1995, 223 – 230.
11. Smart, J.D.: The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2005, 1556 – 1568.
12. Marriot, C., Gregory, N.P.: Mucus physiology and pathology. In: Lanaerts, V., Gurny, R. (Eds.): *Bioadhesive Drug Delivery Systems*, CRC Press, Florida, 1990, 1 – 24.
13. Gerson, S.J., Harris, R.R., In: Meyer, J., Squier, C.A., Gerson, S.J. (Eds.): *The Structure and Function of Oral Mucosa*. Pergamon, NY, 1984, 31 – 51.
14. Silberberg, A., Meyer, F.A.: Structure and function of mucus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 144, 1982, 53 – 74.



- 
15. McAuley, J.L., Linden, S.K., Png, C.W., King, R.M., Pennington, H.L., Gendler, S.J., Florin, T.H., Hill, G.R., Korolik, V., McGuckin, M.A.: MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Invest.* 117, 2007, 2313 – 2324.
  16. Thornton, D.J., Sheehan, J.K.: From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 2004, 54 – 61.
  17. Slomiany, B.L., Slomiany, A.: Role of mucus in gastric mucosal protection. *J. Physiol. Pharmacol.* 42, 1991, 147 – 161.
  18. Quraishi, M.S., Jones, N.S., Mason, J.: The rheology of nasal mucus: a review. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 23, 1998, 403 – 413.
  19. Wolf, D.P., Blasco, L., Khan, M.A., Litt, M.: Human cervical mucus. I. Rheologic characteristics. *Fertil. Steril.* 28, 1977, 41 – 46.
  20. Hook, M., Kjellen, L., Johansson, S., Robinson, J.: Cell-Surface Glycosaminoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 1984, 847 - 869.
  21. <http://www.drugdel.com/polymer.htm>, 15.11.2009.
  22. Brannon-Peppas, L.: Polymers in Controlled Drug Delivery. *Medical Plastics and Biomaterials*, Nov. 1997, 34 – 45.
  23. Middleton, J.C., Tipton, A.J.: Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. *Medical Plastics and Biomaterials*, March 1998, 30 – 39.
  24. Daniels, A.U., Chang, M.K.O., Adriano, K.P. et al.: Mechanical Properties of Biodegradable Polymers and Composites Proposed for Internal Fixation of Bone, *J. Appl. Biomat.* 1, 1990, 57 – 78.
  25. Lakshmi, S.N., Laurencin, C.T.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32, 2007, 762 – 798.
  26. Smart, J.D., Kellaway, I.W., Worthington, H.E.C.: An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 1984, 295 – 299.
  27. Gandhi, R.B., Robinson, J.R.: Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13, 1994, 43 – 74.
  28. U.S. Patent 3, 202, 577, Aug. 24, 1965.
  29. Barrer, R.M., Barrie, J.A., Wong, P.S.L.: The diffusion and solution of gases in highly crosslinked copolymers, *Polymer* 9, 1968, 609 – 627.

- 
30. Park, K., Robinson, J.R.: Bioadhesive polymers as platforms for controlled drug delivery: Method to study bioadhesion. *Int. J. Pharm.* 19, 1984, 107 – 127.
  31. Ch'ng, H.S., Park, H., Kelley, P., Robinson, J.R.: Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and evaluation of some water insoluble bioadhesive polymers. *J. Pharm. Sci.* 74, 1985, 399 – 405.
  32. Huntsberger, J.R.: Surface-energy, wetting, and adhesion. *J. Adhesion* 12, 1981, 3 – 12.
  33. Chen, J.L., Cyr, G.N., In: Manley, R.S.: Adhesion in biological systems. Academic press, New York, 1970, 163.
  34. Lehr, C.M., Poelma, F.G.J., Junginger, H.E., Tukker, J.J.: An estimate of turnover time of intestinal mucus gel layer in rat in situ loop. *Int. J. Pharm.* 70, 1991, 235-240.
  35. Kim, S.W.: Temperature Sensitive Polymers for Delivery of Macromolecular Drugs. In: Ogata, N., Kim, S.W., Feijen, J. et al. (eds): *Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems*, Tokyo, Springer, 1996, 126 – 133.
  36. Swarbrick, J., Boylan, J.C.: Biopolymers for Controlled Drug Delivery. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, vol. 2, Marcel Dekker Inc., 1990, 82.
  37. <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/221/221979.pdf>, 15.11.2009.
  38. <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyglycolide>, 15.11.2009.
  39. Boland, E.D., Wnek, G.E., Bowlin, G.L.: Poly(Glycolic Acid). *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2008, 2241 – 2248.
  40. [http://en.wikipedia.org/wiki/Poly\(lactic\\_acid\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Poly(lactic_acid)), 15.11.2009.
  41. Vert, M.: Poly(lactic acid)s. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2008, 2249 – 2258.
  42. Avgoustakis, K.: Poly(lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA)). *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2008, 2259 – 2269.
  43. Grizzi, I., Garreau, H., Li, S., Vert, M.: Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 16 (4), 1995, 305 – 311.
  44. Miller, R.A., Brady, J.M., Cutright, D.E.: Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J. Biomed. Mater. Res.* 11, 1977, 711 – 719.

- 
45. Rahman, M., Brazel, Ch. S.: The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Prog. Polym. Sci.* 29, 2004, 1223 – 1248.
46. Bodmeier, R., Paeratakul, O.: The distribution of plasticizers between aqueous and polymer phases in aqueous colloidal polymer dispersions. *Int. J. Pharm.* 103, 1994, 47 – 54.
47. Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., Zimčák, P.: *Antimykotika. Farmaceutická chemie IV.*, Karolinum, Praha 2006, 35 – 45.
48. Gupta, A.K., Sauder, D.N., Shear, N.H.: Antifungal agents: an overview, Part II. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1994, 30:911 – 33.
49. Grudzień, M. et al.: The structure-bioavailability approach in antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 1 – 4. In press.
50. Gupta, A.K., Katz, H.I., Shear, N.H.: Drug interactions with itraconazole, fluconazole and terbinafine and their management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 41, Part 1, 1999, 237 – 249.
51. Nam, N.-H. et al.: Carboxylic acid and phosphate ester derivatives of fluconazole: synthesis and antifungal activities. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 2004, 6255 – 6269.
52. Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., Zimčák, P.: *Antivirotika. Farmaceutická chemie IV.*, Karolinum, Praha 2006, 125 – 135.
53. Lincová, D., Farghali, H., et al.: *Antivirová chemoterapie. Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Karolinum, 2005, 478 – 484.
54. Podzimek, Š.: Stanovení molární hmotnosti polyesterů metodou SEC-MALS. *Synpo a.s. Pardubice*, 2005, 8.
55. Schade, A., Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kawashima, Y.: Aqueous colloidal polymer dispersions of biodegradable DL-lactide/glycolide copolymer as basis for latex films: a new approach for the development of biodegradable depot systems. *Int. J. Pharm.* 1995, 117, 209-217.
56. Šebestová, K.: Interakce větvených oligoesterových nosičů s hydrofilním prostředím. Rigorózní práce, *Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové*, 2005, 66.
57. Podzimek, Š.: Charakterizace větvených oligoesterů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem. *Synpo a.s. Pardubice*, 2006, 3.

- 
- 58.** Páblová, S.: Měření adheze oligoesterových nosičů. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2007, 94.
- 59.** Páblová, S.: Adhezivní vlastnosti oligoesterů kyseliny mléčné a glykolové větvených dipentaerythritolem. Rigorózní práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2008, 64.