

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

**Liberace acikloviru z mukoadhezivních
polyesterových matric**

Diplomová práce

Hradec Králové 2015

Hana Jakubíková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Velmi děkuji PharmDr. Evě Šnejdové, Ph.D. za její vřelý přístup, cenné rady a odborné vedení při vypracování této diplomové práce.

Hana Jakubíková

Obsah

1	Abstrakt.....	5
2	Abstract.....	6
3	Zadání práce.....	7
4	Úvod.....	8
5	Seznam zkratk.....	9
6	Teoretická část.....	10
6.1	Mukoadheze.....	10
6.2	Mukoadhezivní přípravky k aplikaci na sliznici úst.....	10
6.3	Aplikace na nosní sliznici.....	13
6.4	Mukoadhezivní přípravky k rektální aplikaci.....	15
6.5	Mukoadhezivní přípravky k vaginální aplikaci.....	16
6.6	Mukoadhezivní přípravky k oční aplikaci.....	17
6.7	Mukoadhezivní přípravky k aplikaci do plic.....	20
6.8	Mukoadhezivní přípravky k aplikaci na sliznici žaludku a střev.....	21
7	Experimentální část.....	23
7.1	Použité přístroje.....	23
7.2	Použité suroviny.....	23
7.3	Příprava pufru.....	24
7.4	Příprava substrátu pro mukoadhezivní test.....	24
7.5	Sestrojení kalibrační přímky acikloviru.....	24
7.6	Průběh disolučního testu.....	26
7.7	Stanovení množství uvolněného acikloviru.....	27
7.8	Výpočet množství uvolněného acikloviru.....	27
8	Výsledky.....	29
8.1	Spektrofotometrické stanovení acikloviru.....	29
8.2	Stanovení acikloviru metodou HPLC.....	36

9	Diskuze	38
9.1	Liberace acikloviru z polyesterových nosičů	39
9.2	Vliv plastifikátoru na liberaci acikloviru	41
9.3	Vliv typu polyesteru na liberaci acikloviru	43
10	Závěry	45
11	Seznam literatury	46

1 ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Jméno a příjmení: **Hana Jakubíková**

Název diplomové práce: Liberace acikloviru z mukoadhezivních polyesterových matric

Školitel: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Cílem diplomové práce bylo studium liberace acikloviru z polyesterů kyseliny mléčné a glykolové větvených mannitolem, pentaerythritolem, dipentaerythritolem nebo tripentaerythritolem a plastifikovaných ethylpyruvátém nebo methylsalicylátem. Teoretická část shrnuje poznatky o možnostech aplikace mukoadhezivních přípravků. Experimentální část práce se zabývá liberací acikloviru z polyesterových matric po jejich aplikaci na mukozní substrát. Krátkodobé disoluční testy acikloviru byly provedeny při teplotě 37 °C za použití fosfát citrátového pufru pH 7,4 jako disolučního média. Jako modelový substrát byl použit hydratovaný mucin z prasečích žaludků. Množství uvolněného acikloviru bylo stanoveno spektrofotometricky při 256 nm proti disolučnímu médiu z blank matrice a rovněž metodou HPLC. Liberace acikloviru byla ovlivněna molární hmotností polyesteru, použitým plastifikátorem a jeho koncentrací. Pro topickou aplikaci na sliznice je vhodným nosičem acikloviru polyester kyseliny mléčné a glykolové, větvený dipentaerythritolem v koncentraci 3 % a plastifikovaný methylsalicylátem v koncentraci 40 %.

Klíčová slova: mukoadheze, větvené polyestery, aciklovir, ethylpyruvát, methylsalicylát.

2 ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical technology

Name of the student: **Hana Jakubíková**

Title of diploma thesis: Aciclovir release from mucoadhesive polyester matrices

Consultant: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

The aim of this diploma thesis was to investigate aciclovir release from polyesters of lactic acid and glycolic acid branched with mannitol, pentaerythritol, dipentaerythritol and tripentaerythritol, and plasticized using ethyl pyruvate or methyl salicylate. Theoretical part sums up the application possibilities of mucoadhesive preparations. Experimental part of thesis deals with aciclovir release from polyester matrices applied on mucous substrate. Short term dissolution experiments of aciclovir were carried out in phosphate citrate buffer of pH 7, 4 at 37 °C. Mucus from porcine stomach was used as model substrate. The amount of aciclovir released was determined spectrophotometrically at 256 nm contrary to a blank sample, and also using HPLC method. Dissolution of aciclovir was affected by molar mass of polyester, and by the type and concentration of plasticizer. Polyester branched with 3 % of tripentaerythritol, and plasticized by 40 % of methyl salicylate was found to be most suitable carrier of aciclovir for topical application on mucous membrane.

Keywords: drug release, polyesters, branched polyesters, plasticizers.

3 ZADÁNÍ PRÁCE

V rámci teoretické části diplomové práce je zadáno shrnout poznatky o možnostech aplikace mukoadhezivních léčivých přípravků, zejména aplikace na sliznici úst, nosní sliznici, vaginální sliznici, sliznici očí, plic, střev a žaludku. V experimentální části práce budou studovány adhezivní vlastnosti polyesterů kyseliny mléčné a glykolové, větvených mannitolem, pentaerythritolem, dipentaerythritolem nebo tripentaerythritolem v koncentraci 3 % v reakční směsi a plastifikované ethylpyruvátém nebo methylsalicylátem.

Zadání experimentální části práce lze formulovat do následujících úkolů:

1. Zvolit vhodnou koncentraci plastifikátoru umožňující nanesení na vrstvu mucinu.
2. Připravit matrice tvořené polyesterem, plastifikátorem a aciklovirem v koncentraci 5 % tavením při teplotě do 80 °C.
3. Provést krátkodobé disoluční testy acikloviru při teplotě 37 °C za použití fosfát citrátového pufru pH 7,4 jako disolučního média.
4. Množství uvolněného acikloviru stanovit spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 256 nm proti slepému vzorku.
5. Zpracovat výsledky do tabulek, grafů a zjistit vliv použitého polyesteru a plastifikátoru na průběh acikloviru z polyesterových matric.

4 ÚVOD

Mukoadheze je přichycení adhezivního materiálu ke slizničnímu epitelu pokrytého tenkou vrstvou slizu. Využití mukoadhezivních léčivých přípravků umožňuje delší kontakt léčiva se sliznicí a udržení vysoké koncentrace léčiva v místě aplikace s cílem dosažení optimální biologické dostupnosti. Při použití mukoadhezivních léčivých přípravků je možné snížit celkovou dávku léčiva a omezit tím nežádoucí účinky. Tyto přípravky mohou být aplikované na sliznici dutiny ústní, sliznici očí, vaginální sliznici, sliznici nosu, plic, střev i žaludku. Dobré adhezivní vlastnosti mají polymery. Ideální polymer použitý v léčivých přípravcích by měl rychle přilnout k povrchu, měl by být netoxický, nedráždivý a mít optimální pH pro organismus. Polymer by měl být biodegradovatelný. Na Katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové byly syntetizovány polyestery kyseliny D,L-mléčné a kyseliny glykolové stupňovou kopolymerací s různým větvicím monomerem. Syntetizované polyestery byly analyzovány v Synpo, a.s. Pardubice.

5 SEZNAM ZKRATEK

3D	polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % dipentaerythritolu
3M	polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % mannitolu
3P	polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % pentaerythritolu
3T	polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % tripentaerythritolu
A	absorbance
EP	ethylpyruvát
GA	kyselina glykolová
HEC	hyetelosa
HPMC	hypromelosa
LA	kyselina mléčná
MS	methyلسalicylát
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Mukoadheze

Při mukoadhezi dochází k vytvoření vazeb mezi polymerem nebo jiným syntetickým či přírodním materiálem a vrstvou hlenu pokrývajícího sliznici. ^[1] Vazba může být ukončena např. rozpadnutím léčivého přípravku nebo při obměně hlenu na povrchu mukózní sliznice. Výhodou léčivých přípravků využívajících mukoadhezi je prodloužení kontaktního času léčiva a sliznice s možností prodlouženého uvolňování léčiva, zvýšení biologické dostupnosti léčiva a udržení dostatečné koncentrace léčiva v místě aplikace, což umožňuje dosažení optimálního lokálního nebo systémového účinku. Při využití mukoadhezivního léčivého přípravku je možné snížit celkovou dávku léčiva a tím omezit nežádoucí účinky, což může vést ke zvýšení compliance. Mukoadhezivní lékové formy jsou vhodné pro aplikaci na sliznici dutiny ústní, sliznici očí, vaginální sliznici, sliznici nosu, plic, střev i žaludku. ^[2]

6.2 Mukoadhezivní přípravky k aplikaci na sliznici úst

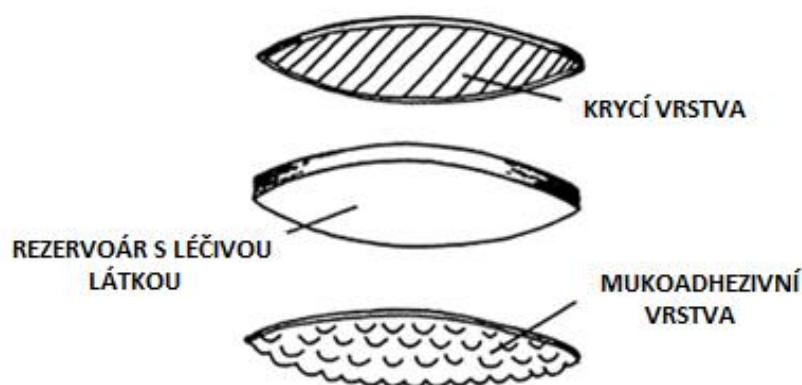
Ústní dutina je využívána pro systémové i lokální podání léčiva. Pro absorpci léčiva je nejčastěji využívána sliznice pod jazykem – sublingvální sliznice a sliznice tváří - bukální sliznice. Sliznice pod jazykem je velmi tenká a propustnější než bukální sliznice, ale kvůli velké produkci slin se k aplikaci léčiva nepoužívá, jestliže požadujeme, aby přípravek působil dlouhou dobu. Není tedy vhodná pro aplikaci mukoadhezivních přípravků. Naopak je výhodná, jestliže požadujeme rychlý nástup účinku a krátkodobé trvání. Bukální lékové formy pro prodloužené uvolňování léčiva mohou být tvořené rezervoárem léčiva obklopeného polymerní membránou, ze kterého se řízeně uvolňuje léčivo, nebo se jedná o směs polymeru a léčiva, ze které se léčivo uvolňuje difúzí. ^[3,4]

Bukální tablety jsou malé, oválné s průměrem přibližně 5 – 8 mm. Tablety po aplikaci vytvoří adhezní vrstvu, díky které se přichytí na vrstvu slizu a zůstávají na místě až do kompletního rozpuštění. Tyto tablety mohou být použity na některých místech v dutině ústní, včetně patra, sliznice tváří a v oblasti mezi rty a dásněmi. Mukoadhezivní bukální tablety po aplikaci neomezují pacienta v konzumaci jídla a nápojů. Nevýhodou tablet je, že léčivo může být uvolněno do slin a spolknuto. Aby se zlepšila biologická dostupnost, mohou být strany tablety s výjimkou strany, která je v přímém kontaktu

se sliznicí, potaženy ve vodě nerozpustným materiálem, např. ethylcelulosou. Mukoadhezivní tablety je možno použít jako alternativu pro systémové podání léčiv procházejících first-pass metabolismem. ^[3] Např. biologická dostupnost testosteronu u psů se zvýšila z 1 % na 14 % při použití mukoadhezivních tablet místo perorálně podaných tablet. ^[5] Podobně je možné zvýšit biologickou dostupnost propranololu po podání mukoadhezivních bukálních tablet. Propranolol podléhá po perorálním podání vysokému first-pass metabolismu, což snižuje jeho biologickou dostupnost. Plazmatická hladina propranololu se také může v prvních dvou hodinách velmi lišit podle metabolické aktivity jater, což je další důvod pro využití mukoadhezivních tablet. Při bukálním podání propranololu ale může dojít k vážnému podráždění bukální sliznice v důsledku lokální toxicity, a to i přesto, že je bukální sliznice považována za odolnější proti poškození než jiné slizniční membrány. ^[6]

K bukální aplikaci je možno využít náplasti, které jsou menší a snadněji se přizpůsobí povrchu sliznice. Náplasti se skládají z 3 základních vrstev. Z mukoadhezivní vrstvy umožňující přichycení na bukální sliznici po dostatečně dlouhou dobu, z vrstvy obsahující léčivou látku, která se řízeně uvolňuje, a z krycí vrstvy. Krycí vrstva se používá k řízení směru uvolňování léčiva – zajišťuje, že se léčivo uvolňuje pouze do vrstvy slizu, čímž se minimalizuje ztráta léčiva do slin. Také snižuje deformaci a poškození náplasti během doby aplikace. ^[3]

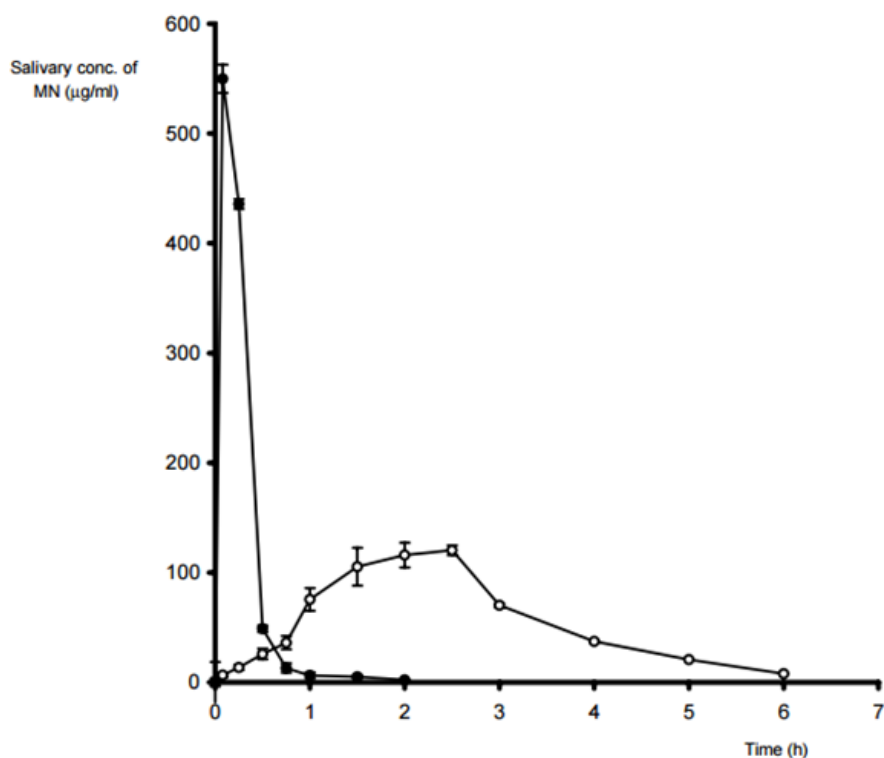
Obr.1: Schematické znázornění složení mukoadhezivní náplasti ^[7]



Příprava těchto náplastí se provádí dvěma způsoby - odléváním roztoku a lisováním. Příprava vrstvy obsahující rezervoár s účinnou látkou pomocí odlévání probíhá tak, že roztok obsahující léčivou látku a polymer se nalije na krycí vrstvu náplasti, ze které se poté nechá odpařit rozpouštědlo. Při přípravě lisováním se pomocné a účinné látky lisují do požadované velikosti vrstvy, ze které se poté vyřezávají nebo vysekávají náplasti

požadované velikosti a tvaru. ^[3] Jejich výhodou je, že pomáhají chránit povrch rány a tím snižují bolest a účinněji léčí nemoc. Ideální náplast by měla být flexibilní, pružná, měkká, ale dostatečně pevná, aby se nepoškodila při pohybu úst, ale aby se dostatečně přizpůsobila sliznici. Bukální náplasti je možné využít např. při lokální aplikaci mikonazolu, který je širokospektrým antimykotikem. Pro aplikaci na sliznici ústní dutiny už byly vyvinuty mukoadhezivní tablety, gely a žvýkácké gumy obsahující mikonazol. Minimální inhibiční koncentrace mikonazolu proti *Candida albicans* je 5 µg/ml. Podle studie Nafee et al. ^[8] byla při použití gelu udržena terapeutická koncentrace mikonazolu ve slinách udržena přibližně 1,5 hodiny a při použití bukální náplasti déle než 6 hodin. Grafické znázornění na obr. 2.

Obr.2: Koncentrace mikonazolu ve slinách při použití mukoadhezivní náplasti (○) a orálního gelu (●) ^[8]



Bukální náplasti byly použity pro aplikaci např. kalcitoninu u králíků nebo glibenklamidu. Glibenklamid je antidiabetikum, které je kompletně metabolizováno játry. Při využití mukoadhezivních tablet by bylo možné dosáhnout rychleji požadované plazmatické koncentrace glibenklamidu, zlepšit biologickou dostupnost a vyhnout se first-pass metabolismu. Ve studii Muzib a Kumari bylo za použití HPMC dosaženo řízeného uvolňování z bukální náplasti po dobu delší než 6 hodin. ^[3, 9, 10]

Polotuhé lékové formy jako masti a gely se snadno dispergují po povrchu sliznice. Jejich nevýhodou ale je, že neumožňují tak přesné dávkování jako tablety nebo náplasti. Mukoadhezivní gely v bukální aplikaci se používají zejména pro léčbu periodontitidy, což je zánětlivé infekční onemocnění podpůrných tkání zubů. Pro léčbu byl použit např. gel složený z HEC, polykarbofilu a povidonu, který jako účinnou látku obsahoval tetracyklin. Tento gel výrazně snižuje množství patogenních bakterií v dutině ústní. [3, 11] Výhodou aplikace na sliznici úst je vyhnutí se podmínkám v gastrointestinálním traktu, které mohou být pro absorpci a účinek léčiva nepříznivé, jako je kyselé žaludeční pH a vysoký obsah enzymů. Také se při tomto způsobu aplikace léčivo vyhne first-pass metabolismu díky přímé absorpci do portální žíly. Další výhodou je, že sliznice úst je snadno dostupná pro aplikaci a v případě nežádoucích účinků umožňuje i snadné odstranění léčivého přípravku. Tento způsob aplikace je také dobře akceptovatelný pacientem v porovnání s jinými než perorálně podávanými léčivy. Hlavní nevýhodou je malá propustnost bukální sliznice, zejména v porovnání se sliznicí pod jazykem. Bukální sliznice má také malou plochu pro absorpci léčiva a je zde vysoká enzymatická aktivita. Produkce slin vede ke zředění léku a jejich polknutí způsobuje ztrátu účinné látky, která je ve slinách rozpuštěná nebo suspendovaná. Vlivem slin může dojít k neúmyslnému odstranění lékové formy a následnému spolknutí. [3, 12]

6.3 Aplikace na nosní sliznici

Nasální sliznici je možné využít pro systémovou i lokální aplikaci. U velkých molekul léčiv je při nasální aplikaci špatná biologická dostupnost, obvykle 5 – 10 %. U proteinů, DNA a některých jiných makromolekul byly lepší výsledky získány při použití mukoadhezivních polymerů. [13]

Nasální aplikace je perspektivní pro systémové podání antibiotik, a to zejména těch, která se vyznačují nevyrovnanou a nekompletní absorpcí. Prodloužený kontakt antibiotika s nosní sliznicí může narušit přirozenou mikroflóru, zejména jsou-li použita širokospektrá antibiotika. Ve studii Lim et al. byly připraveny mukoadhezivní mikrosféry, které obsahovaly kyselinu hyaluronovou, chitosan a gentamicin. Podle studie bylo při použití kombinace kyseliny hyaluronové a chitosanu dosaženo prodlouženého uvolňování gentamicinu a vysoké biodostupnosti. Kyselina hyaluronová byla použita zejména pro své výrazné mukoadhezivní vlastnosti a chitosan pro zvýšení penetrace nosní sliznicí. Chitosan se ukázal jako vhodný polymer i pro aplikaci dalších

antibiotik jako je vankomycin a tobramycin. ^[13-15] Ve studii Ozsoy at al. byla použita pro přípravu gelu s ciprofloxacinem hypromelosa, hyetelosa a methylcelulosa. Po použití gelu hypromelosa byla biodostupnost ciprofloxacinu téměř shodná s biodostupností ciprofoxacinu podaného perorálně. Při použití gelu hyetelosa nebo gelu methylcelulosa obsahujícího ciprofloxacin byla biodostupnost podstatně nižší než po perorálním podání. ^[13, 16]

Další možností je využití nosní sliznice pro aplikaci menších organických molekul. Zkouší se např. podávání morfinu pro onkologické pacienty, protože je zajištěna dobrá tolerance pacientem a rychlý nástup účinku. Při orální aplikaci morfinu je biologická dostupnost přibližně 20 – 30 %, ale při použití mukoadhezivní lékové formy s chitosanem dojde ke zvýšení biologické dostupnosti přibližně na 60 %. ^[13, 17]

Přes nosní sliznici je možné podávat i některé proteiny. Zejména se studuje možnost této aplikace u inzulinu, nejčastěji za využití chitosanu jako vhodného polymeru pro nosní aplikaci. Inzulin je možné použít ve formě prášku, který je výhodnější než použití tekutých přípravků. Biologická dostupnost inzulinu ve formě prášku je v porovnání se subkutánně aplikovaným inzulinem nižší, proto je potřeba vyšších dávek. To může být způsobeno i vytvořením bariéry v důsledku vysoké viskozity mukoadhezivních prášků, která brání absorpci inzulinu. ^[13, 18]

Další možností využití je očkování. U infekcí jako je např. chřipka, černý kašel a spalničky získávají patogeny přístup k organismu přes sliznice, proto jsou tyto nemoci vhodné k očkování přes nosní sliznici. Tento způsob aplikace je jednoduchý, levný a není nutné používat jehly, které mohou být potenciálním zdrojem infekce. ^[13, 19]

Výhodou nosní aplikace je, že nosní sliznice má vlivem mikroklků velkou plochu pro vstřebávání léčivé látky. Navíc je sliznice tenká, vysoce vaskularizovaná a v porovnání s jinými sliznicemi porézní. To zajišťuje rychlou absorpci a rychlý nástup terapeutického účinku. Absorbované látky do krevního oběhu obcházejí first-pass metabolismus. Nosní aplikace je pohodlná pro pacienta a riziko předávkování je malé. V případě aplikace vyšší dávky může být nosní sliznice vypláchnuta pro odstranění nadbytečného množství neabsorbovaného léčiva. ^[13]

Nevýhodou je, že do nosu může být aplikované pouze omezené množství léčivého přípravku, protože při použití velkého množství může dojít k narušení přirozených funkcí nosu. Část lékové formy může být z nosní sliznice odstraněna vlivem kýčání. Kvůli prodlouženému kontaktu lékové formy s nosní sliznicí může docházet k jejímu poškození, proto by mukoadhezivní polymery nebo jiné pomocné látky neměly setrvat

na nosní sliznici déle než několik hodin, aby nedošlo k poškození mukociliárního systému. Biodostupnost léčiv z mukoadhezivních přípravků může být různá podle použitého polymeru, protože v některých případech nemusí být léčivo kompletně uvolněno z polymerové matrice před odstraněním z nosního epitelu.^[13]

6.4 Mukoadhezivní přípravky k rektální aplikaci

Rektální sliznice je vhodná pro lokální i systémovou léčbu. Absorpce léčiv přes rektální sliznici probíhá především difúzí. Přes lipidovou membránu ale špatně procházejí peptidy a proteiny. Byla provedena řada studií, která zkoumala možnosti aplikace peptidů rektální cestou. Např. při aplikaci inzulínu bylo k dosažení terapeutické koncentrace v plazmě nutné použití dalších pomocných látek, zejména modulátorů penetrace.^[4, 7]

Používané mukoadhezivní formy jsou roztoky, pěny, gely.^[4] Mukoadhezivní polymer může být použit i pro přípravu rektálních čípků u kterých je výhodné, aby po aplikaci setrvaly v dolní části rekta. Čípek se totiž může po aplikaci pohybovat do horní části rekta. Tomu je možné zabránit potažením čípku vrstvou mukoadhezivního polymeru, který se přichytí na vrstvě mucinu a zabraňuje jeho dalšímu pohybu.^[7] Např. u rektálních čípků obsahujících jako léčivo lidokain se biologická dostupnost výrazně zvyšuje při použití karbomerů.^[20]

Další možností je např. použití polykarbofilu jako mukoadhezivního polymeru při přípravě čípků s ketoprofenem - tím je zajištěno postupné uvolňování léčiva a jeho konstantní hladina. To může být způsobeno tím, že polykarbofil slouží jako difúzní bariéra a pomáhá tak regulovat uvolňování léčiva.^[7]

In situ gelové systémy kombinují termosenzitivní a mukoadhezivní vlastnosti. Termosenzitivita přípravku může zajistit, že při teplotě místnosti je přípravek kapalný, což umožní jeho přípravu a usnadní manipulaci a zajistí snadné rozprostření v rektální dutině, kde se z něj stane při tělesné teplotě gel.^[21] Např. při použití in situ gelových systémů byla zjištěna u krys vyšší biodostupnost paracetamolu než při použití běžných pevných rektálních čípků. Celkové množství systémově dostupného léčiva pro farmakologický účinek bylo stejné, ale u člověka bylo dosaženo za kratší čas vyšší koncentrace léčiva v plazmě.^[22, 23]

Nevýhodou rektální aplikace je značná variabilita v absorpci léčiva, protože absorpce může být ovlivněna obsahem rekta.^[7] Navíc absorpce je ovlivněna nízkým objemem

rektálních tekutin. Tento způsob aplikace je výhodný u léčiv, která podléhají first-pass metabolismu a u léčiv, která se omezeně absorbují v horní části gastrointestinálního traktu, léčiv dráždicích žaludeční sliznici a u léčiv vyžadujících vysoké dávky, které ale nemohou být snadno formulovány do pevné orální lékové formy. [4, 21]

6.5 Mukoadhezivní přípravky k vaginální aplikaci

Aplikace mukoadhezivních lékových forem přes vaginální sliznici se nejčastěji používá pro dosažení lokálního účinku k terapii infekčních onemocnění, k podání hormonální antikoncepce a suplementaci hormonů. Může však sloužit i k dosažení systémového účinku. Léčivý přípravek použitý na vaginální sliznici musí být snadno aplikovatelný, nesmí výrazně ovlivnit množství a složení vaginálního sekretu a nesmí narušovat přirozenou vaginální mikroflóru. [24]

Gely pro vaginální aplikaci se většinou používají k lokálnímu působení. Mohou sloužit k obnově fyziologického pH a v závislosti na účinné látce mohou vykazovat antikoncepční nebo mikrobicidní efekt. Navíc mají díky vysokému obsahu vody hydratační a lubrikační účinky, kterých se využívá při použití gelů bez účinné látky pro zvlhčení pochvy v případě vaginální suchosti v průběhu menopauzy. [25, 26] Jako nosiče léčiv se používají polymery. Je možno využít přírodních, polysyntetických i syntetických polymerů. Z přírodních polymerů je nejčastěji využívána kyselina hyaluronová a alginát sodný. Z polysyntetických látek je používán chitosan a deriváty celulosy. Nejčastěji využívané polymery pro vaginální aplikaci jsou však syntetické deriváty kyseliny polyakrylové – karbomery a polykarbofil. [27-29] K obnovení kyselého vaginálního prostředí při vaginálních infekcích byl v práci Ahmad et al. použit gel složený z guarové klovatiny, xanthanové klovatiny a hypromelosy, který jako hlavní látku ovlivňující pH obsahoval dihydrogencitronan sodný a klotrimazol nebo metronidazol v závislosti na typu infekce. [30] V práci Senyigit et al. byl zkoušen vaginální gel chitosanu obsahující ekonazol a mikonazol. [31] Mezi hlavní výhody vaginálních gelů patří dobrá tolerance, snadná výroba a nízká cena. Jejich nevýhodou je nepohodlná aplikace a možný únik gelu po podání. [32]

Vaginální tablety umožňují přesné dávkování léčiva a zajišťují jeho lepší stabilitu, umožňují snadnější manipulaci a skladování. V porovnání s polotuhými lékovými formami je aplikace tablet jednodušší, protože není zapotřebí aplikátorů. Při vaginální aplikaci je možné použít dispergovatelné nebo matricové tablety. Dispergovatelné

tablety se po aplikaci rozptýlí po vaginální sliznici, z matricových tablet se postupně uvolňuje léčivo. ^[33] Podle práce Bouckaert et al. při jednorázové aplikaci mukoadhezivních vaginálních tablet obsahujících metronidazol nebyl v porovnání s orálně aplikovaným metronidazolem podávaným 2x denně o stejném celkovém obsahu účinné látky pozorován zásadní rozdíl v účinnosti. ^[34] V pozdější studii Voorspoels et al. byla prokázána nižší účinnost při jednorázové aplikaci vaginální tablety než při opakované aplikaci gelu. ^[35]

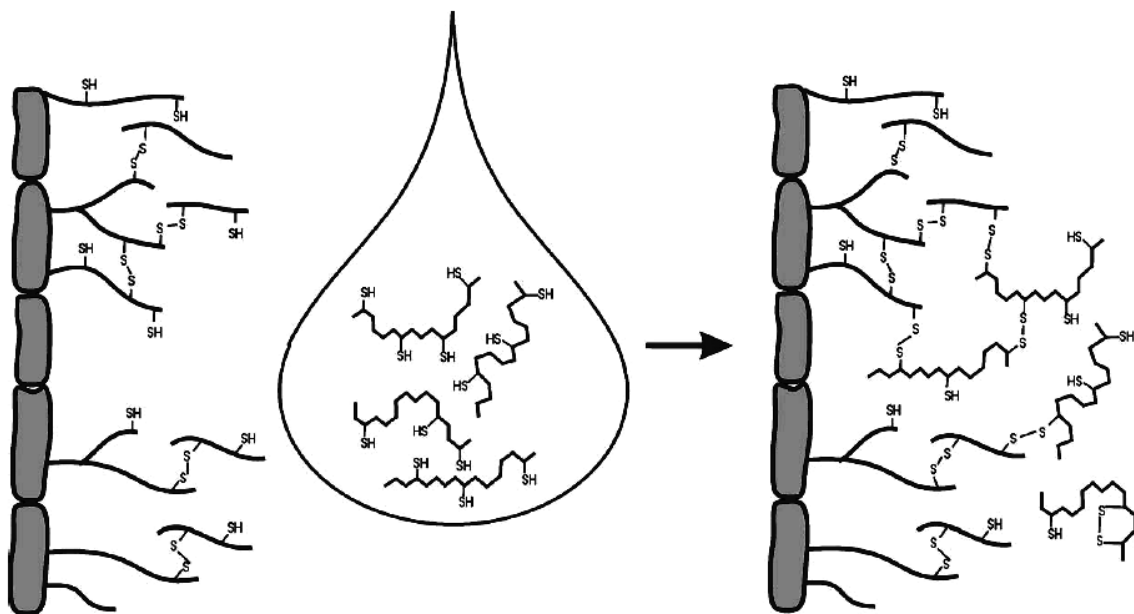
Vaginální kuličky jsou lékové formy, které se rozpouštějí nebo rozpadají ve vaginální dutině, což vede k postupnému uvolňování léčiva v závislosti na použitých pomocných látkách. Použití mukoadhezivního polymeru při výrobě kuliček obvykle snižuje počet aplikací za den, a tím zvyšuje compliance pacienta. Při jejich přípravě se používá jeden nebo více hydrofilních mukoadhezivních polymerů jako je karmelosa sodná sůl nebo polyakrylová kyselina s pomocnými a účinnými látkami. ^[36] Ve formě kuliček se nejčastěji podává dehydroepiandrosteron sulfát, mikonazol a progesteron. ^[32] Další možností vaginální aplikace je využití mikročásticových a nanočásticových systémů. ^[36] Výhodou vaginálních mukoadhezivních přípravků je bezbolestnost a jednoduchost při zavádění pacientkou a v případě intolerance nebo výskytu nežádoucích účinků snadné vyjmutí. Další výhodou je vyhnutí se first-pass efektu, omezení interakce s potravou a omezení nežádoucích gastrointestinálních účinků. Navíc je potřeba nižších dávek, které jsou nutné k dosažení terapeutického účinku. Nevýhodou je, že vaginální sliznice prochází cyklickými změnami ovlivněnými hladinou estrogenů, které ovlivňují absorpci léčiva. ^[37] Vaginální sliznice je také ovlivněna věkem a sexuální aktivitou, což může ovlivnit účinek vaginálně aplikovaných léčiv. ^[24]

6.6 Mukoadhezivní přípravky k oční aplikaci

K léčbě onemocnění očí se nejčastěji používají tekuté lékové formy - oční kapky. Vodné oční kapky mají pouze omezenou terapeutickou účinnost díky špatné biologické dostupnosti. K dosažení terapeutických hladin je nutná častá aplikace léčiva. Navíc po aplikaci hladina léčiva v oku kolísá – po počátečním období předávkování následuje delší období poddávkování. Vysoká koncentrace léčiva nebo častá aplikace může vést k nežádoucím účinkům a poškození oka. Výhodné je využití mukoadhezivní lékové formy pro oční aplikaci - viskózní roztoky nebo tekuté částicové systémy. ^[38, 39]

Při vývoji viskózních roztoků se předpokládalo, že viskozita je hlavním faktorem, který ovlivňuje setrvání očních kapek v prekorneální oblasti oka, a tím zvyšuje i biologickou dostupnost. Při použití látek zvyšujících viskozitu ale nedošlo k prokazatelnému zlepšení biodostupnosti. Kromě viskozity se tedy na zvýšení biologické dostupnosti podílí i řada dalších faktorů jako např. molekulová hmotnost a bioadhezivní vlastnosti polymeru. Při přípravě viskózních roztoků mohou být použity např. thiolované polymery – thiomery, které vytváří kovalentní vazby s cysteinovými skupinami přítomnými v mukózní vrstvě. Ve vodném prostředí dochází k oxidaci za vzniku disulfidických můstků, které vytvářejí prostorovou síť. Interakce thiomery s mucinem vede ke zvýšení viskozity a zvýšení mukoadheze. ^[39, 40] Např. při použití polykarbofilu, který má dobrou schopnost mukoadheze na spojivkový mucin, byla prokázána ve studii Hui a Robinson větší biodostupnost suspenzních kapek při očním podání než při použití suspenze bez polymeru. Jako modelové léčivo byl použit progesteron. Celkové množství léčiva systémově dostupného pro farmakologický účinek je přibližně 4x vyšší než při použití suspenze. ^[40]

Obr.3: Schematické znázornění vytvoření vazeb mezi thiomerym a mucinem ^[39]



Při využití tekutých částicových systémů se může jednat o liposomy nebo mikrosféry a nanosféry. ^[39] Liposomy jsou kulovité útvary, jejichž povrch je utvářen dvouvrstvou polárních lipidů a uvnitř je uzavřena část vodného prostředí. ^[41] Liposomy jsou stabilní, biologicky kompatibilní a biologicky rozložitelné. ^[42] Používání liposomů v očních

přípravcích je omezeno rychlým vyplavením z prekerneální oblasti oka. Rychlou eliminací se vyznačují zejména neutrální liposomy a negativně nabitě liposomy. Kladně nabitě liposomy vykazují prodlouženou prekerneální retenci díky elektrostatické interakci se záporně nabitým rohovkovým epitelem. ^[39, 43, 44] Zvýšení adheze k povrchu rohovky je možné dosáhnout přípravě disperze liposomů v mukoadhezivním gelu nebo obalením liposomu polymerem. ^[45] Např. liposomy obalené karbomerem obsahující tropikamid se podle studie Davies et al. vyznačovaly delší prekerneální retencí než liposomy neobalené. ^[46]

U mikrosférových a nanosférových očních systémů se předpokládá možnost zachycení částic v oční slizové vrstvě a interakce polymerního řetězce s mucinem, což způsobí pomalejší odplavení z oka. Nevýhodou je nutnost dodržení určitého rozměru částic, které musí být menší než 10 μm . Dodržení této velikosti umožní optimální technologické zpracování a zajistí tak řízené uvolňování léčiva, navíc se tak zabrání podráždění oka. Kinetika uvolňování léčiva je ovlivněna složením a postupem přípravy částic, molekulovou hmotností, rychlostí degradace polymeru a fyzikálně - chemickými vlastnostmi molekuly léčiva. ^[39] Mikrosféry chitosanu s aciklovirem byly použity v práci Genta et al. pro podání acikloviru králíkům. V porovnání se suspenzními očními kapkami bylo při použití polymeru dosaženo prodlouženého uvolňování a vyšší koncentrace. Biologická dostupnost acikloviru po očním podání je nízká. Pokud je aciklovir podáván například ve formě oční masti, musí být aplikován každé čtyři hodiny. ^[47]

V oční aplikaci je možné využít i polotuhé mukoadhezivní léčivé přípravky - hydrogely. Hydrogely jsou rozděleny do dvou skupin - klasické předem připravené gely a in situ gelové systémy. In situ gelové systémy jsou viskózní kapaliny, které za fyziologických podmínek vytvoří viskoelastický gel. ^[39] Zvýšená biodostupnost umožňuje méně časté dávkování za současného použití nižší koncentrace léčiva, čímž se sníží riziko výskytu vedlejších účinků. Doba kontaktu léčivého přípravku s rohovkou se může prodloužit i na několik hodin. Při použití nižší koncentrace léčiva je nutné použít vyšší koncentraci polymeru. ^[39, 48, 49] Koncentrace polymeru ovlivňuje výsledné vlastnosti lékové formy. Optimální koncentrace polymeru v přípravku závisí na použitém polymeru a je pro každý polymer jiná. ^[50]

Pevné lékové formy zahrnují oční inzerty. Oční inzerty jsou sterilní přípravky určené k podání do spojivkového vaku. Jsou tvořené zásobníkem účinné látky vsazeným do matrice nebo spojeným s membránou řídící rychlost uvolňování. Léčivá látka se poté

uvolňuje po určenou dobu. ^[51] Oční inzerty mají dlouhý kontaktní čas s povrchem oka a zajišťují řízené uvolňování látek, což vede ke snadnému dosažení potřebné koncentrace léčivé látky v oku po stanovenou dobu. Na rozdíl od tekutých lékových forem umožňují přesnější dávkování, čímž se snižuje riziko výskytu systémových nežádoucích účinků. Jejich nevýhodou je, že inzerty s nedostatečnými mukoadhezivními vlastnostmi se mohou pohybovat po povrchu oka a vyvolávat podráždění. Navíc při své degradaci mohou způsobovat dočasné rozmazané vidění. ^[38] K léčbě syndromu suchého oka byly např. vyvinuty oční inzerty, které se rozpouštějí při kontaktu s povrchem oka. Pro zahájení procesu rozpouštění je nutné použít spolu s nimi i umělé slzy. Tyto oční inzerty nejsou často používanou lékovou formou hlavně kvůli vysokým nákladům na jejich výrobu, obtížné aplikaci pro starší osoby a kvůli nepříjemnému pocitu cizího tělesa v oku po aplikaci. ^[52] Oční inzerty byly použity i pro aplikaci gentamicinu u psů v práci Gurtler et al. Po jednorázové aplikaci ve vodě rozpustného inzertu byla požadovaná hladina gentamicinu zajištěna po dobu delší než 72 hodin. ^[53]

Aplikaci do očí je možné použít pouze pro terapii lokálního onemocnění. Biologická dostupnost léčiv aplikovaných do oka je nízká díky ochranným mechanismům oka. Cizí látky, které se dostanou do oka, včetně léčiv, jsou odstraněny mrkáním a slzením, navíc bariérová funkce rohovky snižuje absorpci léků. ^[39]

6.7 Mukoadhezivní přípravky k aplikaci do plic

Léčivo aplikované do plic působí lokálně v plicích nebo může vyvolat systémový účinek. Schopnost částic pronikat do plic je dána jejich velikostí, která se vyjadřuje jako aerodynamický průměr. Aerodynamický průměr je průměr částice tvaru koule o hustotě $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, který má stejnou rychlost při depozici jako částice uvažovaná. Lze jej popsat následující rovnicí:

$$d_a = \sqrt{\frac{\rho}{\rho_a} d_g}$$

kde d_a je aerodynamický průměr, d_g je geometrický průměr částice, ρ je hustota částice a ρ_a je $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. ^[54]

Pro aplikaci do plic jsou výhodné nanočásticové systémy, které umožňují prodloužené uvolňování léčiva v plicích a do systémové cirkulace, což vede ke snížení frekvence

dávkování. Výhodné je využití nanočástic s inzulinem pro aplikaci do plic. Např. při použití nanočástic s biodegradabilním kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové a inzulinem došlo po aplikaci do plic morčete ke snížení hladiny glukosy, kdy účinek byl prodloužen o 48 hodin v porovnání s použitím roztoku inzulinu. Při použití polybutylkyanoakrylátu jako nosiče inzulinu byl hypoglykemický účinek prodloužen o více než 20 hodin. ^[55, 56]

Pro lokální aplikaci se ve studii Vaughn et al. zkoušel itraconazol ve formě nanočástic s Polysorbátem 80 a Poloxamerem 407 k léčbě plísňových infekcí, které obvykle vstupují do dýchacím ústrojím a šíří se lymfatickým systémem. Při léčbě je nutné dodržet, aby v plicích byla trvale vysoká koncentrace léčiva při udržení sérové hladiny nad minimální letální koncentraci, ale aby koncentrace v séru byla nižší než při orální aplikaci kvůli omezení toxicity. V plicní tkáni byla zjištěna podstatně vyšší koncentrace itraconazolu než po orální aplikaci. ^[57]

Vytvoření nanočástic obsahujících kombinaci rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu je výhodné pro aplikaci do plic při léčbě tuberkulózy. Při jejich použití se prodlužuje doba účinku léčiv a snižuje se celková dávka potřebná pro léčbu. ^[58]

Plíce mají velkou absorpční plochu a jsou vysoce propustné pro rozpuštěné látky, navíc mají omezenou proteolytickou aktivitu. ^[54] Aplikace do plic umožňuje rychlý nástup účinku, vyhnutí se first-pass metabolismu a podání některých látek, které nelze aplikovat perorálně díky vysokému enzymatickému rozkladu a špatné propustnosti střevní membrány. Navíc je možné ji použít pro aplikaci plicních buněk jako jsou alveolární makrofágy pro léčbu některých onemocnění, např. tuberkulózy. ^[59, 60]

6.8 Mukoadhezivní přípravky k aplikaci na sliznici žaludku a střev

Mukoadhezivní přípravky, které se perorálně aplikují jednou denně, se musí adherovat buď na sliznici žaludku nebo střeva, aby se zajistilo prodloužené uvolňování léčivé látky. Pokud se zachytí na sliznici žaludku, je z přípravku uvolňována kontinuální dávka léčiva, která postupuje dále do střeva. Při přípravě takových lékových forem je ale nezbytné použití mukoadhezivního polymeru, který se vyznačuje vysokou adhezivitou. Žaludek totiž vykonává neustálé pohyby, zejména během jídla, které mohou způsobit pohyb lékové formy po sliznici žaludku. Dalším problémem je, že hlen na žaludeční sliznici je rychle obměňován, takže po adhezi mukoadhezivního polymeru na hlen může být polymer společně se slizem odstraněn ještě před uvolněním léčiva

z léčivého přípravku. Nevýhodu aplikace na žaludeční sliznici je i vliv pH na bioadhezi. Tyto problémy se dají obejít např. využitím polymerů, které se adherují přímo k epitelální membráně namísto slizové vrstvy nebo začleněním mukolytických činidel do léčivého přípravku, které uvolní povrch sliznice a umožní na ní adhezi polymeru. Nevýhodou je, že může dojít k většímu podráždění sliznice a nežádoucím účinkům. Podobně je tomu i při adhezi na sliznici střeva, i když zde je pH vhodnější pro mukoadhezi. ^[7]

Možností aplikace na žaludeční sliznici je např. vytvoření mukoadhezivních mikrosfér, které se přichytí na sliznici žaludku a řízeně uvolňují léčivo tak, aby bylo kontinuálně dodáváno do horní části gastrointestinálního traktu. To je výhodné zejména pro látky, které jsou méně rozpustné nebo jsou rozkládány v alkalickém pH. Příkladem je např. zvýšení biologické dostupnosti a účinnosti antibiotik při dlouhodobé lokální léčbě peptických vředů vyvolaných infekcí *Helicobacter pylori*. ^[61]

Podmínky v žaludku jsou rozdílné u každého jedince, zejména se vyskytují rozdíly v hodnotě pH a motilitě žaludku, což ovlivňuje určení optimální dávky při terapii. Aplikace na žaludeční sliznici je vhodná pouze pro některá léčiva. Při lokální a dlouhodobé terapii může dojít ke zvýšení biologické dostupnosti, zvýšení terapeutické účinnosti a snížení velikosti dávky. ^[61]

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použité přístroje

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

Centrifuga EBA 20, Hettich

Digitální stolní pH metr, HANNA HI 221

Digitální váhy KERN 572, max. 421 g, d = 0,001 g

Horkovzdušná sušárna ULE 400, Memmert

Spektrofotometr SPECORD 205, Analytik Jena, SRN

Třepačka s vodní lázní, GFL 1083, Analytik Jena, SRN

7.2 Použité suroviny

Aciklovir (Pliva Lachema)

Čištěná voda (Faf UK HK)

Ethylpyruvát (Sigma – Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner, s.r.o.)

Kyselina citronová monohydrát (Lachema, Brno)

Methylsalicylát (Sigma – Aldrich, USA)

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

Polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % dipentaerythritolu (Faf UK HK)

Polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % mannitolu (Faf UK HK)

Polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % pentaerythritolu (Faf UK HK)

Polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové, větvený 3 % tripentaerythritolu (Faf UK HK)

7.3 Příprava pufru

Byl připraven fosfát citrátový pufr pH 7,4. Pufr byl připraven z roztoku kyseliny citronové o koncentraci 21,014 g/l a z roztoku hydrogenfosforečnanu disodného dodekahydrátu o koncentraci 35,60 g/l. Na přípravu 1 l bylo použito 111 ml roztoku kyseliny citronové a 889 ml roztoku hydrogenfosforečnanu disodného dihydrátu. Celková spotřeba pufru byla přibližně 3 l. Hodnota jeho pH byla následně zkontrolována na digitálním stolním pH metru.

7.4 Příprava substrátu pro mukoadhezivní test

Jako modelový podklad pro test mukoadheze byl použit mucin z prasečích žaludků, který byl hydratován fosfát citrátovým pufrům pH 7,4 v poměru 1 : 4.

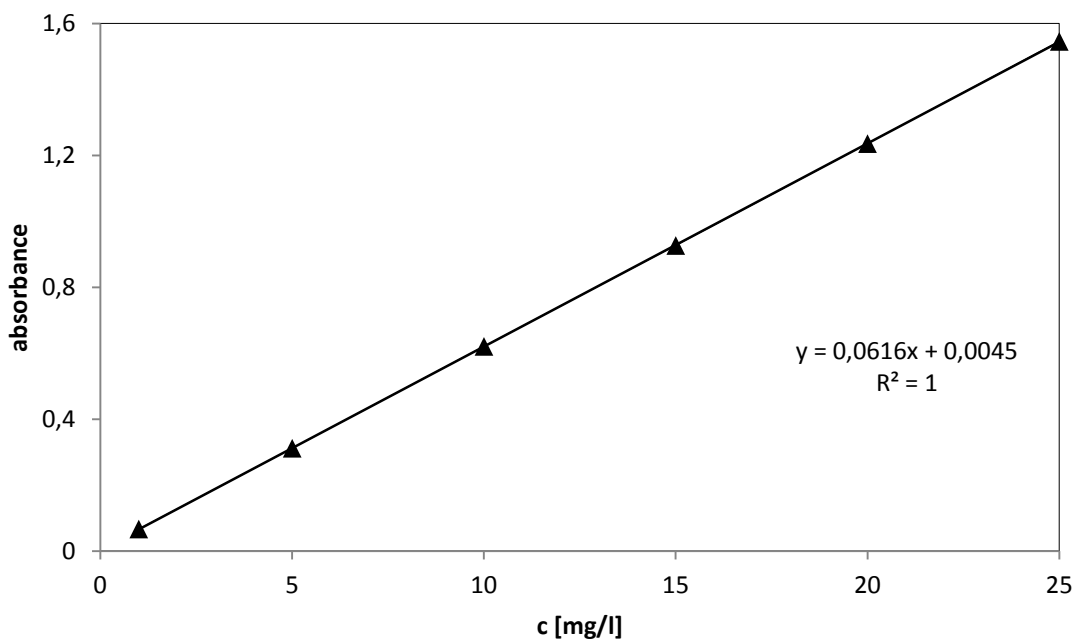
7.5 Sestrojení kalibrační přímky acikloviru

Bylo stanoveno absorpční maximum acikloviru, které je 256 nm. Byl připraven roztok acikloviru ve fosfát citrátovém pufru o koncentraci 25 mg/l. Jeho ředěním byly připraveny roztoky o nižší koncentraci a byly změřeny absorbance těchto roztoků (tab. 1). Byla sestrojena kalibrační přímka a vyjádřena její rovnice (obr. 4).

Tab. 1: Absorbance roztoků acikloviru

c [mg/l]	A
25	1,546
20	1,236
15	0,927
10	0,621
5	0,312
1	0,067

Obr.4: Kalibrační přímka acikloviru



Příprava matric

Byly připraveny matrice pro disoluční test, které se skládaly z polyesteru, plastifikátoru a léčiva. Jako plastifikátor byl použit methylsalicylát a ethylpyruvát. Jako polyester byl použit 3M, 3P, 3T a 3D. Jako léčivo byl přítomen aciklovir.

Polyester byl roztaven v horkovzdušné sušárně, jejíž teplota byla nastavena na teplotu 80 °C. K roztavenému polyesteru byl postupně přidáván plastifikátor. Jakmile byla směs dostatečně zhomogenizována, byl ke vzorku přidán aciklovir. Směs byla poté opět důkladně zhomogenizována.

Tab. 2: Složení matric

Typ polyesteru	Plastifikátor	Koncentrace plastifikátoru [%]	Léčivo
3M	MS	40	Aciklovir 5 %
3D	MS	40	
3P	MS	40	
	EP	40	
3T	MS	20	
	MS	40	
	EP	40	

Současně s matricemi obsahujícími polyester, léčivo a plastifikátor byly připraveny blank matrice, ve kterých nebylo obsaženo léčivo.

Tab. 3: Charakteristika polyesterů ^[62]

Označení	Poměr LA/GA/M(D,P,T) [%]	M _n [g/mol]	M _w [g/mol]	T _g [°C]	M _{w(SEC)} / M _w	g'
3M	48,5/48,5/3,0	2 600	3800	23,7	1,08	-
3D	48,5/48,5/3,0	3 600	5 300	27,3	1,19	-
3P	48,5/48,5/3,0	8 700	12 700	22,2	-	0,33
3T	48,5/48,5/3,0	7 900	20 600	21,7	-	0,31

M_n [g/mol] je číselně střední molární hmotnost

M_w [g/mol] je hmotnostně střední molární hmotnost

T_g [°C] je teplota skelného přechodu

g'=(η_{br}/η_{lin}) je větvicí poměr stanovený z vnitřní viskozity lineárního (lin) a větveného (br) polymeru při shodné molární hmotnosti (lineární PLGA má g'=1,0)

poměr M_{w(SEC)}/M_w vyjadřuje stupeň větvení (nižší hodnota znamená vyšší stupeň větvení, lineární PLGA má hodnotu 1,5)

7.6 Průběh disolučního testu

Na plastový podklad byla přilepena vrstva textilie, na kterou byla rozetřena tenká vrstva mucinu. Na mucinovou vrstvu byla poté nanесena připravená matrice obsahující polyester, plastifikátor a léčivo. Při disolučním testu se sledovalo množství liberovaného acikloviru v čase. Během prvního disolučního testu byla použita matrice, která jako plastifikátor obsahovala methylsalicylát v koncentraci 20 %. Po provedení tohoto orientačního testu byla pro další disoluční testy zvolena matrice s koncentrací plastifikátoru 40 %. Tato matrice umožňovala snadnější manipulaci při provádění disolučního testu.

Byl proveden disoluční test matric o různém složení. Matrice obsahovaly polyestery 3M, 3P, 3D, 3T a plastifikátory methylsalicylát nebo ethylpyruvát. Jako léčivo byl obsažen aciklovir.

Disoluční test byl proveden pomocí třepačky s vodní lázní, která byla vytemperována na 37° C. Plastový podklad s tenkou vrstvou mucinu byl vytárován. Poté na něj byla nanесena matrice polyesteru s plastifikátorem a léčivem, která byla přesně zvážena.

Takto připravený vzorek byl vložen do kádinky a zalit 20 ml fosfát citrátového pufru pH 7,4, který byl použit jako disoluční médium. Fosfát citrátový pufr byl přehřátý na 37 °C. V různých časových intervalech byl odebírán roztok disolučního média s uvolněným aciklovirem. Doba odběru byla stanovena po 15, 30, 60 a 120 minutách, poslední odběr byl proveden po 19 hodinách.

První disoluční test byl proveden jako destruktivní. Bylo připraveno tolik kádinek se vzorkem, kolik bylo naplánováno odběrů vzorků. Při zbývajících disolučních testech byl zvolen jiný postup. Po odebrání fosfát citrátového pufru s uvolněným léčivem po 15 minutách bylo do stejné kádinky a ke stejné matici přilito nových 20 ml fosfát citrátového pufru. Stejně se postupovalo až do posledního odběru – nejednalo se tedy o destruktivní test.

Disoluční test byl proveden s každým vzorkem dvakrát.

7.7 Stanovení množství uvolněného acikloviru

Množství uvolněného acikloviru bylo stanoveno spektrofotometricky a metodou HPLC na Katedře analytické chemie a kontroly léčiv. Vzorky disolučního média odebrané v průběhu disolučního testu byly vloženy do centrifugy na 30 minut při 6 000 otáčkách, aby se oddělily složky mucinu, které by mohly ovlivnit vyhodnocení liberace acikloviru.

Množství liberovaného acikloviru bylo stanoveno spektrofotometricky změřením absorbance při vlnové délce 256 nm. Jako referenční vzorek při měření absorbance bylo použito disoluční médium získané z disolučního testu blank matrice, která neobsahovala léčivo. Část centrifugovaných vzorků disolučního média byla předána na Katedru analytické chemie a kontroly léčiv ke stanovení acikloviru metodou HPLC. Výsledky byly dodány v mikrogramech acikloviru na mililitr dodaného vzorku. Z dodaných výsledků bylo přepočítáno množství uvolněného acikloviru v miligramech ve 20 ml vzorku a v procentech. Uvolněné množství acikloviru bylo znázorněno graficky.

7.8 Výpočet množství uvolněného acikloviru

Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace acikloviru v mg/l. Tato koncentrace poté byla převedena na koncentraci acikloviru v použitém objemu disolučního média, tj. 20 ml. Množství uvolněného acikloviru bylo vyjádřeno

v procentech z celkového množství acikloviru obsaženého v matrici a následně jako kumulativní procenta popisující průběh liberace acikloviru z matric.

Rovnice kalibrační přímky acikloviru:

$$A = 0,0616c + 0,0045$$

Výpočet koncentrace uvolněného léčiva:

$$c = \frac{A - 0,0045}{0,0616}$$

$$X = c \times 0,02 \times D$$

$$X_{\%} = \frac{100 \times X}{0,05 \times m}$$

Vysvětlivky:

- A naměřená absorbance
- c koncentrace uvolněného acikloviru v mg/l
- X koncentrace léčiva v 20 ml disolučního média (mg/20 ml)
- X_% podíl uvolněného léčiva v procentech
- m navážka matrice
- D ředění vzorku

8 VÝSLEDKY

8.1 Spektrofotometrické stanovení acikloviru

Tab. 4: Polyester 3T plastifikovaný 20 % methylsalicylátu

Čas [min]	Ředění	Absorbance	Aciklovir [mg/20ml]	Aciklovir [%]
15	5	0,4227	0,6789	7,96
30	5	0,6245	1,0065	12,19
60	5	0,8455	1,3653	16,65
120	5	1,2607	2,0393	25,13

Tab. 5: Polyester 3T plastifikovaný 40 % methylsalicylátu

Číslo vzorku	Čas [min]	Ředění	Absorbance	Aciklovir [mg/20ml]	Aciklovir [%]	Kumulativní %
1	15	10	0,4826	1,5523	14,50	14,50
	30	10	0,5223	1,6812	15,70	30,20
	60	10	0,6852	2,2101	20,65	50,85
	120	10	0,8419	2,7188	25,40	76,25
	19 h	10	0,9582	3,0964	28,93	105,17
2	15	10	0,6351	2,0474	15,22	15,22
	30	10	0,7565	2,4416	18,15	33,38
	60	10	0,7636	2,4646	18,32	51,70
	120	10	0,9991	3,2292	24,01	75,71
	19 h	10	1,1087	3,5851	26,65	102,36

Tab. 6: Polyester 3M plastifikovaný 40 % methyalsalicylátu

Číslo vzorku	Čas [min]	Ředění	Absorbance	Aciklovir [mg/20ml]	Aciklovir [%]	Kumulativní %
1	15	10	0,5974	1,9250	15,19	15,19
	30	10	0,8518	2,7510	21,71	36,91
	60	10	0,6983	2,2526	17,78	54,68
	120	10	0,6176	1,9906	15,71	70,40
	19 h	10	0,4022	1,2912	10,19	80,59
2	15	10	0,5895	1,8994	15,11	15,11
	30	10	0,7683	2,4799	19,73	34,84
	60	10	0,7736	2,4971	19,87	54,70
	120	10	0,5257	1,6922	13,46	68,17
	19 h	10	0,4835	1,5552	12,37	80,54

Tab. 7: Polyester 3D plastifikovaný 40 % methyalsalicylátu

Číslo vzorku	Čas [min]	Ředění	Absorbance	Aciklovir [mg/20ml]	Aciklovir [%]	Kumulativní %
1	15	20	1,0936	7,0721	52,93	52,93
	30	10	0,8856	2,8607	21,41	74,35
	60	10	0,5025	1,6169	12,10	86,45
	120	10	0,2846	0,9094	6,81	93,26
	19 h	10	0,2911	0,9305	6,96	100,22
2	15	20	1,0889	7,0416	48,66	48,66
	30	10	1,0829	3,5013	24,20	72,86
	60	10	0,7082	2,2847	15,79	88,65
	120	10	0,3121	0,9987	6,90	95,55
	19 h	10	0,3192	1,0218	7,06	102,61

Tab. 8: Polyester 3P plastifikovaný 40 % methylsalicylátu

Číslo vzorku	Čas [min]	Ředění	Absorbance	Aciklovir [mg/20ml]	Aciklovir [%]	Kumulativní %
1	15	10	0,9434	3,0484	24,32	24,32
	30	10	0,9360	3,0244	24,13	48,45
	60	10	0,8477	2,7377	21,84	70,29
	120	10	0,5996	1,9321	15,41	85,70
	19 h	10	0,4661	1,4987	11,96	97,66
2	15	10	0,9998	3,2315	23,01	23,01
	30	10	0,9528	3,0789	21,92	44,93
	60	10	0,9829	3,1766	22,62	67,55
	120	10	0,6901	2,2260	15,85	83,40
	19 h	10	0,6301	2,0312	14,46	97,86

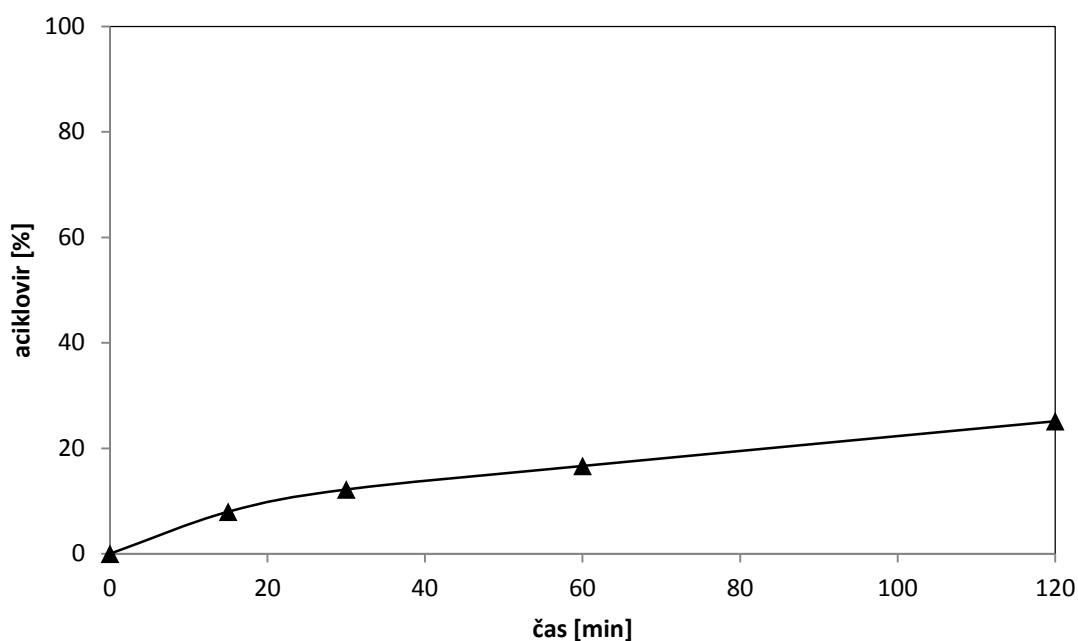
Tab. 9: Polyester 3T plastifikovaný 40 % ethylpyruvátu

Číslo vzorku	Čas [min]	Ředění	Absorbance	Aciklovir [mg/20ml]	Aciklovir [%]	Kumulativní %
1	15	5	0,6138	0,9891	8,07	8,07
	30	5	0,4548	0,7310	5,96	14,03
	60	5	0,6535	1,0536	8,59	22,62
	120	5	0,4936	0,7940	6,48	29,10
	19 h	10	0,6547	2,1110	17,22	46,32
2	15	5	0,7345	1,1851	9,90	9,90
	30	5	0,3513	0,5630	4,70	14,60
	60	5	0,4609	0,7409	6,19	20,79
	120	5	0,4358	0,7002	5,85	26,64
	19 h	10	0,7095	2,2890	19,12	45,77

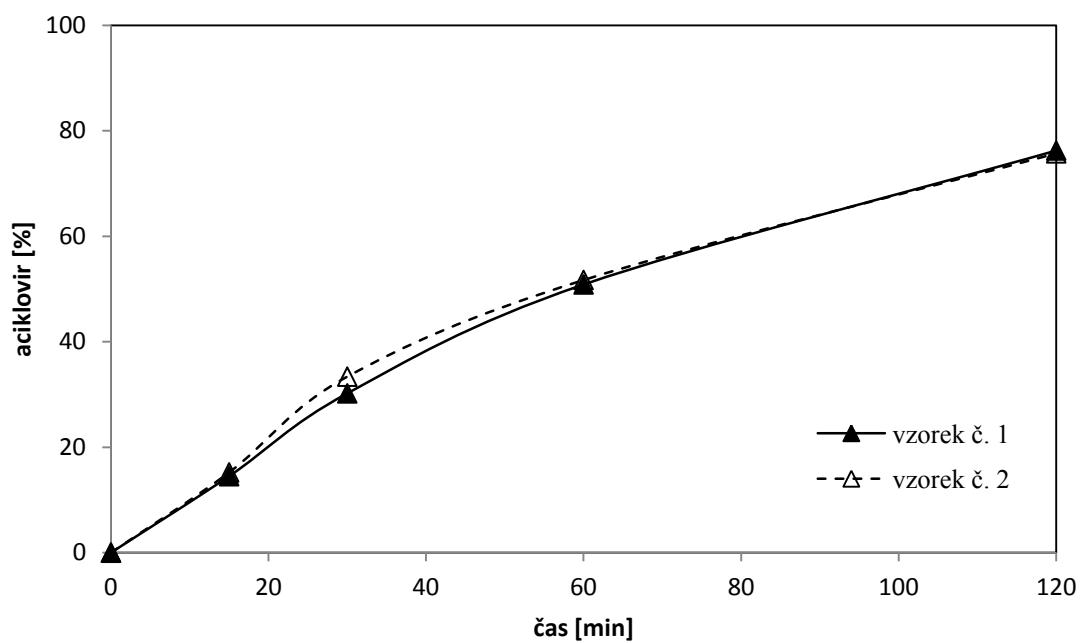
Tab. 10: Polyester 3P plastifikovaný 40 % ethylpyruvátu

Číslo vzorku	Čas [min]	Ředění	Absorbance	Aciklovir [mg/20ml]	Aciklovir [%]	Kumulativní %
1	15	10	0,2425	0,7727	5,68	5,68
	30	10	0,2990	0,9562	7,02	12,70
	60	10	0,3411	1,0929	8,03	20,73
	120	10	0,3815	1,2240	8,99	29,72
	19 h	10	1,1005	3,5584	26,14	55,85
2	15	10	0,2569	0,8195	5,77	5,77
	30	10	0,2256	0,7179	5,05	10,82
	60	10	0,2768	0,8841	6,22	17,05
	120	10	0,4856	1,5620	11,00	28,04
	19 h	10	1,0258	3,3159	23,34	51,39

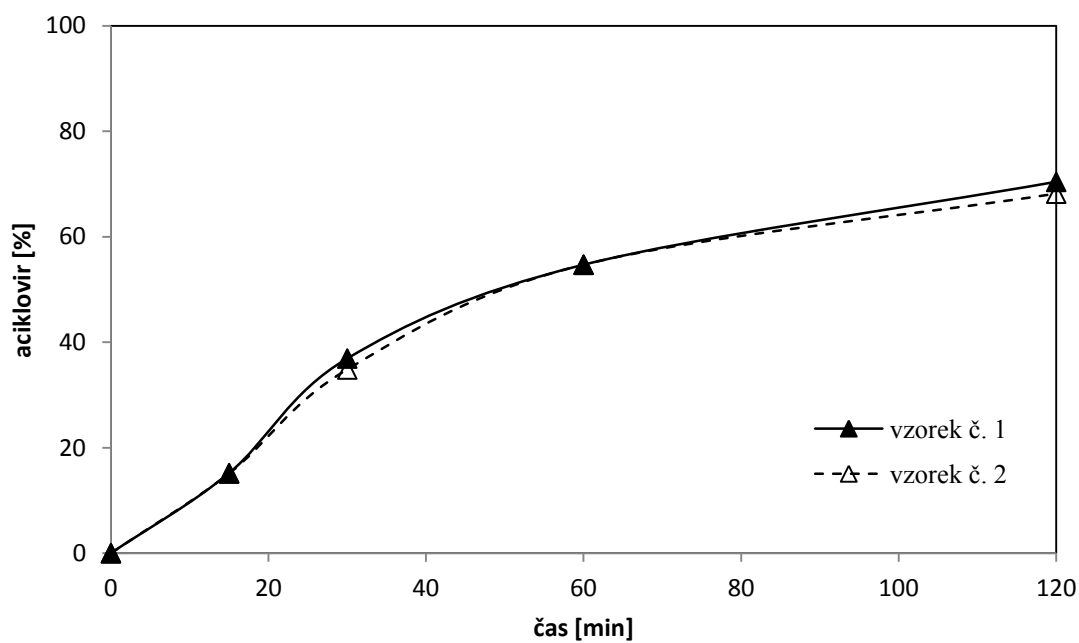
Obr.5: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 20 % methyalsalicylátu



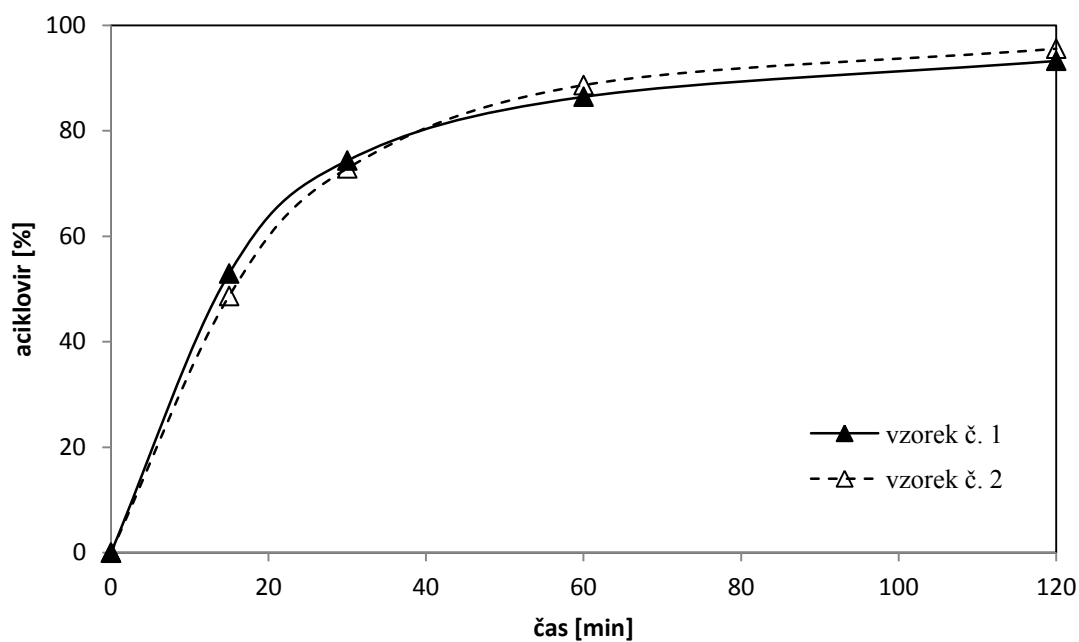
Obr.6: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 40 % methylosalicylátu



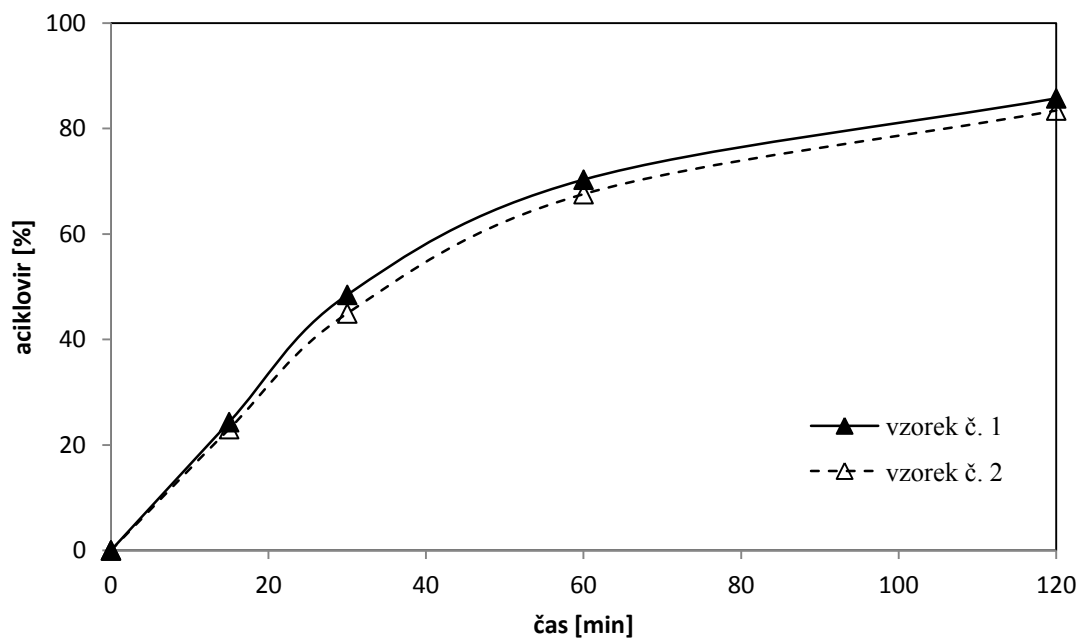
Obr.7: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 40 % methylosalicylátu



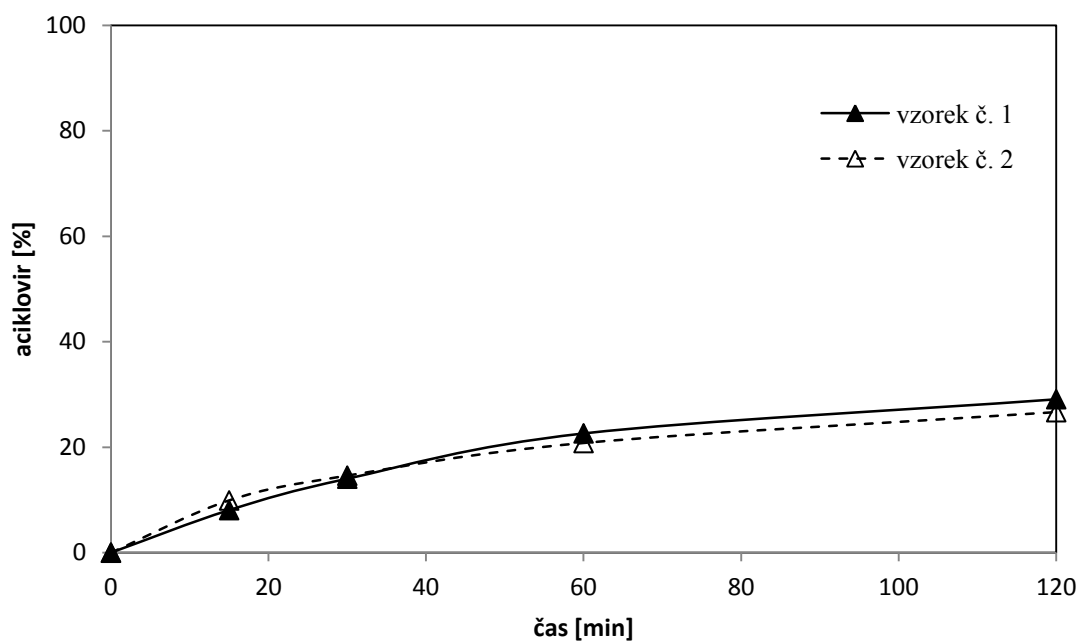
Obr.8: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 40 % methyalsalicylátu



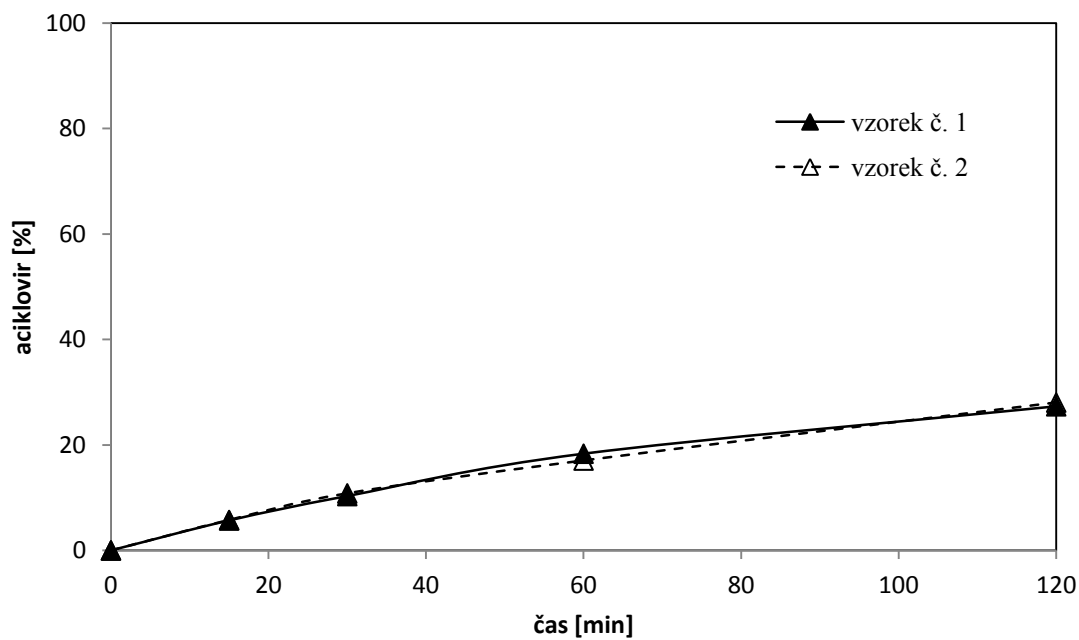
Obr.9: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3P plastifikovaného 40 % methyalsalicylátu



Obr.10: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 40 % ethylpyruvátu



Obr.11: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3P plastifikovaného 40 % ethylpyruvátu



8.2 Stanovení acikloviru metodou HPLC*

Tab. 11: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného
40 % methyalsalicylátu

čas [min]	aciklovir [μg/ml]	aciklovir [mg/20ml]	aciklovir [%]	kumulativní %
15	133	2,66	18,89	18,89
30	105	2,10	14,91	33,81
60	129	2,58	18,32	52,13
120	200	4,00	28,41	80,54
19 hod	204	4,08	28,98	109,52

Tab. 12: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného
40 % methyalsalicylátu

čas [min]	aciklovir [μg/ml]	aciklovir [mg/20ml]	aciklovir [%]	kumulativní %
15	98	1,96	20,55	20,55
30	82	1,64	17,19	37,74
60	106	2,12	22,22	59,96
120	71	1,42	14,88	74,84
19 hod	48	0,96	10,06	84,91

Tab. 13: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného
40 % methyalsalicylátu

čas [min]	aciklovir [μg/ml]	aciklovir [mg/20ml]	aciklovir [%]	kumulativní %
15	396	7,92	66,03	66,03
30	134	2,68	22,34	88,37
60	62	1,24	10,34	98,71
120	39	0,78	6,50	105,21
19 hod	35	0,7	5,84	111,05

* Stanovení HPLC bylo provedeno katedrou analytické chemie a kontroly léčiv

Tab. 14: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3P plastifikovaného
40 % methyلسalicylátu

čas [min]	aciklovir [μg/ml]	aciklovir [mg/20ml]	aciklovir [%]	kumulativní %
15	141	2,82	23,71	23,71
30	116	2,32	19,50	43,21
60	153	3,06	25,73	68,94
120	142	2,84	23,88	92,81
19 hod	57	1,14	9,58	102,40

Tab. 15: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného
40 % ethylpyruvátu

čas [min]	aciklovir [μg/ml]	aciklovir [mg/20ml]	aciklovir [%]	kumulativní %
15	43	0,86	8,80	8,80
30	20	0,40	4,09	12,90
60	31	0,62	6,35	19,24
120	28	0,56	5,73	24,97
19 hod	128	2,56	26,20	51,18

Tab. 16: Množství uvolněného acikloviru z polyesteru 3P plastifikovaného
40 % ethylpyruvátu

čas [min]	aciklovir [μg/ml]	aciklovir [mg/20ml]	aciklovir [%]	kumulativní %
15	37	0,74	9,22	9,22
30	17	0,34	4,23	13,45
60	21	0,42	5,23	18,68
120	25	0,50	6,23	24,91
19 hod	99	1,98	24,66	49,56

9 DISKUZE

Tato diplomová práce navazuje na předešlé diplomové práce obhajované na Katedře farmaceutické technologie UK zabývající se tematikou liberace léčiv z mukoadhezivních matric. ^[63, 64] Jako nosiče acikloviru byly testovány polyestery kyseliny D,L-mléčné a kyseliny glykolové větvené různým typem větvicího monomeru v koncentraci 3 %. Tyto polyestery byly syntetizovány stupňovitou polykondenzací na Katedře farmaceutické technologie Faf UK a následně analyzovány v Synpo Pardubice. Základní charakteristika použitých polyesterů je uvedena v tab. 3. V práci byly použity polyestery větvené 3 % dipentaerythritolu (3D), mannitolu (3M), pentaerythritolu (3P) nebo tripentaerythritolu (3T), které mají funkci centrální molekuly umožňující větvení polyesteru. Při této koncentraci větvicího monomeru byly získány nosiče s relativně vysokým stupněm větvení a s různou molární hmotností. Bylo zjištěno, že ne u všech polyesterů dochází při zvýšení koncentrace větvicího monomeru ke zvýšení stupně větvení. Při použití mannitolu v koncentracích 3 %, 5 % a 8 % s rostoucí koncentrací stupeň větvení klesá. Při použití dipentaerythritolu ve stejných koncentracích větvení stoupá. V případě pentaerythritolu a tripentaerythritolu je největší stupeň větvení při použití 3 % koncentrace, použitím 1 % nebo 5 % stupeň větvení klesá. ^[62]

Ukázalo se, že při vyšší koncentraci větvicí složky v reakční směsi není dostatek kyseliny mléčné a glykolové pro tvorbu větvených struktur a v reakční směsi je přebytek hydroxylů na větvicí složce. Molární hmotnost polyesterů větvených 3 % větvicího monomeru závisí na typu větvicího monomeru. Nejnižší molární hmotnost má nosič 3M, nejvyšší 3T. Molární hmotnost polyesteru ovlivňuje dobu degradace, která souvisí s uvolněním léčiva. Polyester s nižší molární hmotností má dobu degradace několik hodin až dní. Doba degradace polymeru o vyšší molekulové hmotnosti může být několikanásobně delší.

Testované polyesterové nosiče 3M, 3D, 3P, 3T se vyznačují vysokou viskozitou. Pro manipulaci s nimi a inkorporaci léčiva bylo potřeba jejich viskozitu snížit natavením v horkovzdušné sušárně a následným použitím plastifikátoru. Použitím plastifikátoru navíc dochází ke zvýšení mechanické odolnosti, snížení křehkosti a snížení teploty skleného přechodu polymeru. Základním požadavkem pro plastifikátor je jeho účinnost a mísitelnost s polymerem, navíc při použití v organismu nesmí být toxický a musí být biodegradovatelný. Použitý methylsalicylát má antiseptické, protizánětlivé a analgetické účinky, ethylpyruvát má účinky antioxidační, protizánětlivé

a inhibuje tvorbu reaktivních forem kyslíku. Tyto polymery mohou být považovány za multifunkční polymery vhodné pro použití ve farmacii a medicíně. ^[65] Nosiče byly plastifikované 20 %, ale při aplikaci na mucinovou vrstvu se tato koncentrace ukázala jako nedostatečná. Proto byla při dalších disolučních testech zvolena koncentrace 40 %. Do plastifikovaného polyesteru bylo inkorporováno léčivo v koncentraci 5 %. Jako modelové léčivo byl použit aciklovir, který mohl být stanoven spektrofotometricky při absorpčním maximu 256 nm.

Slizniční epitel, na který se aplikují mukoadhezivní léčivé přípravky, je potažený tenkou vrstvou viskózního hlenu. Proto se připravené matrice nanášely na tenkou mucinovou vrstvu, která simuluje prostředí v organismu pro podání léčivého přípravku. V některých předchozích pracích byl jako podklad pro mucinovou vrstvu zvolen korek, který měl ale některé nevýhodné vlastnosti. Korek je příliš lehký, takže během disolučního testu plave při hladině disolučního média a způsobuje zabarvení disolučního média, které ovlivňuje spektrofotometrické stanovení acikloviru. Proto byl jako podkladový materiál pro mucin zvolen těžší plastový podklad. Při nanesení mucinu na plastový povrch by se ale mucin rychle smyl, proto byla na plastový povrch lepidlem přilepena vrstva bavlněné textilie, na kterou se poté naněs v tenké vrstvě mucin a následně připravená matrice.

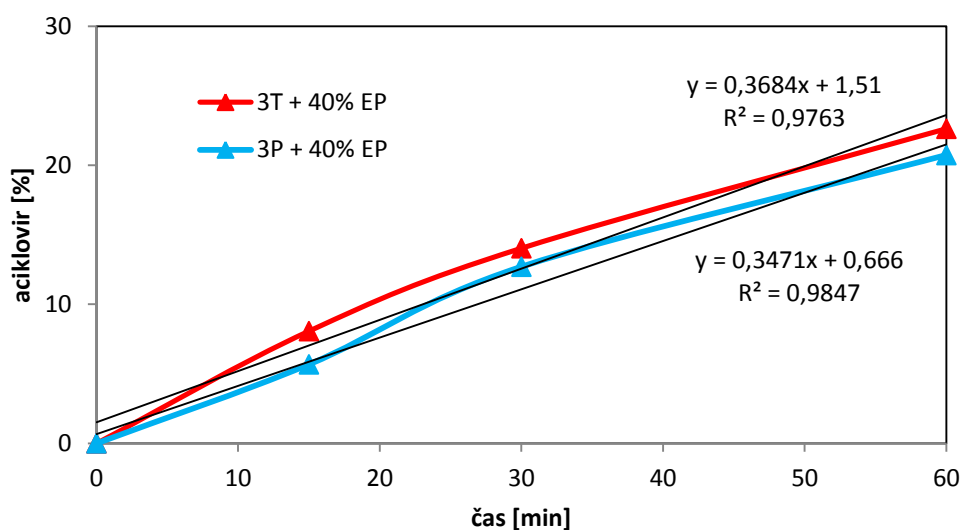
Disoluční test s koncentrací plastifikátoru 20 % byl proveden jako destruktivní. S prodlužujícím se časovým intervalem odběru disolučního média se ale mohla zpomalit rychlost liberace léčiva kvůli tvorbě nasyceného roztoku. To mohlo vést ke zpomalení difúze rozpustných degradačních produktů matrice do disolučního média. Aby se zamezilo tomuto vlivu, u ostatních disolučních testů bylo při každém odběru vzorku použito nové disoluční médium. Disoluční test matrice s koncentrací plastifikátoru 20 % (tab. 4) byl proveden pouze jednou, protože se tato koncentrace ukázala jako nevhodná pro nanesení matrice na mucinovou vrstvu. Další disoluční testy byly provedeny dvakrát. Stanovení liberovaného acikloviru bylo provedeno spektrofotometricky a ve spolupráci s Katedrou analytické chemie a kontroly léčiv i metodou HPLC.

9.1 Liberace acikloviru z polyesterových nosičů

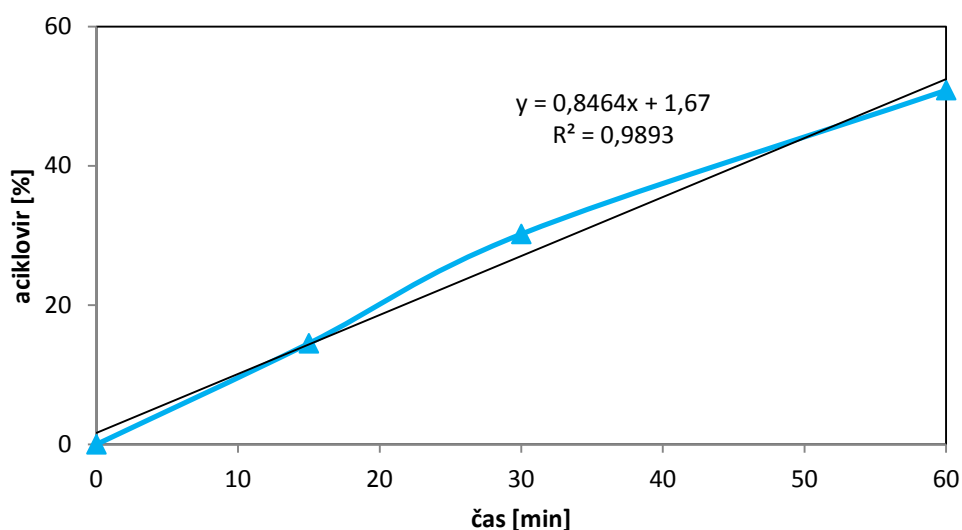
Ukázalo se, že liberace acikloviru z polyesterů 3T a 3P plastifikovaných ethylpyruvátém probíhala po dobu 1 hodiny přibližně lineárně, tj. kinetikou nultého

řádu. Za tuto dobu se uvolnilo 20 % acikloviru (obr. 12). Poté došlo ke zpomalení liberace. Liberace acikloviru kinetikou nultého řádu po dobu 1 hodiny probíhala také u polyesteru 3T plastifikovaného 40 % methylosalicylátu (obr. 13). Za tuto dobu se uvolnilo 50 % acikloviru. U polyesterů 3D, 3P a 3M plastifikovaných methylosalicylátu probíhala liberace kinetikou prvního řádu.

Obr.12: Liberace acikloviru z polyesterů 3T a 3P plastifikovaných ethylpyruvátu kinetikou nultého řádu

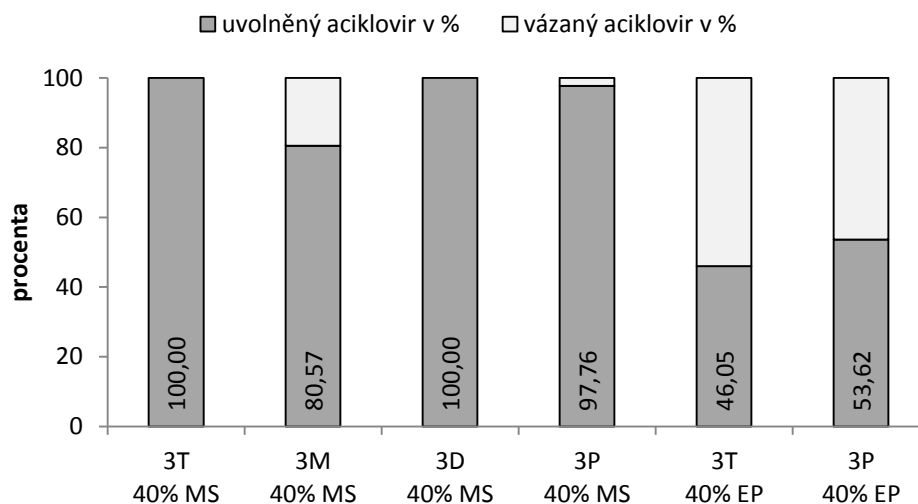


Obr.13: Liberace acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného methylosalicylátu v koncentraci 40 % kinetikou nultého řádu



Po 19 hodinách byl z polyesterů 3T a 3D s 40 % MS uvolněn veškerý aciklovir. Nejméně acikloviru se po 19 hodinách uvolnilo z polyesteru 3T s 40 % EP (obr. 14).

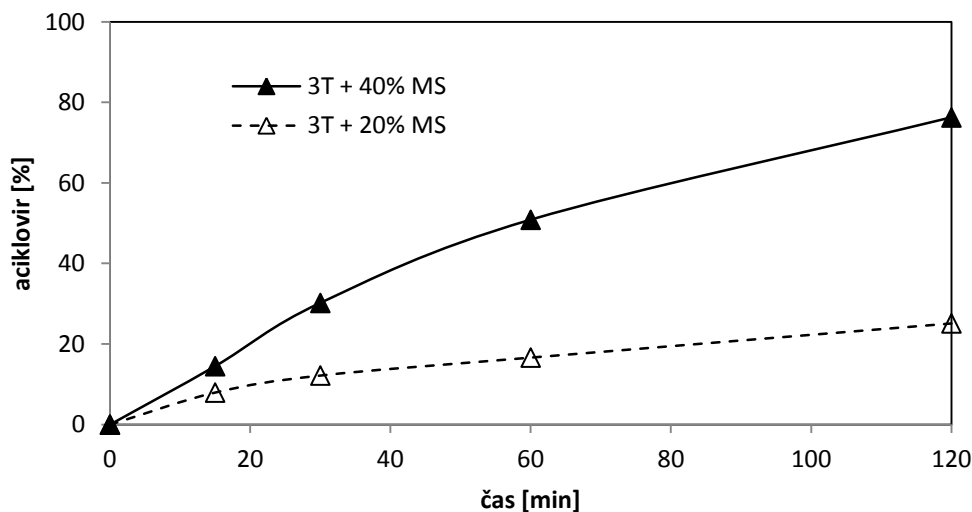
Obr.14: Množství acikloviru uvolněného po 19 hodinách z jednotlivých polyesterů



9.2 Vliv plastifikátoru na liberaci acikloviru

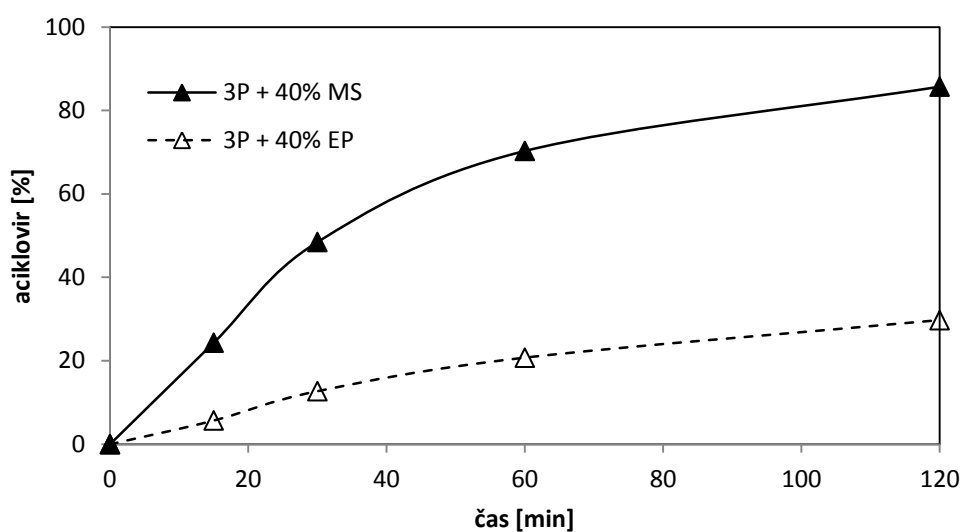
Koncentrace plastifikátoru ovlivňovala rychlost liberace acikloviru. Při použití methyalsalicylátu jako plastifikátoru v koncentraci 20 % se z polymeru 3T uvolnilo během 120 minut přibližně 25 % acikloviru. Zvýšením koncentrace plastifikátoru na 40 % došlo ke zrychlení liberace acikloviru. Během 120 minut se uvolnilo přibližně 75 % acikloviru (obr. 15).

Obr.15: Porovnání liberace acikloviru z matrice 3T plastifikované methyalsalicylátém v koncentraci 20 % a 40 %



Při použití methylosalicylátu jako plastifikátoru byla liberace léčiva z polyesterových matric rychlejší než při použití ethylpyruvátu. Z polyesterových matric složených z 3P plastifikovaného 40 % MS se během 120 minut podle spektrofotometrického stanovení uvolnilo přibližně 84 % acikloviru. Při použití stejného polyesteru plastifikovaného 40 % EP se za 120 minut dobu uvolnilo jen 29 % acikloviru. Při použití methylosalicylátu se z polyesteru 3T také uvolňoval aciklovir rychleji než při použití ethylpyruvátu (obr. 16).

Obr.16: Vliv typu plastifikátoru na liberaci acikloviru - polyester 3P plastifikovaný 40 % methylosalicylátu nebo ethylpyruvátu



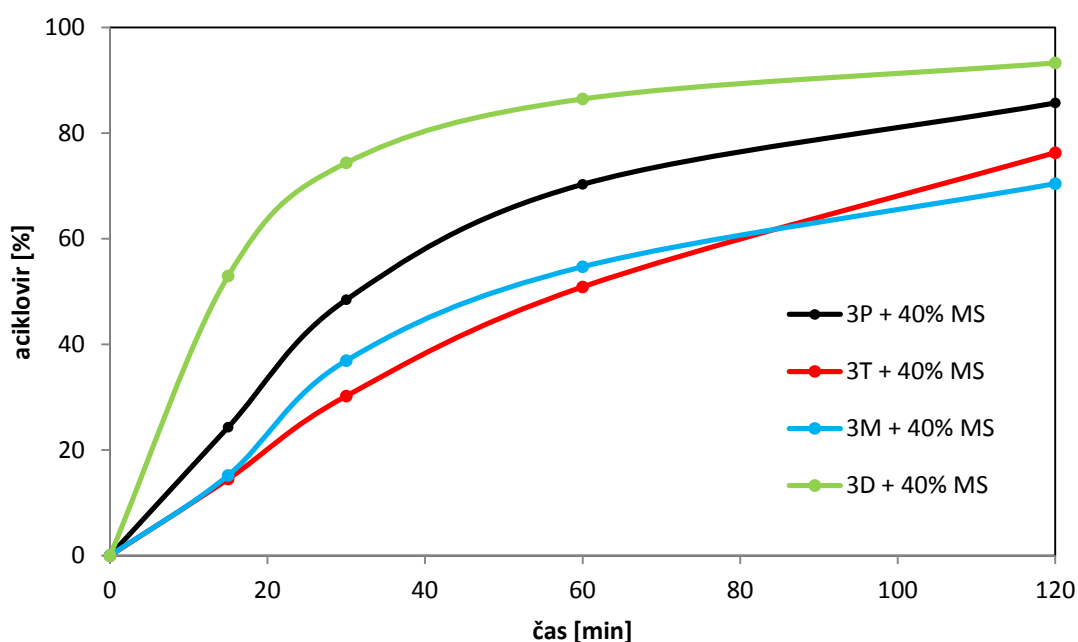
Při disolučním testu se kromě acikloviru uvolňuje do disolučního média i plastifikátor a degradační produkty polyesterového nosiče. Eluovaný plastifikátor při vlnové délce 256 nm také absorboval záření a zkresloval tak výsledky spektrofotometrického stanovení léčiva. Proto se při měření absorbance nepoužíval jako referenční vzorek fosfát citrátový pufr, ale disoluční médium získané z disolučního testu blank matrice, která neobsahovala léčivo. Blank matrice obsahovala pouze polyester se stejnou koncentrací plastifikátoru jako stanovovaná matrice. Disoluční médium z blank matrice bylo odebíráno ve stejných časových intervalech jako u matrice s inkorporovaným léčivem a bylo použito při měření absorbance. Hodnoty množství liberovaného acikloviru získané spektrofotometrickým měřením byly podobné hodnotám získanými měřením HPLC metodou.

9.3 Vliv typu polyesteru na liberaci acikloviru

Liberace acikloviru byla ovlivněna molekulovou hmotností použitého polyesteru. Uvolnění léčiva z polyesteru souvisí s jeho degradací. Polyester s nižší molekulovou hmotností by se měl degradovat rychleji než polyester o vyšší molekulové hmotnosti. Nejnižší molekulovou hmotnost z testovaných polyesterů má polyester 3M, nejvyšší molekulovou hmotnost má polyester 3T (tab. 3).

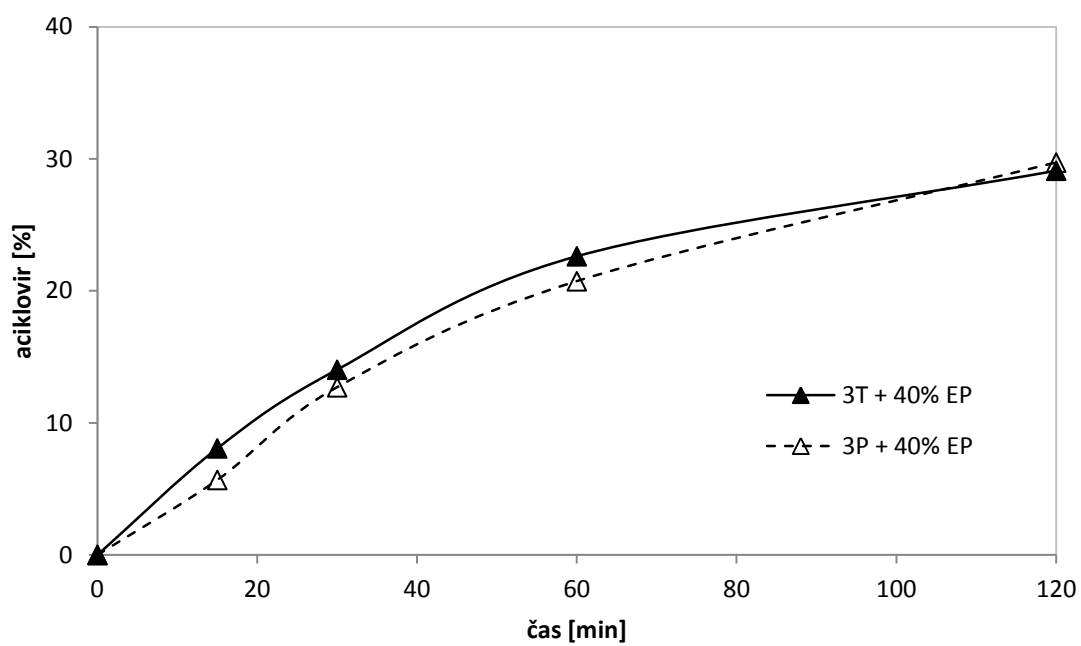
U polyesterů 3D, 3P a 3T plastifikovaných methylosalicylátem během 120 minut disolučního testu s rostoucí molekulovou hmotností rychlost liberace klesala. Z polyesteru 3M plastifikovaného methylosalicylátem se léčivo uvolňovalo pomaleji než z polyesteru 3D o vyšší molekulové hmotnosti (obr. 17).

Obr.17: Množství uvolněného acikloviru z matric plastifikovaných methylosalicylátem - vliv typu polyesteru



Při použití ethylpyruvátu se z polyesteru 3T léčivo uvolňovalo rychleji než z polyesteru 3P o nižší molekulové hmotnosti po dobu 60 minut. Poté byla rychlost liberace vyšší z polyesteru 3P (obr. 18).

Obr.18: Množství uvolněného acikloviru z matric plastifikovaných ethylpyruvátém – vliv typu polyesteru



10 ZÁVĚRY

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

1. Průběh liberace acikloviru z polyesterových nosičů byl ovlivněn zejména koncentrací a typem plastifikátoru, dále pak molární hmotností použitého polyesteru.
2. Spektrofotometrické stanovení acikloviru při měření proti disolučnímu médiu získanému z blank matrice koreluje se stanovením metodou HPLC.
3. Z polyesterů plastifikovaných ethylpyruvátém se aciklovir uvolňoval po dobu 1 hodiny kinetikou nultého řádu. Za tuto dobu se uvolnilo 20 % acikloviru.
4. Pro topickou aplikaci na sliznice je vhodným nosičem acikloviru polyester kyseliny mléčné a glykolové, větvený dipentaerythritolem v koncentraci 3 % a plastifikovaný methylsalicylátem v koncentraci 40 %.

11 SEZNAM LITERATURY

- 1 MATHIOWITZ, Edith, Donald E. CHICKERING a Claus-Michael LEHR. *Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development*. New York: Marcel Dekker, 1999, s. 1. ISBN 08-247-1995-6.
- 2 KUNA, Milan. Mukoadhezivní přípravky. *Praktické lékařství*. 2008, vol. 4, no. 5, s. 242-245. ISSN 1801-2434.
- 3 SALAMAT-MILLER, Nazila, Montakarn CHITTCHANG a Thomas P. JOHNSTON. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, vol. 57, no. 11, s. 1666-1691. ISSN 0169-409x.
- 4 EDSMAN, Katarina a Helene HÄGERSTRÖM. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005, vol. 57, no. 1, s. 3-22. ISSN 0022-3573.
- 5 VOORSPOELS, Jody, Jean-Paul REMON, Willy EECHAUTE a Walter DE SY. Buccal absorption of testosterone and its esters using a bioadhesive tablet in dogs. *Pharmaceutical Research*. 1996, vol. 13, no. 8, s. 1228-1232. ISSN 1573-904X.
- 6 TAYLAN, Buket, Yilmaz CAPAN, Olgun GÜVEN, Sirri KES a A. ATILLA HINCAL. Design and evaluation of sustained-release and buccal adhesive propranolol hydrochloride tablets. *Journal of Controlled Release*. 1996, vol. 38, no. 1, s. 11-20. ISSN 0168-3659.
- 7 LENAERTS, Vincent a Robert GURNY. *Bioadhesive drug delivery systems*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1990, s. 78,79,81-85. ISBN 084935367x.
- 8 NAFEE, Noha, Fatma A. ISMAIL, Nabila A. BORAIE a Lobna M. MORTADA. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, vol. 264, no. 1-2, s. 1-14. ISSN 0378-5173.
- 9 CUI, Zhengrong a Russell J. MUMPER. Buccal transmucosal delivery of calcitonin in rabbits using thin-film composites. *Pharmaceutical Research*. 2002, vol. 19, no.12, s. 1901-1906. ISSN 1573-904X.
- 10 MUZIB, Y. Indira a K. Srujana KUMARI. Mucoadhesive buccal films of glibenclamide: Development and evaluation. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2011, vol. 1, no. 1, s. 42-47. ISSN 2230-9713.

- 11 JONES, David S., A. David WOOLFSON, Andrew F. BROWN, Wilson A. COULTER, Cathy MCCLELLAND a Christopher R. IRWIN. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*. 2000, vol. 67, no. 2-3, s. 357-368. ISSN 0168-3659.
- 12 MORALES, Javier O. a Jason T. MCCONVILLE. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, vol. 77, no. 2, s. 187-199. ISSN 0939-6411.
- 13 UGWOKE, M., R. AGU, N. VERBEKE a R. KINGET. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, vol. 57, no.11, s. 1640-1665. ISSN 0169-409x.
- 14 LIM, S.T., G.P. MARTIN, D.J. BERRY a M.B. BROWN. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *Journal of Controlled Release*. 2000, vol. 66, no. 2-3, s. 281-292. ISSN 0168-3659.
- 15 CERCHIARA, T., B. LUPPI, F. BIGUCCI a V. ZECCHI. Chitosan salts as nasal sustained delivery systems for peptidic drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2003, vol. 55, no.12, s. 1623-1627. ISSN 0022-3573.
- 16 OZSOY, Y., et al. In vivo studies on nasal preparations of ciprofloxacin hydrochloride. *Die Pharmazie*. 2000, vol. 55, no. 8, s. 607-609. ISSN 0031-7144.
- 17 ILLUM, L. Intranasal Delivery of Morphine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002, vol. 301, no. 1, s. 391-400. ISSN 1521-0103.
- 18 DYER, A. M., M. HINCHCLIFFE, P. WATTS, J. CASTILE, I. JABBAL-GILL, R. NANKERVIS, A. SMITH a L. ILLUM. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 2002, vol. 19, no. 7, s. 998-1008. ISSN 1573-904X.

- 19 WALKER, Richard I. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine*. 1994, vol. 12, no. 5, s. 387-400. ISSN 0264-410x.
- 20 YAHAGI, Reiko, Hiraku ONISHI a Yoshiharu MACHIDA. Preparation and evaluation of double-phased mucoadhesive suppositories of lidocaine utilizing Carbopol® and white beeswax. *Journal of Controlled Release*. 1999, vol. 61, no. 1-2, s. 1-8. ISSN 0168-3659.
- 21 JANNIN, Vincent, Gilles LEMAGNEN, Pascale GUEROULT, Denis LARROUTURE a Catherine TULEU. Rectal route in the 21st Century to treat children. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, vol. 73, s. 34-49.
DOI: 10.1016/j.addr.2014.05.012.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X14001069>
- 22 CHOI, Han-Gon, Yu-Kyoung OH a Chong-Kook KIM. In situ gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998, vol. 165, no. 1, s. 23-32. ISSN 0378-5173.
- 23 KIM, Chong-Kook, Sa-Won LEE, Han-Gon CHOI, Mi-Kyung LEE, Zhong-Gao GAO, In-Sook KIM a Kyung-Mi PARK. Trials of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository in human subjects. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998, vol. 174, no. 1-2, s. 201-207. ISSN 0378-5173.
- 24 HIORTH, Marianne, Susanne NILSEN a Ingunn THO. Bioadhesive Mini-Tablets for Vaginal Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2014, vol. 6, no. 3, s. 494-511. ISSN 1999-4923.
- 25 DAS NEVES, J. a M.F. BAHIA. Gels as vaginal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, vol. 318, no. 1-2, s. 1-14. ISSN 0378-5173.
- 26 ACARTURK, Fusun. Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems. *Recent Patents on Drug Delivery*. 2009, vol. 3, no. 3, s. 193-205. ISSN 2212-4039.
- 27 VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, vol. 57, no.11, s. 1692-1712. ISSN 0169-409x.

- 28 CHALUPOVÁ, Z., MASTEIKOVÁ, R., SAVICKAS, A. Farmaceutické hydrofilní gely. *Česká a slovenská farmacie*, 2005, vol. 54, no. 2, s. 55-59. ISSN 1805-4439.
- 29 ROBINSON, Joseph R. a William J. BOLOGNA. Vaginal and reproductive system treatments using a bioadhesive polymer. *Journal of Controlled Release*. 1994, vol. 28, no. 1-3, s. 87-94. ISSN 0168-3659.
- 30 AHMAD, Farhan, Mohd ALAM, Zeenat KHAN, Roop KHAR a Mushir ALI. Development and in vitro evaluation of an acid buffering bioadhesive vaginal gel for mixed vaginal infections. *Acta Pharmaceutica*. 2008, vol. 58, no. 4, s. 407-419. ISSN 1846-9558.
- 31 ŞENYİĞİT, Zeynep Ay, Sinem Yaprak KARAVANA, Bayri ERAÇ, Özge GÜRSEL, Mine Hoşgör LIMONCU a Esra BALOĞLU. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. *Acta Pharmaceutica*. 2014, vol. 64, no. 2, s. 139-156. ISSN 1846-9558.
- 32 HUSSAIN, Alamdar a Fakhrul AHSAN. The vagina as a route for systemic drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2005, vol. 103, no. 2, s. 301-313. ISSN 0168-3659.
- 33 GARG, Sanjay, David GOLDMAN, Markus KRUMME, Lisa C. ROHAN, Stuart SMOOT a David R. FRIEND. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. *Antiviral Research*. 2010, vol. 88, Supplement, s. S19-S29. ISSN 0166-3542.
- 34 BOUCKAERT, S., M. TEMMERMAN, J. VOORSPOELS, H. KETS, J. P. REMON a M. DHONT. Preliminary Efficacy Study of a Bioadhesive Vaginal Metronidazole Tablet in the Treatment of Bacterial Vaginosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1995, vol. 47, no. 11, s. 970-971. ISSN 0022-3573.
- 35 VOORSPOELS, Jody, Martine CASTEELS, Jean Paul REMON a Marleen TEMMERMAN. Local treatment of bacterial vaginosis with a bioadhesive metronidazole tablet. *European Journal of Obstetrics*. 2002, vol. 105, no. 1, s. 64-66. ISSN 0301-2115.
- 36 CARAMELLA, Carla M., Silvia ROSSI, Franca FERRARI, Maria Cristina BONFERONI a Giuseppina SANDRI. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.001>

- 37 VERMANI, Kavita a Sanjay GARG. The scope and potential of vaginal drug delivery. *Pharmaceutical Science*. 2000, vol. 3, no. 10, s. 359-364. ISSN 1461-5347.
- 38 HORNOF, Margit, Wim WEYENBERG, Annick LUDWIG a Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH. Mucoadhesive ocular insert based on thiolated poly(acrylic acid): development and in vivo evaluation in humans. *Journal of Controlled Release*. 2003, vol. 89, no. 3, s. 419-428. ISSN 0168-3659.
- 39 LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, vol. 57, no. 11, s. 1595-1639. ISSN 0169-409x.
- 40 HUI, H. a J. ROBINSON. Ocular delivery of progesterone using a bioadhesive polymer. *International Journal of Pharmaceutics*. 1985, vol. 26, no. 3, s. 203-213. ISSN 0378-5173.
- 41 MURRAY, Robert K., Daryl K. GRANNER, Peter A. MAYES a Victor W. RODWELL. *Harperova Biochemie: a LANGE medical book*. 23. vyd., v ČR 2. vyd. Jinočany: H&H, 1998, s. 159. ISBN 80-85787-38-5.
- 42 LI, Ning, Chunyang ZHUANG, Mi WANG, Xiyang SUN, Shufang NIE a Weisan PAN. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, vol. 379, no. 1, s. 131-138. ISSN 0378-5173.
- 43 NAGARSENKER, M.S., Vaishali Y LONDHE a G.D. NADKARNI. Preparation and evaluation of liposomal formulations of tropicamide for ocular delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, vol. 190, no. 1, s. 63-71. ISSN 0378-5173.
- 44 LAW, S.L., K.J. HUANG a C.H. CHIANG. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. *Journal of Controlled Release*. 2000, vol. 63, no. 1-2, s. 135-140. ISSN 0168-3659.
- 45 MEISNER, Dale a Michael MEZEI. Liposome ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995, vol. 16, no. 1, s. 75-93. ISSN 0169-409x.
- 46 DAVIES, Nigel M., Stephen J. FARR, Jonathan HADGRAFT a Ian W. KELLAWAY. Evaluation of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. II. Polymer-coated vesicles. *Pharmaceutical Research*. 1992, vol. 9, no. 9, s. 1137-1144. ISSN 1573-904X.

- 47 GENTA, I., B. CONTI, P. PERUGINI, F. PAVANETTO, A. SPADARO a G. PUGLISI. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1997, vol. 49, no. 8, s. 737-742. ISSN 0022-3573.
- 48 GREAVES, Jane L. a Clive G. WILSON. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993, vol. 11, no. 3, s. 349-383. ISSN 0169-409x.
- 49 ROBINSON, Joseph R. a Gwen M. MLYNEK. Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995, vol. 16, no. 1, s. 45-50. ISSN 0169-409x.
- 50 SOLOMONIDOU, D., K. CREMER, M. KRUMME a J. KREUTER. Effect of carbomer concentration and degree of neutralization on the mucoadhesive properties of polymer films. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2001, vol. 12, no. 11, s. 1191-1205. ISSN 0920-5063.
- 51 Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009*. První vydání. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-2994-7.
- 52 CALONGE, Margarita. The treatment of dry eye. *Survey of Ophthalmology*. 2001, vol. 45, Supplement 2, S227-S239. ISSN 0039-6257.
- 53 GURTLER, Florian, Vassilios KALTSATOS, Bernard BOISRAMÉ a Robert GURNY. Long-acting soluble bioadhesive ophthalmic drug insert (BODI) containing gentamicin for veterinary use: optimization and clinical investigation. *Journal of Controlled Release*. 1995, vol. 33, no. 2, s. 231-236. ISSN 0168-3659.
- 54 SUNG, Jean C., Brian L. PULLIAM a David A. EDWARDS. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends in Biotechnology*. 2007, vol. 25, no. 12, s. 563-570. ISSN 0167-7799.
- 55 KAWASHIMA, Y., H. YAMAMOTO, H. TAKEUCHI, S. FUJIOKA a T. HINO. Pulmonary delivery of insulin with nebulized dl-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect. *Journal of Controlled Release*. 1999, vol. 62, no. 1-2, s. 279-287. ISSN 0168-3659.
- 56 ZHANG, Qiang, Zancong SHEN a Tsuneji NAGAI. Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, vol. 218, no. 1-2, s. 75-80. ISSN 0378-5173.

- 57 VAUGHN, Jason M., Jason T. MCCONVILLE, David BURGESS, Jay I. PETERS, Keith P. JOHNSTON, Robert L. TALBERT a Robert O. WILLIAMS. Single dose and multiple dose studies of itraconazole nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006, vol. 63, no. 2, s. 95-102. ISSN 0939-6411.
- 58 PANDEY, R. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003, vol. 52, no. 6, s. 981-986. ISSN 1460-2091.
- 59 CHELLAT, Fatiha, Yahye MERHI, Alain MOREAU a L'Hocine YAHIA. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, no. 35, s. 7260-7275. ISSN 0142-9612.
- 60 HAMMAN, Josias H., Gill M. ENSLIN a Awie F. KOTZÉ. Oral Delivery of Peptide Drugs. *BioDrugs*. 2005, vol. 19, no. 3, s. 165-177. ISSN 1179-190X.
- 61 RAJPUT, G., F. MAJMUDAR, J. PATEL, R. THAKOR a N.B. RAJGOR. Stomach-specific mucoadhesive microsphere as a controlled drug delivery system. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2010, vol. 1, no. 1, s. 70-78. ISSN 0976-2779.
- 62 PODZIMEK, Š. Stanovení molární hmotnosti polyesterů metodou SEC-MALS. Synpo a.s. Pardubice, 2005, vol. 8.
- 63 ŠIŠÁKOVÁ, Lenka. *Liberace acikloviru z mukoadhezivních matric*. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
- 64 LÍBENKOVÁ, Marie. *Testování bioadheze sprejově aplikovaných roztoků větvených polyesterů*. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
- 65 ŠNEJDROVÁ, E., M. DRASTÍK a M. DITTRICH. Výběr plastifikátoru pro větvené polyestery používané jako nosiče léčiv. *Chemické Listy*. 2013, vol. 107, no. 2, 178 - 181. ISSN 1213-7103.