

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

**PŘÍSPĚVEK KE STUDIU DEGRADACE  
POLYESTEROVÝCH NOSIČŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové, 2008

Lenka Ťápalová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele a uvedla jsem všechny použité literární a odborné zdroje.

V Hradci Králové dne 25.3.2008

Lenka Ťápalová

Děkuji vedoucímu práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při zpracovávání diplomové práce.

## ABSTRAKT

V práci se pojednává o interakci hydrofilního média se čtyřmi alifatickými oligoestery a polyestery syntetizovanými z kyseliny mléčné a glykolové, které byly větvené buď dipentaerythritolem nebo tripentaerythritolem v 1% až 5% koncentraci. Byl studován průběh eroze a bobtnání matric definovaných rozměrů z daných oligoesterů ve vodném médiu při 37 °C v časovém intervalu 1 den, 3 dny, 7 dní, 14 dní a 21 dní. Dále se stanovovala alkalimetry koncentrace karboxylů vzniklých hydrolyzou degradované matrice ve frakci rozpustné ve vodě. Frakce rozpustná ve vodě se získala rozpuštěním zbotnalé matrice v chloroformu a jeho vytřepáním ve vodě. Charakteristiku jsme nazvali karboxylové číslo. Bylo prokázáno, že kinetika bobtnání úzce souvisí s průběhem změn koncentrace ve vodě rozpustných monomerních a oligomerních molekul. U některých matric byla prokázána synereze mezi jejich karboxylovým číslem a stupněm bobtnání.

## SUMMARY

This work deals with interaction of hydrophilic medium with four aliphatic oligoesters and polyesters synthesized from lactic acid and glycolic acid, which were branched either with dipentaerythritol or tripentaerythritol in 1% to 5% concentration. There was observed a process of erosion kinetics and swelling of defined matrices from mentioned oligoesters in water medium in 37 °C in period of time 1 day, 3 days, 7 days, 14 days and 21 days. Next step was determining the concentration of carboxylic groups generated via hydrolysis of degraded matrices by using alkalimetric methods in the water soluble fraction. The fraction soluble in water was taken by solubilizing of swelling matrices in a chloroform and its shaking in water. Characteristic was named as carboxylic number. It was demonstrated that swelling kinetics cohere nearly with the process of concentration changes in water soluble monomers and oligomers. In some matrices there was also demonstrated the process of syneresis between their carboxylic number and the swelling level.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Biodegradabilní polymery .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Použití biodegradabilních polymerů ve veterině .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Biodegradabilní nosiče využívané k řízení reprodukce zvířat.....	15
2.2.2 Biodegradabilní nosiče využívané v boji proti ektoparazitům .....	17
2.2.3 Biodegradabilní nosiče využívané k vakcinaci.....	17
2.2.4 Biodegradabilní nosiče využívané ke stimulaci růstu zvířat .....	19
2.2.5 Další užití biodegradabilních polymerů ve veterině .....	20
<b>2.3 Perspektiva biodegradabilních polymerů ve veterinární medicíně ...</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>22</b>
<b>3. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>23</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Použité přístroje a chemikálie.....</b>	<b>24</b>
4.1.1 Chemikálie .....	24
4.1.2 Přístroje .....	24
4.1.3 Charakteristika použitých oligoesterových nosičů .....	25
<b>4.2 Stanovení stupně botnání a stupně eroze testovaného nosiče .....</b>	<b>26</b>
4.2.1 Příprava matric.....	26
4.2.2 Příprava vzorků.....	27
4.2.3 Postup při stanovení stupně botnání a eroze .....	27
<b>4.3 Stanovení karboxylového čísla.....</b>	<b>28</b>
4.3.1 Příprava odměrného roztoku.....	28
4.3.2 Příprava indikátoru .....	28
4.3.3 Postup při stanovení karboxylového čísla .....	28

<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 Tabulky a grafy .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2 Vysvětlivky zkratk.....</b>	<b>47</b>
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>48</b>
<b>6.1 Souvislosti a metodika práce.....</b>	<b>48</b>
<b>6.2 Interakce nosiče 2D s vodným médiem .....</b>	<b>49</b>
<b>6.3 Interakce nosiče 5T s vodným médiem .....</b>	<b>51</b>
<b>6.4 Interakce nosiče 3T s vodným médiem .....</b>	<b>52</b>
<b>6.5 Interakce nosiče 1T s vodným médiem .....</b>	<b>53</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>54</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>55</b>

# 1. ÚVOD

Důležitou roli ve vývoji farmaceutických lékových forem hraje transport léčivé látky, protože je často nutné, aby doba potřebná k uvolňování léčiva byla prodloužena na dny až měsíce. Prodloužení doby účinku léčivé látky může být dosaženo jejím zabudováním do polymerních materiálů pro řízené uvolňování léčiva předdefinovanou a opakovatelnou rychlostí.

Pro léčiva jsou většinou použity nosičové systémy typu nedegradabilních polymerů (silikon, polyuretan nebo kopolymery ethylvinylacetátu), které jsou levné, biokompatibilní a biologicky inertní [1].

V posledních letech významně roste zájem o nosičové systémy typu biodegradabilních materiálů, které není potřeba na konci léčby z těla odstranit, protože se degradují na fyziologicky působící sloučeniny, které se mohou samy rychle vyloučit.

Ve veterinární oblasti jsou tyto nosičové systémy výhodnější jak ze strany redukce stresu zvířete, což vyplývá ze zacházení se zvířaty a fyzického odstraňování nedegradabilního nosičového systému, tak ze strany snížení nákladů a času lékaře stráveného u zvířete [2], protože každá návštěva veterináře je spojena s náklady. Biodegradabilní nosičové systémy vyžadují pouze jednu návštěvu spojenou s aplikací léčiva, přičemž dochází ke zvýšení terapeutického efektu, který je ekonomicky výhodný, přestože náklady takových nosičových systémů mohou být i vyšší než tradiční léčba.

Ačkoliv zdravotní péče u zvířat a lidí má mnoho podobností, rozmanitost druhů a ras zvířat, rozsah jejich velikosti těla, rozdíly v času biotransformace a další faktory činí vývoj veterinárních nosičových systémů více komplikovaný [2]. Kromě toho existují další regulační požadavky zvláště pro hospodářská zvířata. Protože tito živočichové a jejich produkty vstupují do potravního řetězce člověka, jejich tkáně mohou obsahovat zbytky léčiva a polymeru. Zbytková hladina léčiva v tkáni hraje důležitou roli hlavně v otázce spotřebitelské bezpečnosti a je důvodem pro stažení produktu z trhu.

V posledních letech jsou biodegradabilní veterinární nosičové systémy jako mikrosféry, implantáty a implantáty tvořící se in-situ testovány v oblasti ovlivnění reprodukce [3], likvidaci ektoparazitů [4], ke stimulace jejich růstu [5] a k vakcinaci [6]. Protože biodegradabilní polymery umožňují dodání řady bioaktivních materiálů s vysokou biodostupností, mají vysoký potenciál pro veterinární použití.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

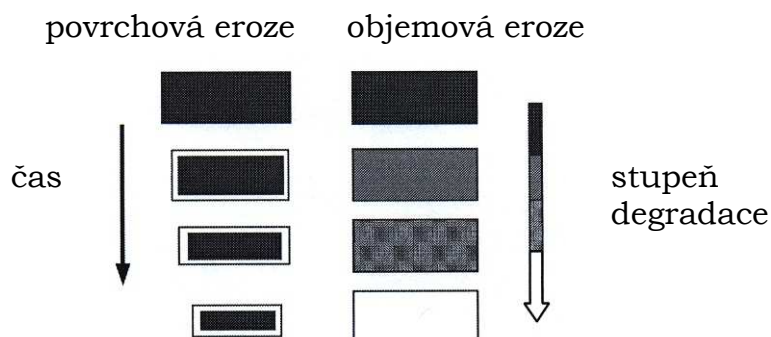
Nejvíce zajímavými a běžně užívanými biodegradabilními polymery jsou **polyestery** jako polymery kyseliny mléčné (PLA), kopolymery kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL). (Tab. 1). Studie o PLGA jsou jedny z nejfrekventovanějších v oblasti biodegradabilních polymerů, speciálně pro řízené podání peptidů [2] a proteinů [7].

Polyestery jsou komerčně dostupné v různém složení a s různou molekulovou hmotností, která umožňuje řízenou degradaci polymeru [8].

Degradace je proces štěpení řetězce, během kterého jsou polymerní řetězce zmenšeny na oligomery a následně až na monomery. Degradace dále navazuje na následnou erozi polymeru, což je proces ztráty materiálu, při kterém monomery a oligomery opouštějí daný polymer [9].

Pro degradabilní polymery jsou definovány dva rozdílné mechanismy eroze: homogenní neboli objemová eroze a heterogenní neboli povrchová eroze [10]. (Obr. 1). Objemová eroze degraduje polymery v celém jejich průřezu, protože penetrace vody do celého objemu polymeru je rychlejší než degradace polymeru. K uvolňování léčiva dochází kombinací procesu difuze a eroze. Permeabilita polymeru pro léčivo s časem roste a přesný stupeň uvolňování léčiva je proto nepředvídatelný. Celý proces mění charakter polymerní matrice a hrozí rozpad matrice před uvolněním veškerého léčiva. Na rozdíl od objemové eroze je u povrchové eroze degradace polymerů rychlejší než penetrace vody. V tomto případě tedy polymery erodují převážně na jejich povrchu. Během procesu se tedy mohou matrice zmenšovat, ale zachovávají si svůj původní geometrický tvar. Proto tvar matrice zůstane stejný po značnou dobu aplikace a uvolňování léčiva je konstantní. Výhodou povrchové eroze je možnost předpovědět průběh erozního procesu. Nicméně eroze se řídí pro většinu polymerů oběma

mechanismy. Eroze je tedy důležitý proces pro uvolňování léčiva z matrice polymeru. Uvolňování léčiva je klasifikováno na řízenou difuzi, řízené botnání a řízenou erozi.



**Obr. 1: Schématické znázornění povrchové a objemové eroze [10]**

Biodegradabilní polymer by mohl uvolňovat léčivo všemi třemi mechanismy, nejrychlejší mechanismus ale dominuje. V případě biodegradabilních polyesterů, které se skládají z monomerů spojených esterovou vazbou, začíná degradace po penetraci vody do aplikovaného tělesa. Rozpad esterové vazby nastane náhodně díky rozštěpení hydrolytického esteru, což vede následně k erozi přípravku [10].

Obecně je přijato, že PLGA a jeho homopolymery, kyselina polymléčná (PLA) a polyglykolová (PGA), degradují cestou objemové hydrolýzy jejich esterových vazeb [6]. Nakonec se vytvoří monomery kyseliny mléčné a glykolové, které jsou odstraněny z těla metabolickou cestou [4]. Kyselina mléčná vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselin (citrátový cyklus) a je metabolizována a následně eliminována z těla jako oxid uhličitý a voda. Kyselina glykolová je buď vylučována ledvinami jako nezměněná, nebo vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselin a nakonec je vylučována jako oxid uhličitý a voda [11].

Nicméně proces degradace PLGA není stále kompletně pochopen. Z obecného hlediska se hovoří o dvou jevech:

- 1) Degradace způsobuje zvýšení počtu volných karboxylových skupin, které pak dále mohou katalyzovat hydrolýzu dalších esterů [12].
- 2) S rostoucím časem degradace roste také množství oligomeru uvnitř matrix polymeru a rozpustné oligomery mohou uniknout z celého množství přípravku.

Ve velkých vzorcích pouze rozpustné oligomery, které se nacházejí blízko povrchu, mohou difundovat z matrix dříve, než jsou totálně degradovány, zatímco oligomery lokalizované více uvnitř matrix polymeru zůstávají zachyceny a zvyšují tak jeho aciditu (léčivo je pak vystaveno kyselému prostředí). Enkapsulované oligomery tedy zvyšují koncentraci esterových a karboxylových vazeb, které zvyšují rychlost degradace a autokatalýzy s ohledem na vnější část vzorku. Difuze [13] vede proto k rozdílům mezi povrchem a středem velkého vzorku [14].

Rychlost degradace je obecně ovlivněna několika fyzikálními a chemickými vlastnostmi, jako je molekulová hmotnost, typ chemické vazby, typ zastoupených monomerů, poměr kopolymerů (PLGA polymery obsahující 50:50 procent kyseliny mléčné a glykolové jsou hydrolyzovány rychleji než PLGA polymery, které obsahují větší poměr jednoho ze dvou monomerů [11]), vliv sousedních funkčních skupin [15], počáteční pH, iontová síla, teplota vnějšího média a teplota skelného přechodu. Dále je závislá na molekulové hmotnosti polymeru, polydisperzitě, krystalinitě (rychlost degradace se obvykle zvyšuje s klesající krystalinitou) a velikosti matrice [10]. K ovlivnění degradační rychlosti se ukázalo jako užitečné přidání látek regulující pH. Dále degradaci ovlivňuje přítomnost léčiva (především vliv hydrofilicity a acidobazicity léčiva). Bazická léčiva se mohou chovat jako autokatalyzátory a zvyšovat stupeň degradace nebo neutralizují konečná karboxylová rezidua polyesterů, čímž redukuje autokatalýzu kyselých koncových skupin a následně i degradaci. Léčiva s hydrofilními vlastnostmi jsou uvolňována rychleji než hydrofobní, což může být využito k řízenému uvolňování léčiva. Například poly( $\epsilon$ -kaprolakton), který je vysoce hydrofobní a krystalický polyester, degraduje velmi pomalu ve srovnání k amorfnímu méně hydrofobnímu PLGA. Degradační doba je díky závislostem na těchto proměnných různá (od několika týdnů až po roky) a umožňuje uvolňování léčiva po celou tuto dobu.

Zmíněné polyestery mají jednu charakteristickou společnou věc, a to že hydrolyticky citlivé skupiny jsou umístěny v hlavním řetězci polymeru. Tato charakteristická vlastnost pobízí k vývoji nových biodegradabilních polymerů odvozených od kyseliny vinné, která obsahuje navíc k esterové vazbě v řetězci polymeru také keto skupinu. Takzvané **polyvinany** se zdají být nadějně díky možnosti modifikace v polymerní struktuře. Dřívější experimenty ukázaly použitelnost popsanych

polyvinanů pro řízené uvolňování léčiva [16], nicméně až dosud nejsou tyto polyvinany komerčně využívány [14].

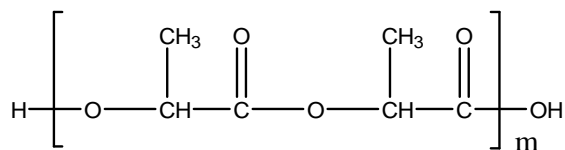
Obecně polyestery degradují delší dobu, což je nepříznivé, když potřebujeme, aby léčivo bylo uvolněno jen za pár dní nebo týdnů. Kvůli této skutečnosti byl proto zájem posunut na polymery, které se degradují rychleji a dovolují řídit uvolňování léčiva výhradně erozí polymeru, což vedlo k vývoji **polyorthoesterů** (POE) [17].

POE první a druhé generace jsou pevné materiály, zatímco polymery následujících generací jsou polotuhé a umožňují tak inkorporaci léčivé látky nebo přísady jednoduchým smísením. Vyvarujeme se tak potřebě rozpouštědel nebo zvýšené teploty, což je hlavní výhodou nad ostatními polymery. Jelikož je vazba orthoesterů acidolabilní, rychlost degradace můžeme modulovat pomocí pH. Snížením pH dochází při styku vody s polymerem ke zrychlení hydrolýzy, zatímco zvýšené pH vede ke snížení rychlosti hydrolýzy [18]. Doba degradace POE se může různit od několika dní po několik měsíců. Proto jsou tyto polymery využívány pro krátce i dlouhodobě působící nosičové systémy [19].

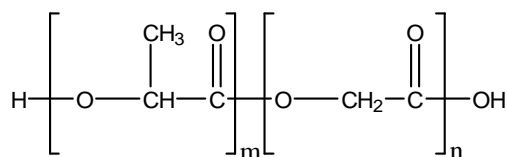
Další skupinou biodegradabilních polymerů jsou **polyanhydridy**. Byly zkoumány v 80. letech minulého století jako nosiče léčiv a jejich množství v posledních letech ohromně vzrostlo [20]. Nejlépe charakterizované polyanhydridy jsou p(CPP-SA), což je kopolymer kyseliny sebakové (SA) a 1,3-bis(*p*-karboxyfenoxy)propanu (CPP) a p(FA-SA) složený z kyseliny sebakové a fumarové (FA). Za výhodu polyanhydridů se může považovat fakt, že obsahují více reaktivních funkčních skupin vhodných pro degradaci. Polyanhydridy degradují díky jejich chemické povaze velice rychle předvídatelnou rychlostí několik dní až týdnů [21]. Proto hlavním použitím této skupiny polymerů jsou krátkodobě řízené nosičové systémy bioaktivních látek. Rychlost degradace může být regulována hydrofobními a hydrofilními komponenty v kopolymeru. Na rozdíl od PLA, PLGA a PCL polyanhydridy a POE podléhají povrchové erozi, protože jsou složeny z rychle degradujících funkčních skupin. Proto může být uvolňování léčiva řízeno hlavně erozí polymeru. Ačkoliv se zdá, že je povrchová eroze pro ně charakteristická, je silně spojena s velikostí přípravku a pod kritickým velikostním limitem tuto vlastnost ztrácí [22].

**Tab. 1: Chemická struktura biodegradabilních polymerů**

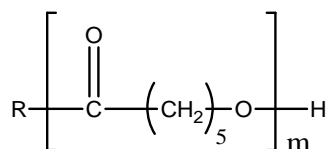
**Polyestery**



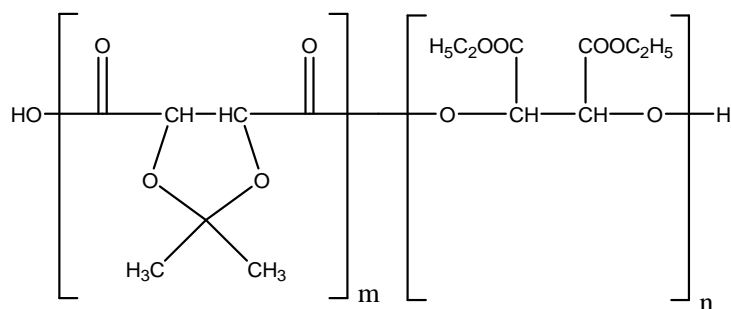
Polylaktid



Poly(laktid-*ko*-glykolid)



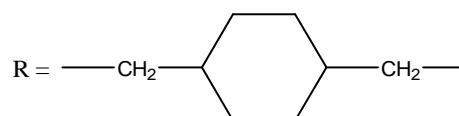
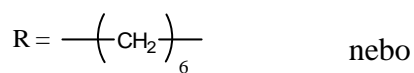
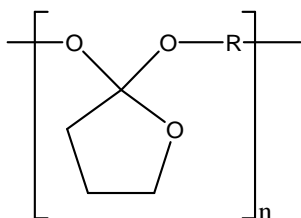
Poly( $\epsilon$ -kaprolakton)



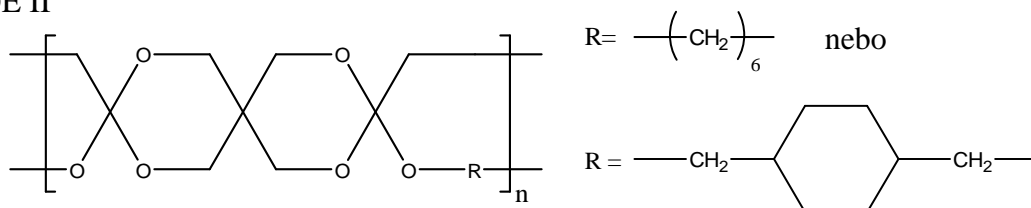
Polyvinan

**Polyorthoestery**

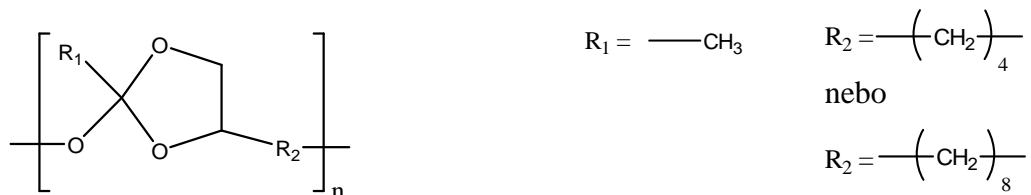
POE I



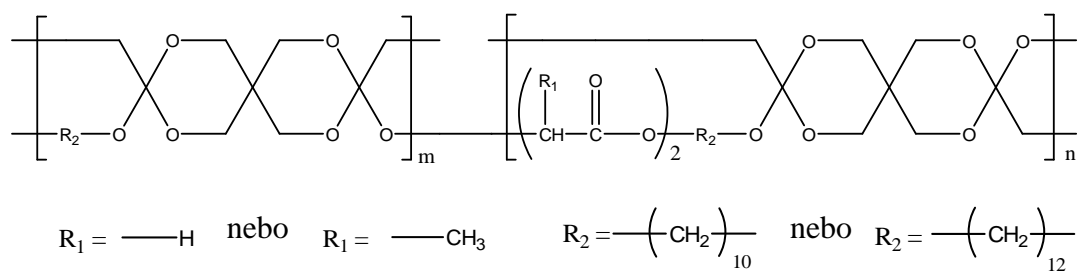
POE II



POE III

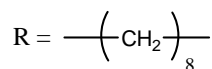
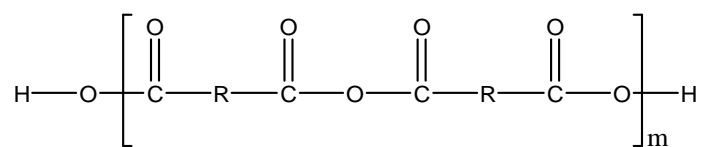


POE IV

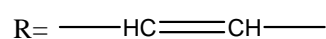



---

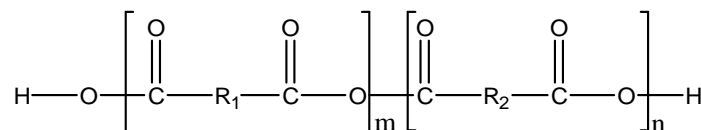
**Polyanhydridy**



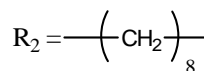
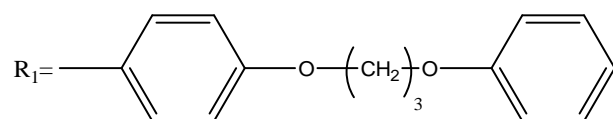
Kyselina polysebaková



Kyselina polyfumarová



Poly[1,3-bis-(*p*-karboxy-fenoxy)propan-*co*-sebacic acid]



## 2.2 POUŽITÍ BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ VE VETERINĚ

### 2.2.1 Biodegradabilní nosiče využívané k řízení reprodukce zvířat

Reprodukce zvířat může být řízena dvěma různými způsoby: synchronizací říje převážně u dobytka a kontracepcí u domácích zvířat. Tichá říje je u dobytka v mnoha případech odpovědná za neplodnost a je proto hlavním důvodem pro manipulování s říjí a ovulací pomocí synchronizace říje samic, které jsou oplodněny v předem určenou dobu. Řízená reprodukce má různé výhody:

- a) používání umělého oplodnění pomocí čerstvého nebo zmrazeného spermatu zabezpečuje genetickou různorodost chovu a zabraňuje přenosu nemocí
- b) je redukována doba a práce věnovaná detekci říje
- c) dovoluje reprodukci během roku a zlepšuje reprodukční efektivnost [2].

**Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL)** se zdá být vhodný biodegradabilní polymer pro výrobu vaginálních léčivých nosičových systémů pro podání progesteronu k ovlivnění říje a k synchronizaci krav, ovcí, prasat a koní [23]. Na skotu byly porovnávány PCL inserty s komerčně dostupným nedegradabilním silikonovým insertem (CIDR-B<sup>TM</sup>). Oba obsahují 10% w/w progesteronu. Po sedmi denní terapii dosahoval progesteron po podání PCL insertu stejné průměrné koncentrace v plazmě jako po podání silikonového insertu [24].

Pro modifikaci uvolňování progesteronu z vaginálních insertů se začleňuje do základu laktóza, polyethylenoxid nebo různé typy cyklodextrinů. PCL inserty jsou dobře tolerovány zvířaty, jsou bioekvivalentní ke komerčním silikonovým insertům. Studie ukázaly, že PCL inserty obsahující 10% w/w progesteronu jsou klinicky přinejmenším tak efektivní jako komerční silikonové produkty [25].

**DL-PLA** je používán k výrobě mikrosfér obsahující steroidy emulzní metodou extrakce rozpouštědla. Momentálně existuje pouze jeden preparát (Lutamate Plus<sup>TM</sup>), který je komerčně dostupný pro přesné řízení ovulace u kobyly. Mikrosféry pro intramuskulární injekce obsahují 100 mg estradiolu a 1250 mg progesteronu. V kontrolované multicentrální klinické studii se 135 kobyly se po následující léčbě zvýšil počet kobyly, u kterých se objevila říje, z 63 na 87% [26].

K ovlivnění plodnosti u domácích zvířat byly zkoušeny analogy gonadotropin releasing hormone (hormon uvolňující gonadotropin) (GnRH) pomocí biodegradabilních nosičů. Nejčastěji studovaný polymer v této oblasti byl **PLGA** [27]. Mikročástice [27], lisované implantáty [28] nebo implantáty tvořené in-situ [29] připravené z různých typů těchto polymerů obsahujících analogy GnRH byly úspěšně užívány pro kastraci psů od 1 do 6 měsíců.

Dalšími polymery, které jsou vhodné pro studium ovlivnění reprodukce ve veterinární oblasti jsou **polyanhydridy**. K navození ovulace a tvorbě spermií u ryb byly připraveny technikou dvojité emulze p(FAD-SA) mikrosféry obsahující analog GnRH (D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>NEt-GnRH). Také **POE** s nízkou molekulovou hmotností a obsahující 30% mléčných kyselin v řetězci byla použita pro synchronizaci říje u ovcí [30].

Implantáty in-situ jsou ve srovnání s mikrosférami dražší a efektivnější nosičové systémy. Obsahují léčivou látku, polymer a organické rozpouštědlo. Polymer je rozpuštěn ve farmaceuticky vhodném rozpouštědle jako je N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) nebo benzoylbenzoát. Roztok je pak smíchán s farmaceuticky aktivní složkou, která je také rozpuštěna v rozpouštědle nebo je dispergována v případě nerozpustného léčiva a výsledný roztok nebo suspenze je pak jehlou aplikována s.c. nebo i.m. [31]. Po vstříknutí injekce se nosič díky kontaktu s tkáňovou tekutinou vysráží a vytvoří pevný film nebo implantát a rozpouštědlo difunduje do krve [32]. Tato metoda byla poprvé využita ve firmě ATRIX Laboratories a byla pojmenována jako Atrigel technology<sup>TM</sup>. Léčivo včleněné uvnitř implantátu se pak uvolňuje řízeně podle času biodegradace matrix polymeru. Uvolňování léčiva může být regulováno např. změnou složení polymeru nebo změnou molekulové hmotnosti polymeru. Díky této jednoduché výrobě je tato technologie cenově výhodnější než např. mikrosféry. NMP, které je často používáno jako rozpouštědlo, způsobuje během aplikace bolestivou reakci, proto by byla alternativní rozpouštědla pro veterinární užití výhodnější [3]. Rozpouštědlo musí být biokompatibilní, netoxické, s dostatečně nízkou viskozitou, aby bylo možné jejich injekční podání a aplikace nebyla bolestivá.



### 2.2.2 Biodegradabilní nosiče využívané v boji proti ektoparazitům

Důležitou roli při ochraně zdraví zvířat zahrnuje také boj proti ektoparazitům (blecha, klíště, moucha), kteří způsobují svým hostitelům utrpení. Např. u domácích zvířat ektoparazité způsobují onemocnění kůže, které ovlivňuje jejich pohodu. U skotu se projevuje ztráta váhy a dochází k redukci produkce mléka. I v této oblasti se tedy výzkum věnuje vývoji biodegradabilních nosičů [33]. Pro léčivé látky typu ivermektinů nebo makrocyclických laktonů se zkouší nosiče z PLGA a PLA.

Mikrosféry obsahující ivermektin a **PLA** nebo **PLGA** (kopolymery v poměru 50:50 a 90:10) byly připraveny technikou odpařování rozpouštědla. Studie na španělských kozách ukázaly, že ivermektin uvolněný z PLGA mikrosfér vytváří terapeutickou hladinu po dobu 10-12 týdnů a z PLA mikrosfér po dobu 24 týdnů.

Použití PLGA a PLA jsou velmi výhodné pro dlouhodobé nosiče ivermektinu, nemusí být tak často podávány jako např. komerční bolus (IVOMEK®<sup>SR</sup>). Dokonce je při léčbě spotřeba léčiva nižší, použijeme-li místo intraruminálního bolusového systému mikročástice [34].

DL-PLA a PLGA mikrosféry nebo implantovatelné pelety s methoprenem byly také testovány u skotu k léčbě ektoparazitů [35]. Po subkutánním podání preparátu do uší zamořeného skotu se předešlo vývoji larvy v dospělého jedince.

Další testované polymery jsou např. **PCL** nebo **POE**.

### 2.2.3 Biodegradabilní nosiče využívané k vakcinaci

Vakcinace je nejúspěšnější procedura, díky které dokážeme předcházet nemocem a ztrátám zvířat. Dobrý nosič vakcín je charakterizován řízeným pulzačním uvolňováním antigenu dostatečnou dobu na to, aby docílil velmi efektivní ochrany proti určitým chorobám a redukoval nebo eliminoval pozdější očkování [36].

K vakcinaci jsou široce zkoušeny biodegradabilní mikrosféry [37]. **Kopolymery esterů kyseliny polymléčné a polyglykolové** jsou široce užívány k výrobě biodegradabilních mikrosfér, které působí jako depo pro antigeny vakcíny [38]. Mikrosféry menší než 10 µm jsou fagocytovány makrofágy, zatímco větší částice jsou

zničeny in vivo ještě předtím, než můžou být vůbec fagocytovány. Tyto poznatky byly demonstrovány na myši intraperitoneálním vstříknutím enterotoxinu B v PLGA mikrosférách o průměru 1-10  $\mu\text{m}$ , 20-125  $\mu\text{m}$  nebo směsí obou velikostí [39]. Podání směsí mikrosfér, které se liší velikostí, může navodit dlouhodobou imunitu. Koncentrace antigenu také ovlivňuje rychlost uvolňování antigenu a následnou indukci imunitní odpovědi. Větší množství antigenu v mikrosférách urychluje uvolňování díky tomu, že je více antigenu vázáno blízko povrchu [38].

Existuje mnoho virových infekcí, které vyžadují očkování k indukci protilátek. Např. inaktivovaný Venezuelský virus inkorporovaný do PLGA mikrosfér byl vstříknut myši. Myš, která byla očkována mikrosférami, byla lépe chráněna než myš, které byl vstříknut neinkorporovaný virus. Takové vakcíny se tedy mohou použít při ochraně před encefalitidou např. u koní [40]. Dalším příkladem je virus parainfluenzy způsobující respirační onemocnění u dobytka. Dobytek očkovaný PLGA mikrosférami obsahující virus parainfluenzy ukazoval vyšší titr protilátek (až 70 dní) [41].

Příkladem bakteriální vakcíny je *Salmonella enteritis* inkorporovaná v PLGA mikrosférách [42]. Mikrosféry byly podány slepicím pro ochranu kuřat před infekcí pasivní imunizací žloutku. Testované preparáty účinkovaly na stimulaci imunitního systému 9 měsíců.

Zkoušejí se také inkorporované podjednotky antigenu *Fasciola gigantica* v PLGA mikrosférách. *Fasciola gigantica* je cizopasník, který poškozuje játra dobytka, ovcím, koním, jelenům, kozám a psům a způsobuje tak ročně milionové ztráty pro hospodářství [43]. Tyto náklady by se mohly zredukovat díky léčbě zvířat vhodným očkovacím preparátem.

Jak už bylo řečeno, PLGA a jeho homopolymery jsou vhodné také v technologii implantátů in-situ. Na myši a kanci byl testován přípravek Atrigel technology<sup>TM</sup> obsahující jako antigen ovalbumin (OVA). Ukázalo se, že implantáty efektivně imunizovaly kance k produkci IgG jako odpověď proti malému množství inkorporovaného ovalbuminu po jediném podání [38]. Technika Atrigel technology<sup>TM</sup> je také vhodná k podání směsi antigenů jako je vakcína inaktivovaného pseudorabies viru (PRV) kancům [38].

## 2.2.4 Biodegradabilní nosiče využívané ke stimulaci růstu zvířat

Pro podporu růstu u dobytka se už přes 40 let užívají steroidy [44]. Vývoj rekombinantní technologie ale dovoluje ve velkém měřítku produkci somatotropinu a tedy i jeho komerčního využití k redukci tuku v mase. Somatotropin zvyšuje také produkci mléka u dojnic. Díky fyzikálně-chemickým vlastnostem ale somatotropin a ostatní peptidy a proteiny ztrácí svou aktivitu po orálním podání a jejich absorpce je velmi malá [45]. Ve výzkumu jsou proto parenterální nosičové systémy pro dlouhodobé uvolňování peptidů nebo proteinů podporující růst, jako jsou somatotropin, analogy growth hormone releasing factor (faktor uvolňující růstový hormon) (GHRF) nebo syntetický growth hormone releasing hormone (hormon uvolňující růstový hormon) (GHRH).

Biodegradabilní polymery ve formě mikrosfér byly zkoušeny u dobytka pro schopnost uvolnění látky, která po injekčnímu podání ovlivňuje jejich růst [46]. Např. **polyglykolová kyselina** byla užita k enkapsulaci prasečího somatotropinu (pST) do mikrosfér. Bylo ale zjištěno nedokonalé uvolnění pST z mikrosfér (méně než 30% množství léčiva v mikrosférách), což je přisouzeno nestabilitě pST v preparátu [47]. Díky tomuto zjištění se vývoj zabývá hledáním více stabilních peptidů a proteinů, které stimulují uvolňování somatotropinu, jako jsou analogy GHRF, prasečí rismorelin nebo syntetický GHRH. PLGA (kopolymery v poměru 85:15) a prasečí rismorelin byly zpracovány do mikrosfér metodou vypaření modifikovaného rozpouštědla. Touto metodou se snižuje rozpustnost peptidu ve vodě a tím se v průběhu sníží jejich ztráta [48]. Podání prasečího rismorelinu obsaženého v mikrosférách prasatům vede k redukci exkrece dusíku močoviny v moči a séru, což ukazuje, že prasata odpovídají na léčbu přestavbou močoviny na proteiny a svaly. Rismorelin byl uvolňován stejnou rychlostí dlouhou dobu, tudíž jsou PLGA mikrosféry vhodné pro dlouhodobé dodání tohoto peptidu. Další možností jak zrychlit růst u skotu je podání PLGA mikrosfér obsahující analogy GHRF [46]. Uvolněné analogy GHRF vyvolají vzrůst koncentrace somatotropinu v séru po dobu dvou týdnů. Navazující studie se musí zaměřit na stanovení koncentrace somatotropinu v séru, která je dostačující k ovlivnění růstu.

Aktuálně ale nejsou na trhu žádné biodegradabilní preparáty k ovlivnění růstu. Důvodem je jejich vysoká cena. Krátce je dostupný komerční přípravek

(Monensin RDD<sup>TM</sup>) skládající se z PLGA a monensinu sodného, což je antimikrobiální látka ovlivňující růst skotu [49].

### 2.2.5 Další užití biodegradabilních polymerů ve veterině

Různé druhy biodegradabilních polymerů se víceméně liší ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech a způsoby degradace, což nabízí možnost formulovat řadu léčiv do biodegradabilních nosičových systémů. Ve skutečnosti je ale popsáno v literatuře jen několik biodegradabilních nosičových systémů, např. antimikrobiální látky [50], vitamínové preparáty [51], antiemetika [52] nebo cytostatika [53].

Příkladem biodegradabilních polymerů používaných k uvolňování antibiotik jsou **PLA** mikrosféry naplněné ofloxacinem nebo klarithromycinem [54]. Na ovcích byly v poslední době zkoušeny nové biodegradabilní injekční gelové preparáty pro prolongované uvolňování oxytetracyklinu [55]. Atrigel technology<sup>TM</sup> byla úspěšně využita k vývoji dentálních gelů k léčbě ozubice u psů. Z DL-PLA implantátu tvořícího se in-situ se uvolňuje nejméně 7 dní antibiotikum doxycyklin (HESKA PERIOceutic Gel<sup>TM</sup>). Pro skot byly vyvinuty PLGA mikrosféry obsahující cefadrin a  $\beta$ -laktámová antibiotika [56].

**PLGA** se zase používá k přípravě preparátu s řízeným uvolňováním vitamínů. Mikročástice obsahující vitamín B<sub>12</sub>, který se uvolňuje více než 20 dní, se užívají ke zlepšení energetického a proteinového metabolismu u zvířat (SmartShot<sup>TM</sup>) [51].

Polotuhé **polyorthoestery** jsou dalšími zajímavými polymery využívanými ve veterině k injekční aplikaci v léčbě gastrointestinálních potíží u psů [19] projevující se hlavně zvracením. Metoklopramid (léčba a prevence různých typů zvracení) musí být v důsledku krátkodobého biologického poločasu podáván p.o. 4x denně k udržení terapeutické koncentrace po celý den [52]. Užitečným by proto byl retardovaný preparát na 3-5 dní, který zabrání kolísání plazmatické hladiny léčiva. Toto kolísání hladin léčiva způsobuje totiž nepříznivé reakce zejména v dlouhodobé terapii a užitím retardovaného preparátu by došlo tedy i ke zlepšení compliance. Preparát byl připraven jednoduchým smícháním léčiva a viskózního POE.

## 2.3 PERSPEKTIVA BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ

Biodegradabilní polymery se velice osvědčily ve vývoji nových, zdokonalených a účinných nosičů léčiv. Jsou schopné dodat širokou paletu bioaktivního materiálu v široké oblasti veterinárních aplikací.

Pro takové biodegradabilní nosiče léčiv jsou obecně vhodné takové látky, které potřebujeme podávat delší dobu, které jsou vysoce účinné nebo mají krátký biologický poločas (např. peptidy a proteiny).

V posledních dvou desetiletích dokážeme vyrobit biodegradabilní nosiče mnohem praktičtěji a levněji, ačkoliv do současnosti pouze několik nosičových systémů vstoupilo na trh. Důvodů je mnoho. Mnoho léčiv, jako peptidy a proteiny, je citlivých k vyšší teplotě, střížným silám při míchání nebo organickým rozpouštědlům. Ty jsou ale potřebné pro většinu výrobních procesů u klasických biodegradabilních nosičových systémů jako jsou mikrosféry nebo implantáty. Rozpouštědlo a šetrné metody jsou tedy významné pro vyhnutí se problémům se stabilitou během výroby. Nadějně jsou polymery, do kterých se inkorporují citlivé nebo nestabilní léčiva jednoduchým smícháním bez použití tepla nebo rozpouštědel, např. viskózní polyorthoestery. Dále některé faktory jako je vlhkost, okyselení nebo interakce mezi polymerem a léčivem vedou během skladování a uvolňování ke snížení stability.

Důležitým krokem je také plné pochopení degradačního mechanismu použitého polymeru, aby se dokázalo nastavit profil uvolňování. Ačkoliv byly degradační studie provedeny hlavně s alifatickými polyestery, degradační mechanismus těchto polymerů není stále kompletně pochopen a vyžaduje další výzkum. Nicméně v budoucnu mnoho nových terapeutických látek bude vyžadovat parenterální aplikaci a bude mít prospěch z výhod biodegradabilního polymeru,

Aktuálně se ve veterinární aplikaci zkoumá slibné využití biodegradabilních systémů, jako je řízená tkáňová regenerace, oční onemocnění, jednorázové očkování, osteoarthritis nebo řízení plodnosti.

## 2.4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>DL-PLA</i>	D, L konfigurace kyseliny polymléčné
<i>GHRF</i>	faktor uvolňující růstový hormon
<i>GHRH</i>	hormon uvolňující růstový hormon
<i>GnRH</i>	hormon uvolňující gonadotropin
<i>i.m.</i>	intramuskulární podání
<i>NMP</i>	N-methyl-2-pyrrolidon
<i>PCL</i>	poly( $\epsilon$ -kaprolakton)
<i>PGA</i>	kyselina polyglykolová
<i>PLA</i>	kyselina polymléčná
<i>PLGA</i>	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
<i>POE</i>	polyorthoestery
<i>p.o.</i>	perorální podání
<i>pST</i>	prasečí somatotropin
<i>s.c.</i>	subkutánní podání

### 3. CÍL PRÁCE

Cíl diplomové práce byl zadán v souvislosti se studiem interakcí biodegradabilních oligoesterových a polyesterových látek s větvenou konstitucí molekuly s hydrofilním kapalným prostředím. Oligomerní nebo polymerní látky originální struktury jsou potenciálními nosiči léčiv studovanými systematicky na pracovišti školitele. Cíl práce je možno rozčlenit do následujících bodů:

- Připravit matrice tvaru válečků o hmotnosti 150 mg z nejméně dvou různých polymerů nebo oligomerů kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové s větvenou konstitucí molekuly vyznačujících se oscilačním průběhem stupně botnání v prostředí vody.
- Umístit jednotlivé matrice do vody při 37 °C a v časových intervalech 1 den, 3 dny, 7 dní, 14 dní a 21 dní odebrat některé ze vzorků a podrobit je destruktivní zkoušce, která zahrnuje tři parametry- erozi, botnání a koncentraci karboxylů ve frakci rozpustné ve vodě.
- Vyhodnotit data ze tří zkoušek interakce nosičů léčiv s vodou při teplotě 37 °C a ze souvislostí mezi nimi vyslovit pracovní hypotézu nebo závěr o podstatě nebo mechanismu některých změn, ke kterým dochází v průběhu degradace matric

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE**

#### **4.1.1 Chemikálie**

Oligoesterové nosiče (tab. 2), Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Destilovaná voda, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Chloroform p.a., Penta Chrudim

Chlorid sodný p.a., Lachema a.s.

Hydroxid draselný p.a., Lachema a.s.

Methanol p.a., Lachema a.s.

Ethanol 96%, Penta Chrudim

Phenolphthaleinum, Zdravotnické zásobování, Říčany u Prahy

#### **4.1.2 Přístroje**

Digitální váhy, KERN 440-35N (max. 400 g, d=0,01 g)

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

Horkovzdušná sušárna, MEMMERT ULE 400

Magnetická míchačka, HEIDOLPH MR 3001

Termostatovaná třepačka, JULABO HS

Biologický termostat, BT 120

Vakuová sušárna, HSPT 200, MEMMERT



### 4.1.3 Charakteristika použitých oligoesterových nosičů

Použité polymery byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Syntéza: stupňová polykondenzace ternární směsi složené z ekvimolárního podílu kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové doplněné větvičnými monomery dipentaerythritolem v hmotnostní koncentraci 2% nebo tripentaerythritolem v hmotnostní koncentraci 1%, 3% nebo 5%.

Molekulární hmotnosti byly stanoveny metodou CPC-MALLS, hodnota  $T_g$  metodou DSC.

**Tab 2: Charakteristiky testovaných oligoesterových nosičů**

nosič	D/T [%]	$M_n$	$M_w$	$M_w / M_n$	MP	$M_z$	$M_{z+1}$	$g'$	$\Delta C_p$	$T_g$
<b>2D</b>	2/0	2645	6174	2,33	6287	9271	12391	0,52	1,618	17,9
<b>5T</b>	0/5	3016	8555	2,84	6379	15025	22625	0,34	0,471	17,2
<b>3T</b>	0/3	3355	13334	3,97	9074	27152	43224	0,31	0,508	21,7
<b>1T</b>	0/1	2877	12035	4,18	16849	26284	41062	0,42	0,656	25,3

#### Použité symboly:

*D* dipentaerythritol

*T* tripentaerythritol

$M_n$  číselně střední relativní molekulová hmotnost

$M_w$  hmotnostně střední relativní molekulová hmotnost

$M_w/M_n$  stupeň polydisperzity

*MP* pík relativní molekulární hmotnosti

$M_z$  charakteristika frakce velkých molekul ve vzorku

$M_{z+1}$  charakteristika úzké frakce extrémně velkých molekul ve vzorku

$\Delta C_p$  tepelná kapacita [J/K.g]

$g'$  index větvení molekul

$T_g$  teplota skelného přechodu [°C]

## 4.2 STANOVENÍ STUPNĚ BOTNÁNÍ A STUPNĚ EROZE TESTOVANÉHO NOSIČE

### 4.2.1 Příprava matric

K přípravě matric ze zkoušeného polymeru byly použity hadičky ze silikonové pryže o vnitřním průměru 4 mm. Hadičky byly nejprve umyty pomocí injekční stříkačky naplněné vodou s detergentem a vypláchnuty destilovanou vodou. Poté byly hadičky umístěny do horkovzdušné sušárny vyhřáté na 80 °C.

Mezitím bylo naváženo potřebné množství polymeru navýšené o předpokládané ztráty, cca 20%. Kádinka s naváženým polymerem byla umístěna do silikonové lázně na magnetickou míchačku. Teplota lázně se udržovala na hodnotě o cca 20 °C vyšší než je teplota skelného přechodu daného polymeru. Postupně měknoucí polymer nebyl míchán z důvodu vyvarování se vzniku vzduchových bublin.

Po dostatečném zahřátí polymeru a jeho přechodu do plastického stavu byla horká hadička připojena jedním koncem k peristaltickému čerpadlu a druhým koncem byla ponořena do roztaveného polymeru. Poté, co přestala tavenina v hadičce stoupat (chladnutí polymeru), byla hadička ustřižena a konce hadičky se uzavřely pryžovými zátkami. Tento celek se nechal chladnout v rovné poloze s ohledem na jeho další snadnější zpracování a byl umístěn přes noc do exsikátoru.

Po ztuhnutí byla silikonová hadička rozříznuta podél pomocí žiletky a sklovitý polymer byl vyjmut. Vzhledem k hygroskopičnosti materiálu se pracovalo v rukavicích.

Vzniklé válce o průměru 4 mm byly poté nařezány na délku cca 1 cm pomocí speciálně upravené žiletky. Na upravené žiletce se nastavila vzdálenost břitu od dorazu tak, aby výsledná matrice měla hmotnost  $150 \text{ mg} \pm 5\%$ , tzn. v intervalu 142,5 až 157,5 mg včetně. Každý váleček se jednotlivě zvažil, pokud byl váleček těžší než 157,5 mg, byla jeho hmotnost upravena pomocí jemného smirkového papíru. Válečky s hmotností pod 142,5 mg byly vyřazeny. Vyhovující válečky se umístily do exsikátoru.

## 4.2.2 Příprava vzorků

Čistá a prázdná scintilační lahvička označená jednoznačným kódem byla zvážena na analytických vahách. Hodnota se zapsala jako  $m_x$ . Poté byl pomocí pinzety do této lahvičky vložen váleček a zvažila se celková hmotnost lahvičky a válečku ( $m_x+m_0$ ).

Do lahvičky s matricí pak bylo nalito 15 ml destilované vody. Lahvička se uzavřela a umístila do termostatované třepačky vytemperované na 37° C. Zde byly vzorky umístěny 3 dny, poté byly přemístěny do biologického termostatu, kde byla nastavena tatáž teplota. Analogicky se postupovalo i při přípravě dalších vzorků.

Vodné médium bylo vyměňováno každé 3 dny.

## 4.2.3 Postup při stanovení stupně botnání a eroze

Měření probíhalo v intervalech 1, 3, 7, 14 a 21 dní od přidání vodného média k matrici. Pro každý interval byly použity 2 vzorky.

Vzorky s příslušným kódem, který označoval interval měření, byly vyjmuty z termostatu a vodné médium se opatrně slilo. Pomocí vatové tyčinky byly odstraněny kapky vody. Dosušení lahvičky se provedlo pomocí vysoušeče vlasů tak, aby nedošlo ke ztrátám vody ze zbotnalé matrice.

Lahvičky se zbotnalým válečkem byly následně zváženy a naměřené hodnoty zapsány ( $m_x+m_b$ ). Lahvičky byly umístěny na den do vakuové sušárny, kde se sušily při teplotě 70 °C. Po vysušení do konstantní hmotnosti byly lahvičky opět zváženy a hodnoty zapsány ( $m_x+m_s$ ).

Z naměřených hodnot se vypočítal stupeň botnání a eroze.

### **STUPEŇ BOTNÁNÍ:**

$$B = \frac{m_b - m_s}{m_s} \cdot 100$$

$B$  stupeň botnání [%]

$m_b$  hmotnost zbotnalé matrice [g]

$m_s$  hmotnost vysušené matrice [g]

### **STUPEŇ EROZE:**

$$E = \left( 1 - \frac{m_0 - m_s}{m_0} \right) \cdot 100$$

$E$  stupeň eroze [%]

$m_0$  počáteční hmotnost matrice [g]

$m_s$  hmotnost vysušené matrice [g]

## **4.3 STANOVENÍ KARBOXYLOVÉHO ČÍSLA**

### **4.3.1 Příprava odměrného roztoku**

Odměrný roztok hydroxidu draselného byl připraven rozpuštěním 1,1222 g KOH v methanolu ve 2000,00 ml odměrné baňce. Koncentrace byla stanovena jako 0,0099 mol/l.

### **4.3.2 Příprava indikátoru**

Roztok phenolphtaleinu byl připraven rozpuštěním 1,00 g phenolphtaleinu v 80,00 ml 96% ethanolu a doplněním do objemu 100,00 ml destilovanou vodou.

### **4.3.3 Postup při stanovení karboxylového čísla**

Pro toto stanovení byla použita řada vzorků, které se připravily analogicky k vzorkům pro stanovení stupně botnání a eroze.

Po uplynutí daného intervalu byly vzorky vyjmuty z termostatu, vodné médium se slilo a stěny lahvičky se osušily vatovou tyčinkou. Ke zbotnalému polymeru v lahvičce

bylo přilito 5,00 ml chloroformu. Po rozpuštění polymeru bylo do lahvičky přidáno 5,00 ml destilované vody a obsah se několikrát intenzivně protřepal. Pokud byla po oddělení vrstev vodná vrstva zakalená, k soustavě se přidalo 0,1 g chloridu sodného a postup se opakoval. Po oddělení fází pak bylo injekční stříkačkou odebráno 3 ml horní vodné fáze a přeneseno do vytárované kádinky na analytických vahách, hmotnost se zapsala ( $h$ ). Do kádinky bylo vloženo magnetické míchadlo a přikápnut indikátor. Kádinka se umístila na magnetickou míchačku a do ní bylo ponořeno ústí byrety s odměrným roztokem hydroxidu draselného. Titrovalo se do prvního růžového zbarvení roztoku, které setrvalo po dobu minimálně 5 sekund. Spotřeba odměrného roztoku se zaznamenala.

Vzorek pro slepou titraci byl připraven třepáním 5,00 ml chloroformu s 5,00 ml destilované vody a 0,1 g chloridu sodného. Spotřeba slepé titrace ( $V_0$ ), která činila 0,05 ml, se zjistila titrací vodné vrstvy.

**KARBOXYLOVÉ ČÍSLO** bylo vypočítáno dle následujícího vztahu:

$$k = c_{KOH} \cdot (V_{KOH} - V_0) \cdot \frac{5 + (m_b - m_s)}{h} \cdot \frac{1}{m_s}$$

$k$	karboxylové číslo [mol/g]
$c_{KOH}$	koncentrace odměrného roztoku KOH [mol/l]
$V_{KOH}$	spotřeba odměrného roztoku KOH [l]
$V_0$	spotřeba slepé titrace [l]
$m_b$	hmotnost zbotnalé matrice [g]
$m_s$	hmotnost vysušené matrice [g]
$h$	hmotnost odebrané vodné fáze k titrování [g]

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 TABULKY A GRAFY

Tabulka 3: Naměřené hodnoty nosiče 2D.....	31
Tabulka 4: Časový průběh stupně botnání nosiče 2D v %.....	31
Tabulka 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 2D v mol/g.....	31
Tabulka 6: Časový průběh stupně eroze nosiče 2D v %.....	31
Tabulka 7: Naměřené hodnoty nosiče 5T.....	32
Tabulka 8: Časový průběh stupně botnání nosiče 5T v %.....	32
Tabulka 9: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 5T v mol/g.....	32
Tabulka 10: Časový průběh stupně eroze nosiče 5T v %.....	32
Tabulka 11: Naměřené hodnoty nosiče 3T.....	33
Tabulka 12: Časový průběh stupně botnání nosiče 3T v %.....	33
Tabulka 13: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T v mol/g.....	33
Tabulka 14: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T v %.....	33
Tabulka 15: Naměřené hodnoty nosiče 1T.....	34
Tabulka 16: Časový průběh stupně botnání nosiče 1T v %.....	34
Tabulka 17: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T v mol/g.....	34
Tabulka 18: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T v %.....	34
Graf 1: Časový průběh stupně botnání nosiče 2D.....	35
Graf 2: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 2D.....	36
Graf 3: Časový průběh stupně eroze nosiče 2D.....	37
Graf 4: Časový průběh stupně botnání nosiče 5T.....	38
Graf 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 5T.....	39
Graf 6: Časový průběh stupně eroze nosiče 5T.....	40
Graf 7: Časový průběh stupně botnání nosiče 3T.....	41
Graf 8: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T.....	42
Graf 9: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T.....	43
Graf 10: Časový průběh stupně botnání nosiče 1T.....	44
Graf 11: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T.....	45
Graf 12: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T.....	46

**Tab. 3: Naměřené hodnoty nosiče 2D**

Veličina	Vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
$m_0$ [g]	A	0,1455	0,1514	0,1541	0,1537	0,1512
$m_0$ [g]	B	0,1526	0,1503	0,1557	0,1461	0,1563
$m_b$ [g]	A	0,1602	0,1583	0,1132	0,0609	0,0180
$m_b$ [g]	B	0,1687	0,1564	0,1135	0,0534	0,0220
$m_s$ [g]	A	0,1331	0,1197	0,0953	0,0500	0,0173
$m_s$ [g]	B	0,1416	0,1180	0,0965	0,0447	0,0208
$h$ [g]	A	3,0188	3,0363	3,0000	3,0018	2,9962
$h$ [g]	B	3,0334	3,0980	3,0300	3,0065	2,9998
$V_{KOH}$ [ml]	A	4,14	2,30	1,15	0,31	0,14
$V_{KOH}$ [ml]	B	4,03	2,65	1,17	0,36	0,14

**Tab. 4: Časový průběh stupně botnění nosiče 2D v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	20,36	32,25	18,78	21,80	4,05
B	19,14	32,54	17,62	19,46	5,77

**Tab. 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 2D v mol/g**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$1,477 \cdot 10^{-3}$	$9,395 \cdot 10^{-4}$	$5,684 \cdot 10^{-4}$	$2,720 \cdot 10^{-4}$	$2,339 \cdot 10^{-4}$
B	$1,437 \cdot 10^{-3}$	$1,086 \cdot 10^{-3}$	$5,788 \cdot 10^{-4}$	$3,243 \cdot 10^{-4}$	$2,339 \cdot 10^{-4}$

**Tab. 6: Časový průběh stupně eroze nosiče 2D v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	91,48	79,06	61,84	32,53	11,44
B	92,79	78,51	61,98	30,60	13,31

**Tab. 7: Naměřené hodnoty nosiče 5T**

Veličina	Vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
$m_0$ [g]	A	0,1564	0,1520	0,1502	0,1520	0,1511
$m_0$ [g]	B	0,1537	0,1512	0,1569	0,1549	0,1481
$m_b$ [g]	A	0,1652	0,1645	0,1808	0,1186	0,0755
$m_b$ [g]	B	0,1599	0,1658	0,1863	0,1240	0,0718
$m_s$ [g]	A	0,1571	0,1471	0,1272	0,0912	0,0650
$m_s$ [g]	B	0,1543	0,1456	0,1324	0,0935	0,0615
$h$ [g]	A	3,0310	3,0115	3,0190	3,0015	2,9963
$h$ [g]	B	3,0157	3,0266	3,0297	2,9770	3,0181
$V_{KOH}$ [ml]	A	2,40	3,30	2,15	0,75	0,24
$V_{KOH}$ [ml]	B	2,38	3,45	1,93	0,57	0,24

**Tab. 8: Časový průběh stupně botnání nosiče 5T v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	5,16	11,83	42,14	30,04	16,15
B	3,63	13,87	40,71	32,62	16,75

**Tab. 9: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 5T v mol/g**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$7,474 \cdot 10^{-4}$	$1,101 \cdot 10^{-3}$	$8,037 \cdot 10^{-4}$	$3,759 \cdot 10^{-4}$	$1,488 \cdot 10^{-4}$
B	$7,411 \cdot 10^{-4}$	$1,151 \cdot 10^{-3}$	$7,195 \cdot 10^{-4}$	$2,793 \cdot 10^{-4}$	$1,488 \cdot 10^{-4}$

**Tab. 10: Časový průběh stupně eroze nosiče 5T v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	100,45	96,78	84,69	60,00	43,02
B	100,39	96,30	84,38	60,36	41,53



**Tab. 11: Naměřené hodnoty nosiče 3T**

Veličina	Vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
$m_0$ [g]	A	0,1488	0,1549	0,1500	0,1526	0,1534
$m_0$ [g]	B	0,1487	0,1581	0,1531	0,1516	0,1573
$m_b$ [g]	A	0,1630	0,1845	0,1788	0,0974	0,0456
$m_b$ [g]	B	0,1646	0,1866	0,1892	0,0860	0,0451
$m_s$ [g]	A	0,1499	0,1533	0,1218	0,0728	0,0361
$m_s$ [g]	B	0,1498	0,1561	0,1249	0,0625	0,0383
$h$ [g]	A	2,9129	2,9988	2,9533	3,0494	2,9940
$h$ [g]	B	2,9796	3,0465	2,9699	2,9761	3,0040
$V_{KOH}$ [ml]	A	2,53	4,40	3,17	0,54	0,16
$V_{KOH}$ [ml]	B	2,33	4,32	3,27	0,53	0,21

**Tab. 12: Časový průběh stupně botnání nosiče 3T v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	8,74	20,35	46,80	33,79	26,32
B	9,88	19,54	51,48	37,60	17,75

**Tab. 13: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T v mol/g**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$8,200 \cdot 10^{-4}$	$1,395 \cdot 10^{-3}$	$1,257 \cdot 10^{-3}$	$3,591 \cdot 10^{-4}$	$1,465 \cdot 10^{-4}$
B	$7,539 \cdot 10^{-4}$	$1,369 \cdot 10^{-3}$	$1,297 \cdot 10^{-3}$	$3,518 \cdot 10^{-4}$	$2,130 \cdot 10^{-4}$

**Tab. 14: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	100,74	98,97	81,20	47,71	23,53
B	100,74	98,73	81,58	41,23	24,35

(Měření nosiče 3T provedl Antonín Faulkner.)

**Tab. 15: Naměřené hodnoty nosiče 1T**

Veličina	Vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
$m_0$ [g]	A	0,1534	0,1549	0,1539	0,1484	0,1505
$m_0$ [g]	B	0,1531	0,1546	0,1531	0,1568	0,1527
$m_b$ [g]	A	0,1644	0,2096	0,2071	0,0608	0,0178
$m_b$ [g]	B	0,1767	0,2025	0,2098	0,0691	0,0161
$m_s$ [g]	A	0,1508	0,1525	0,1369	0,0522	0,0157
$m_s$ [g]	B	0,1499	0,1521	0,1337	0,0574	0,0160
h [g]	A	2,9300	2,8926	2,9415	2,9205	3,0423
h [g]	B	2,9503	2,8816	2,9681	2,9334	3,0422
$V_{KOH}$ [ml]	A	2,90	3,40	5,10	0,94	0,19
$V_{KOH}$ [ml]	B	2,94	3,42	5,40	1,51	0,21

**Tab. 16: Časový průběh stupně botnání nosiče 1T v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	9,02	37,44	51,28	16,48	13,38
B	17,88	33,14	56,92	20,38	0,62

**Tab. 17: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T v mol/g**

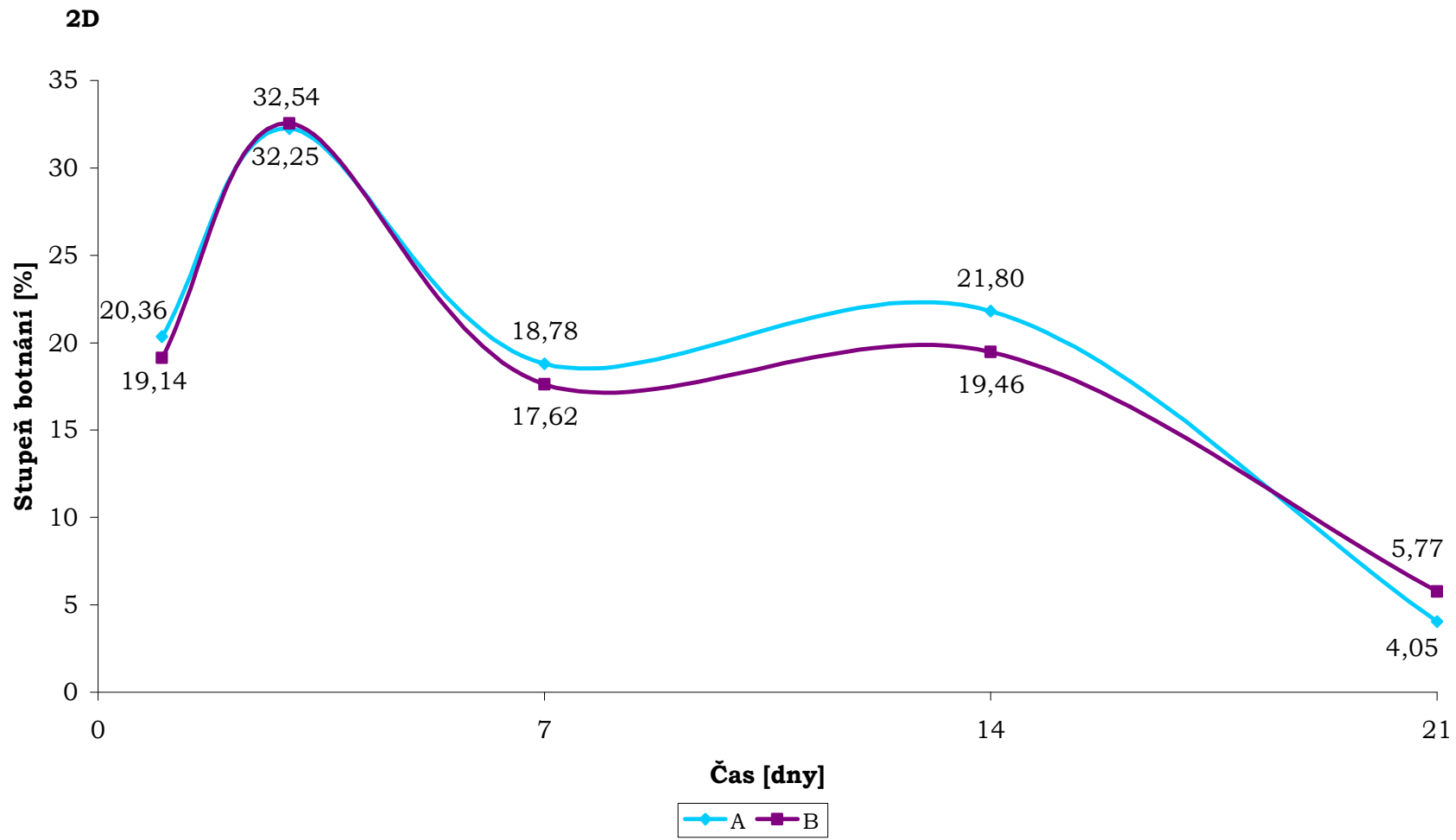
Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$9,396 \cdot 10^{-4}$	$1,093 \cdot 10^{-3}$	$1,857 \cdot 10^{-3}$	$8,045 \cdot 10^{-4}$	$4,373 \cdot 10^{-4}$
B	$9,528 \cdot 10^{-4}$	$1,099 \cdot 10^{-3}$	$1,967 \cdot 10^{-3}$	$1,320 \cdot 10^{-3}$	$4,997 \cdot 10^{-4}$

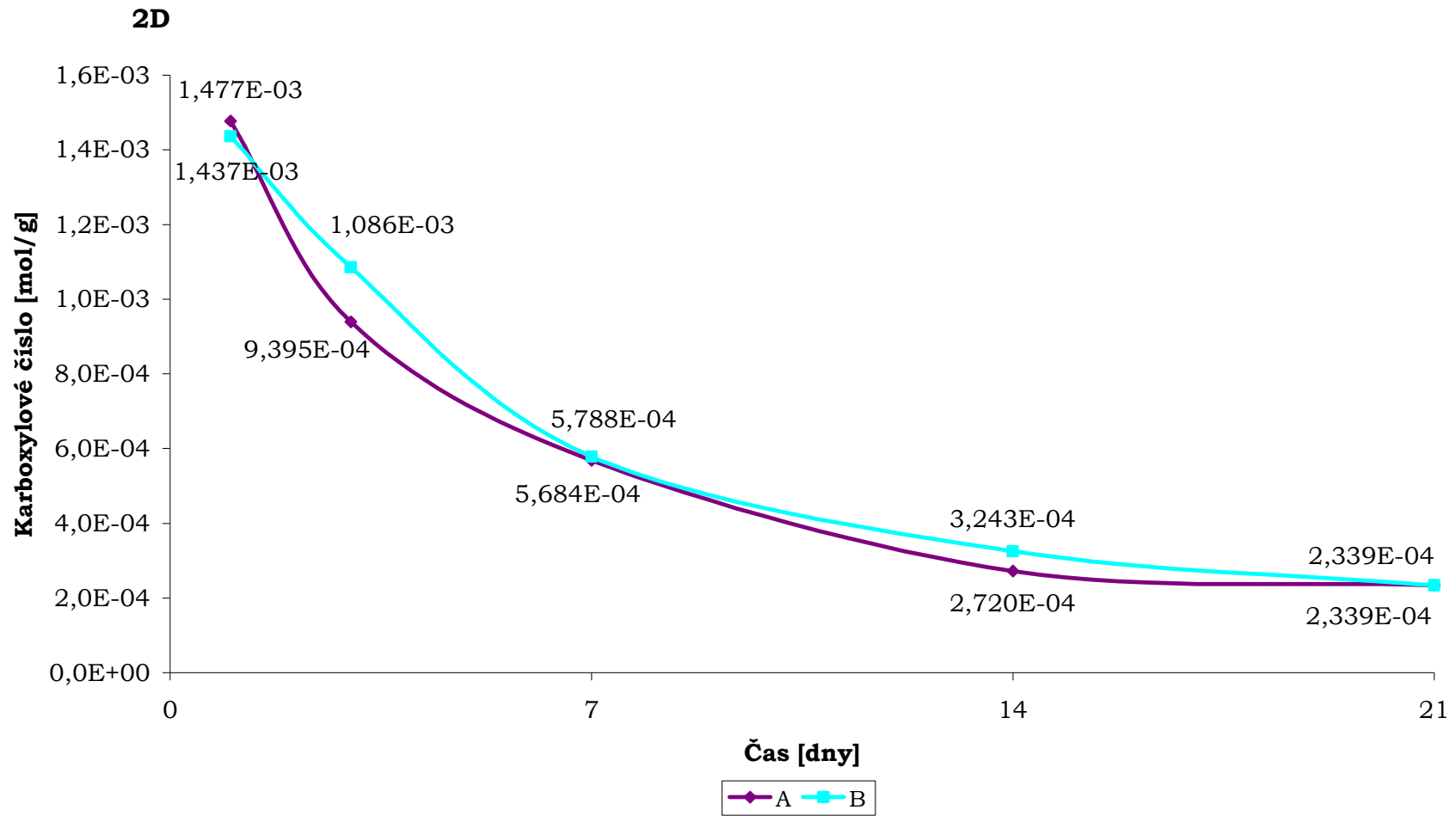
**Tab. 18: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T v %**

Vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	98,31	98,45	88,95	35,18	10,43
B	97,91	98,38	87,33	36,61	10,48

(Měření nosiče 1T provedl Antonín Faulkner.)

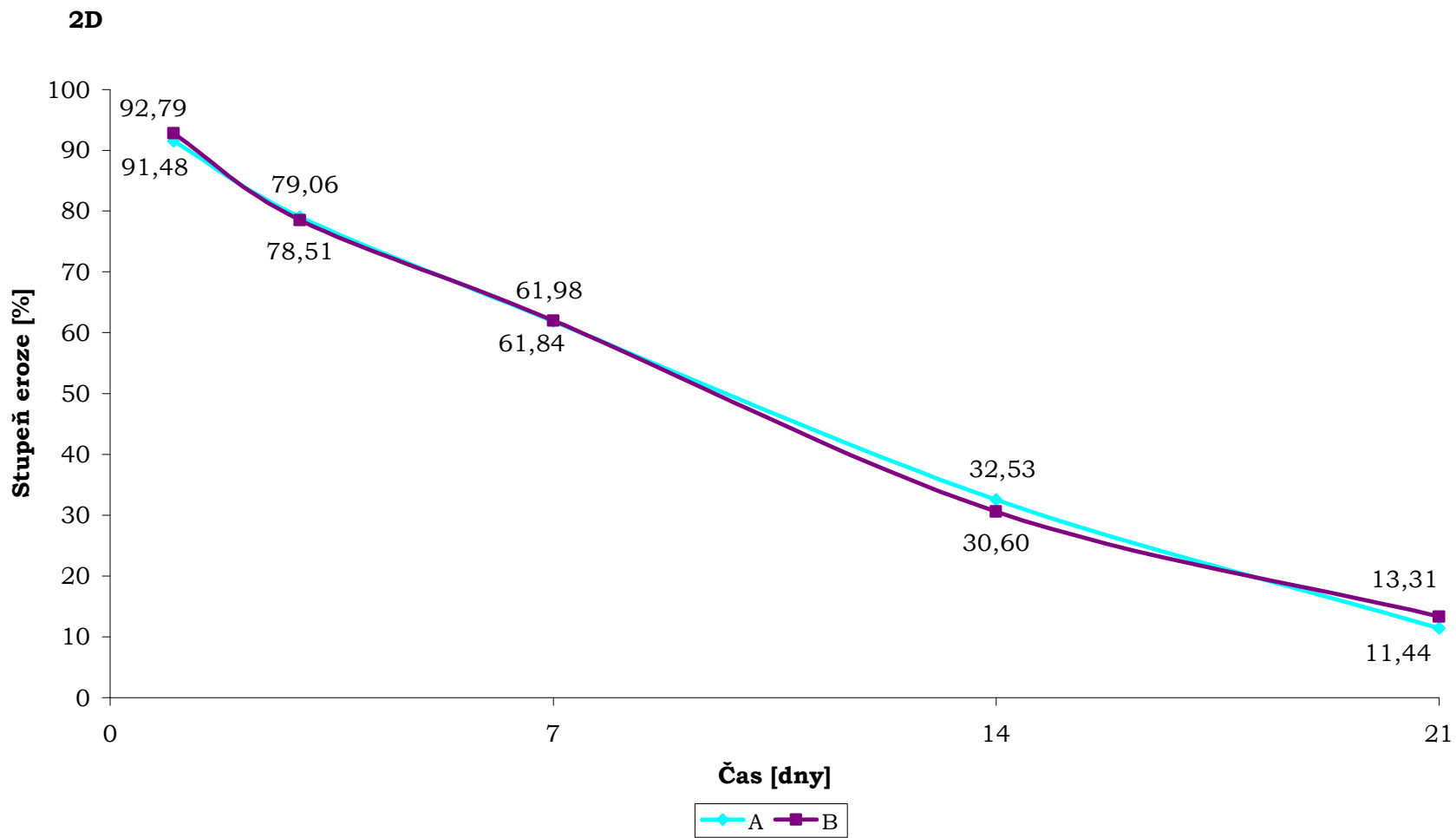
Graf 1: Časový průběh stupně botnění nosiče 2D

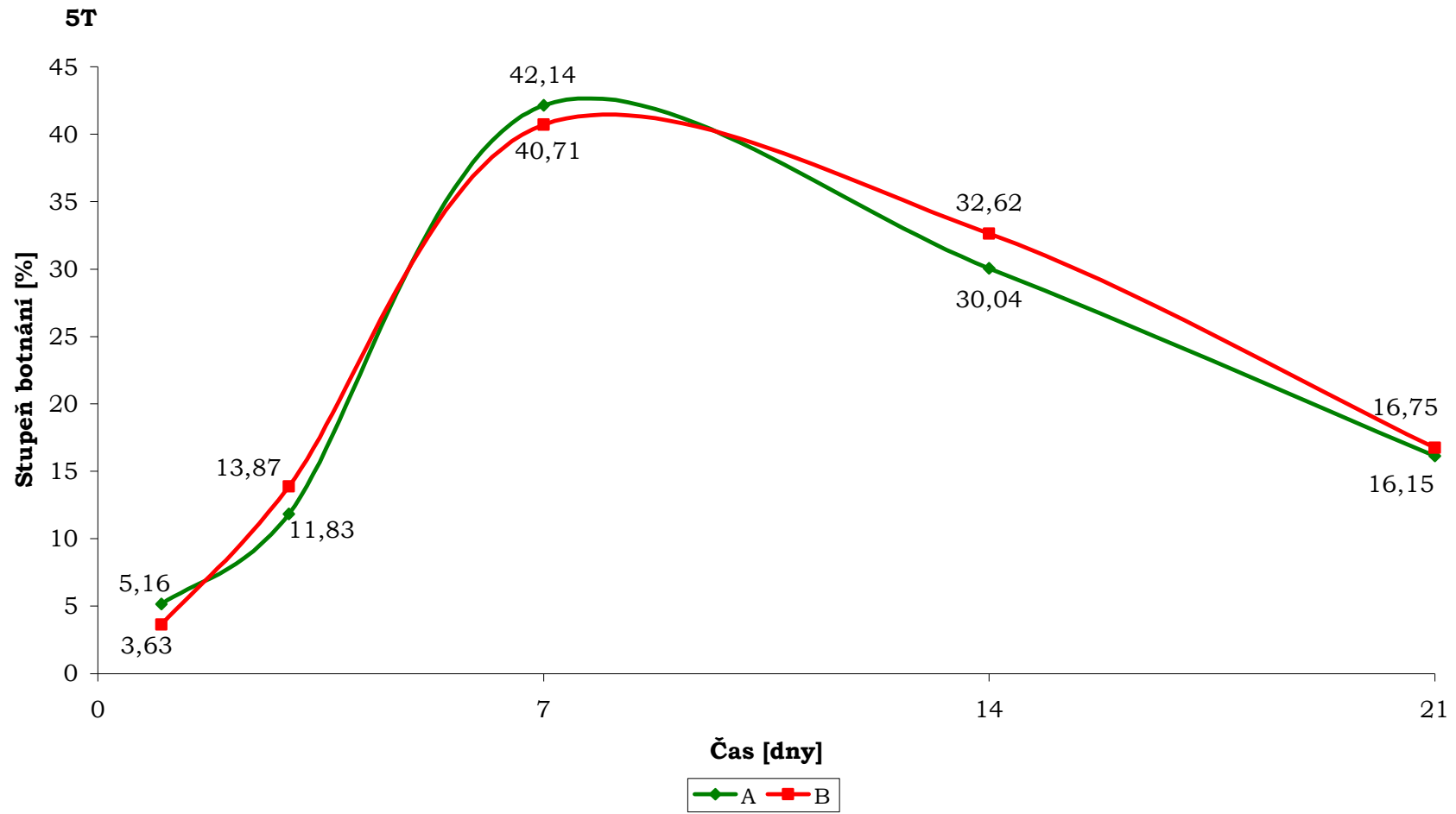




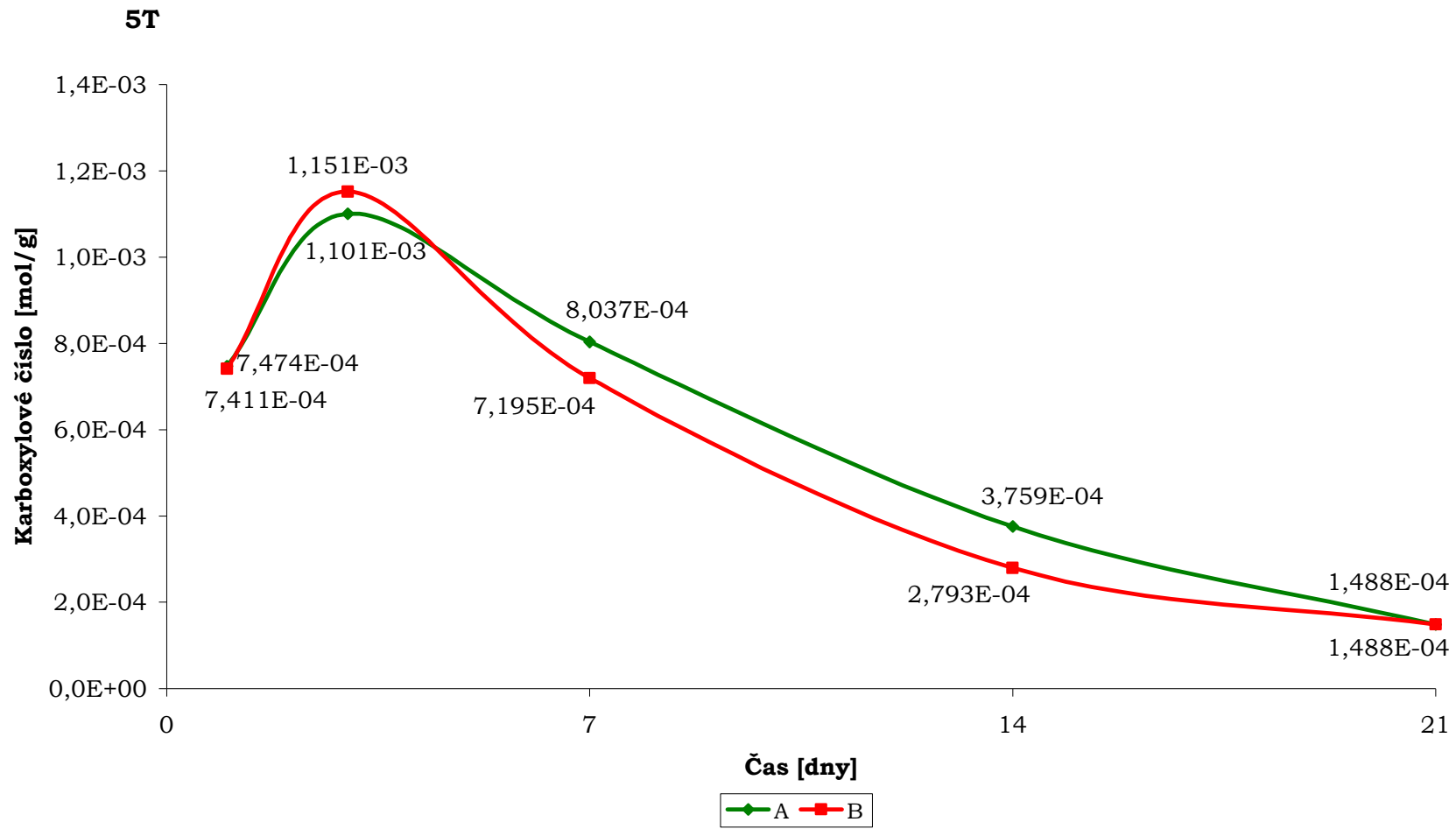
Graf 2: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 2D

Graf 3: Časový průběh stupně eroze nosiče 2D



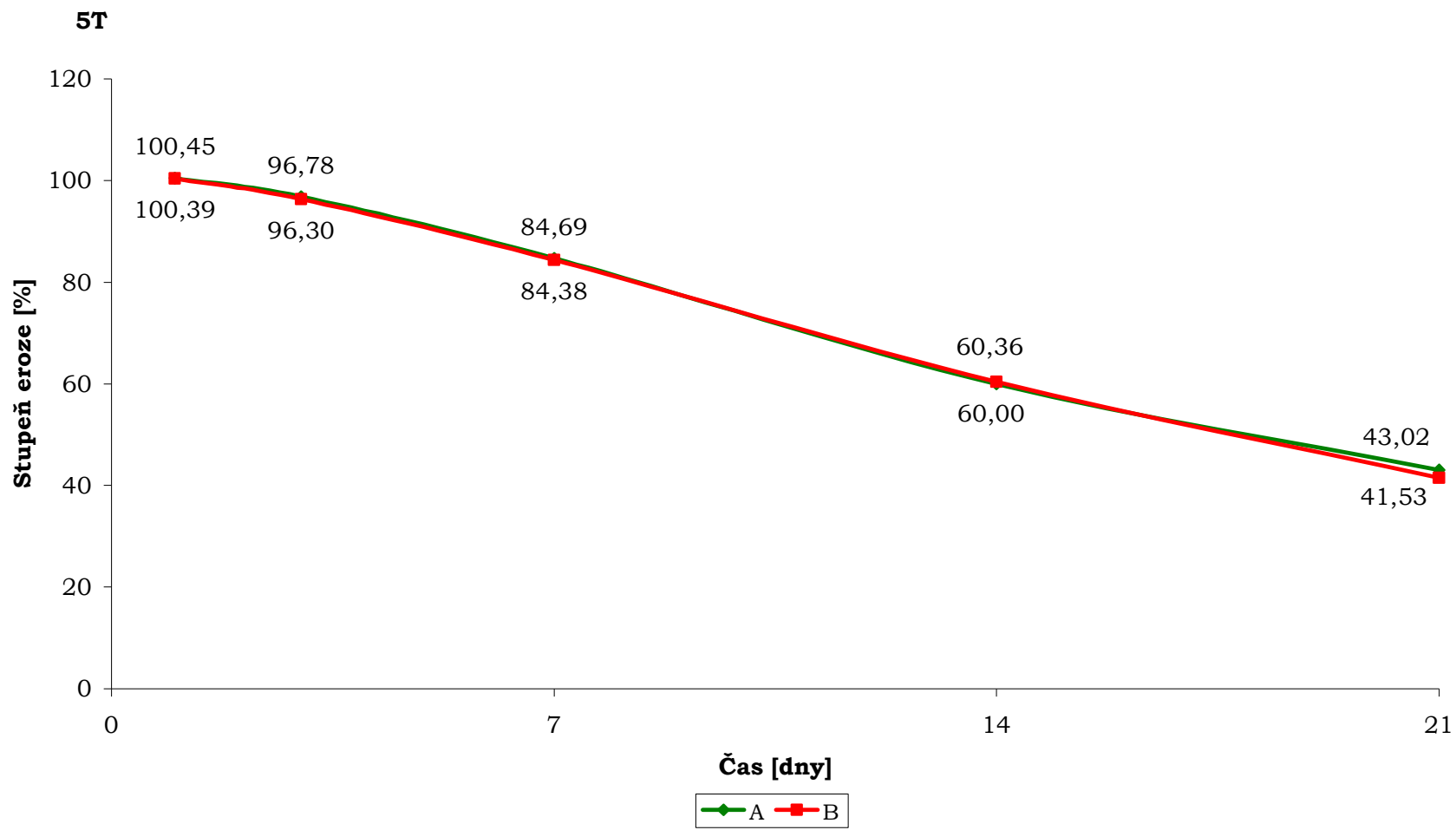


Graf 4: Časový průběh stupně botnání nosiče 5T



Graf 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 5T

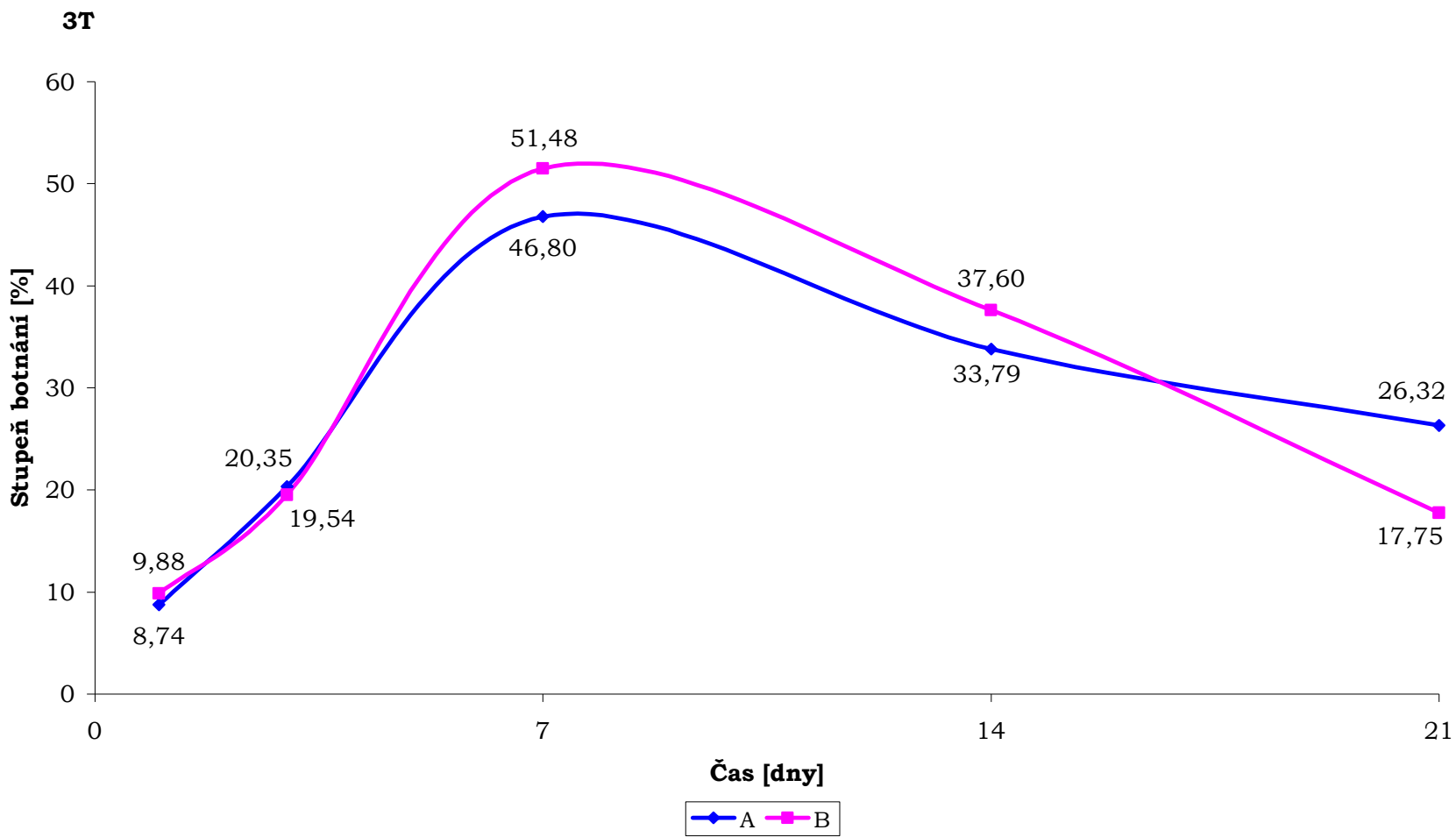
Graf 6: Časový průběh stupně eroze nosiče 5T



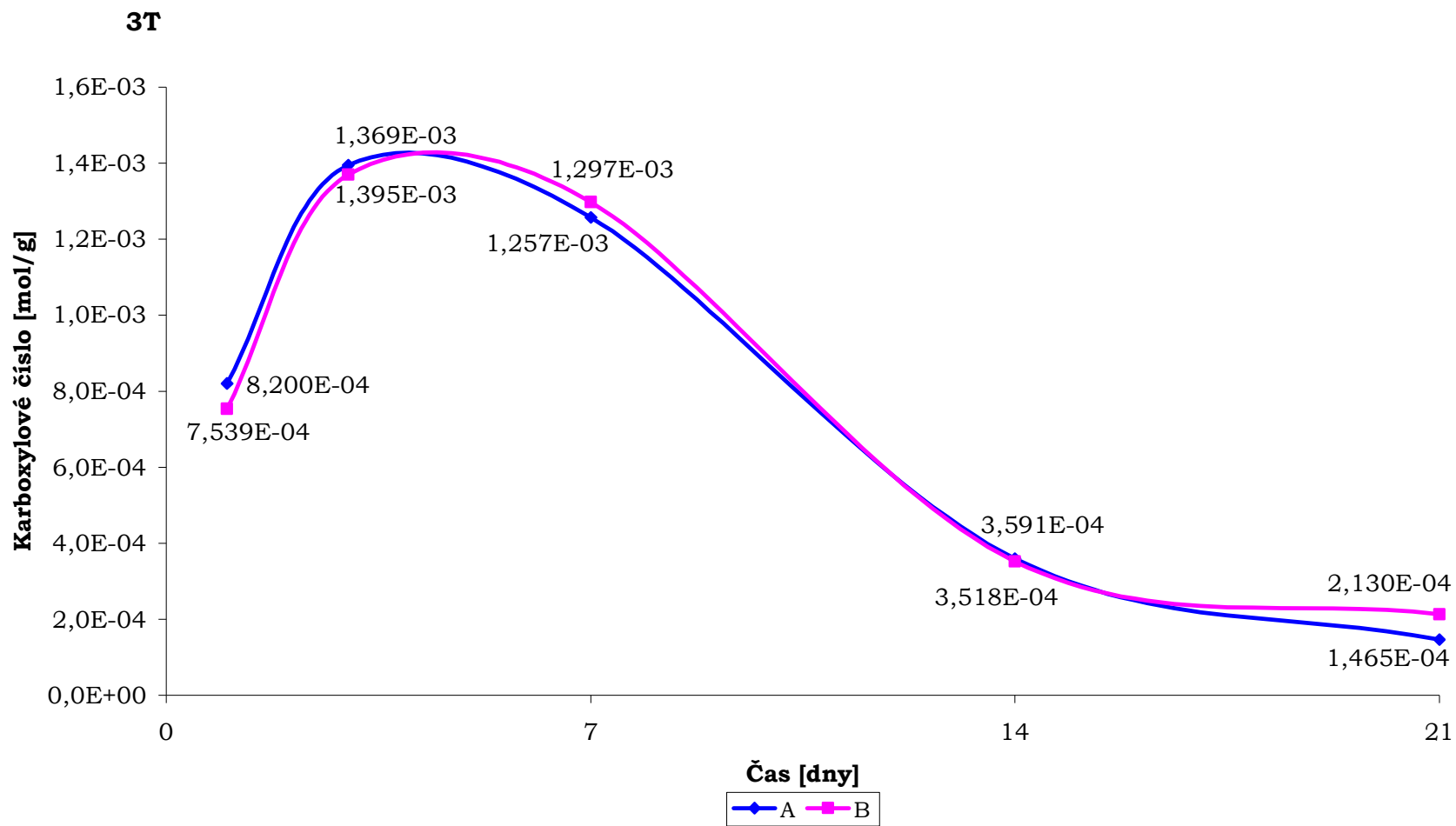
40



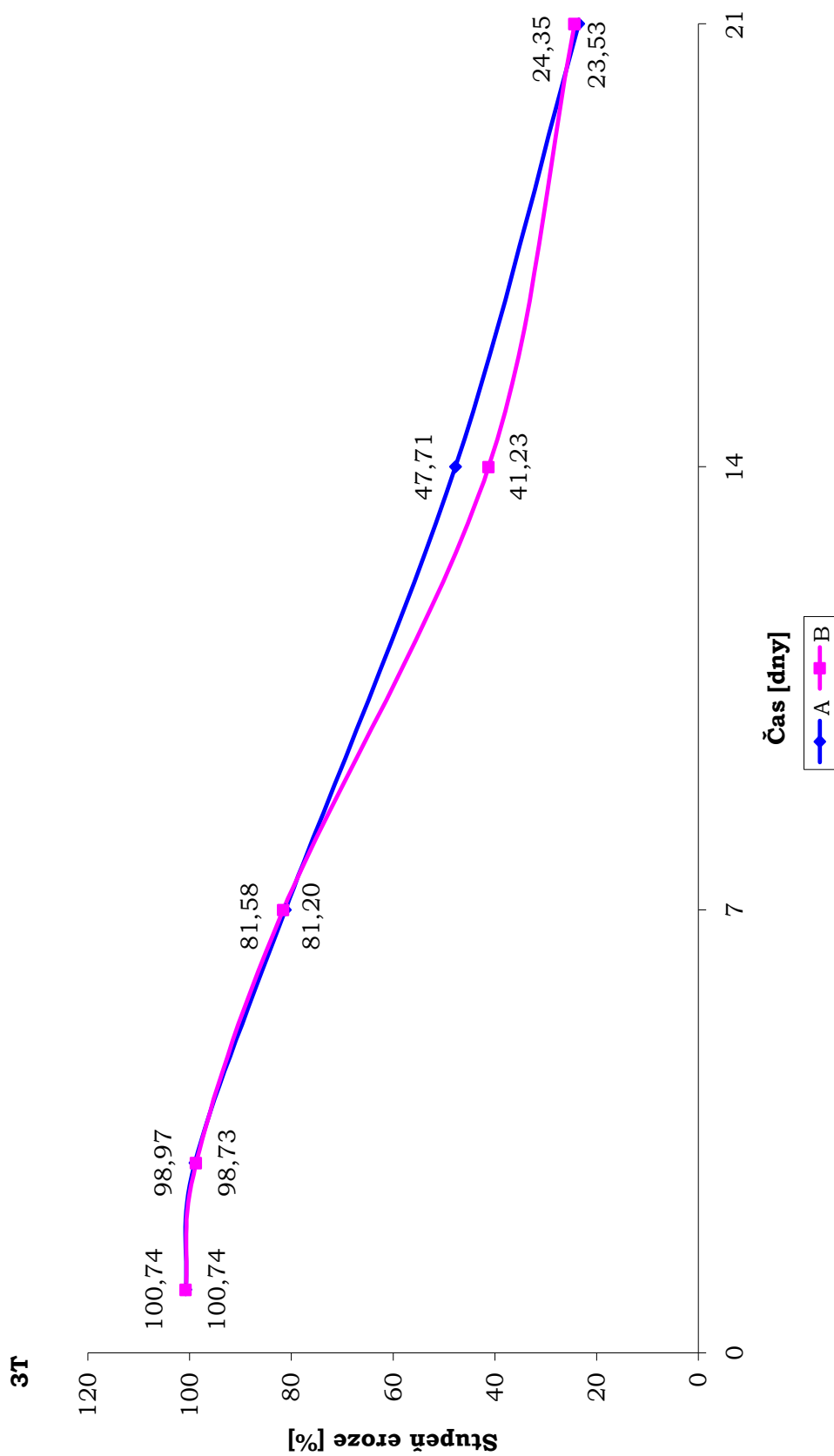
Graf 7: Časový průběh stupně botnění nosiče 3T



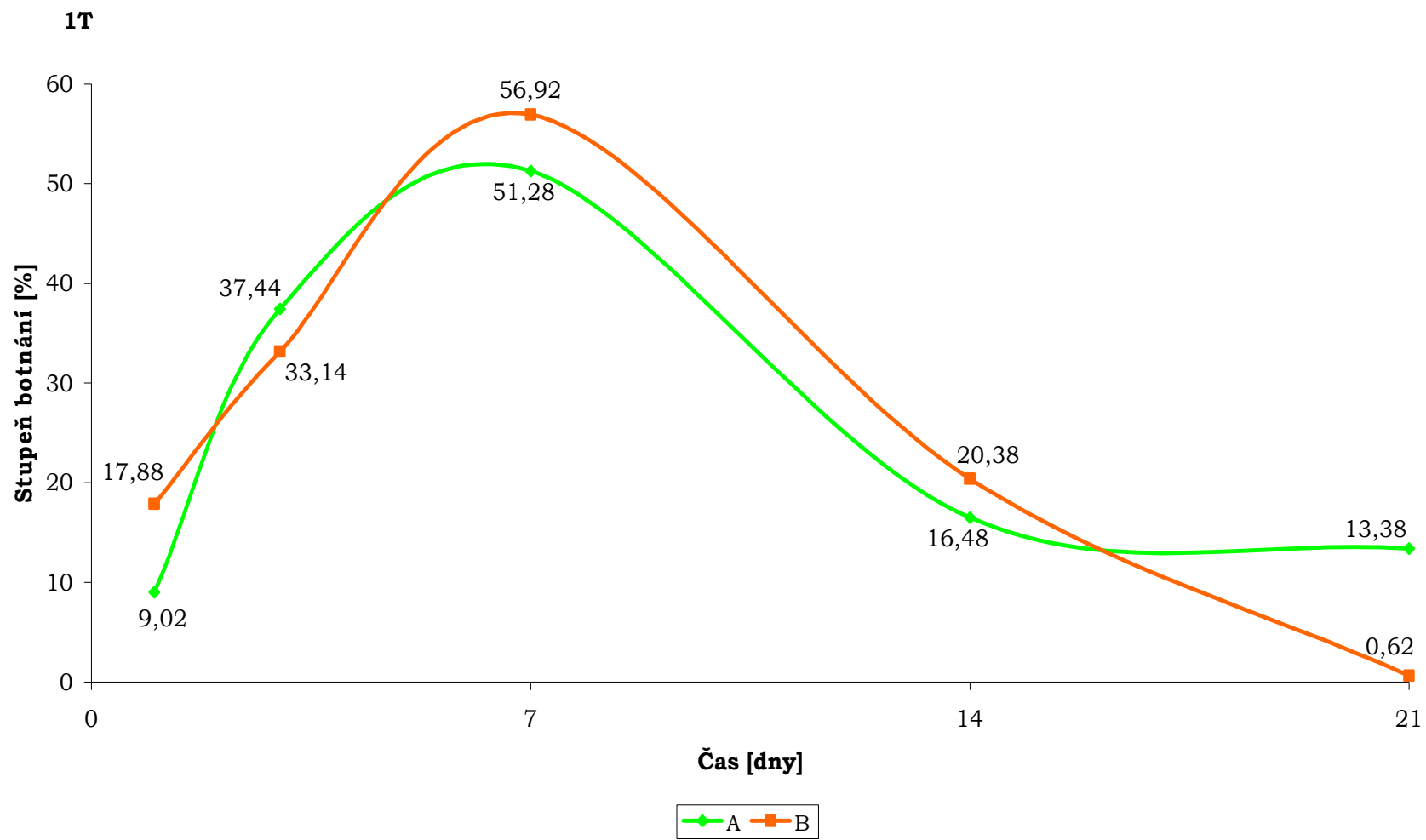
Graf 8: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T



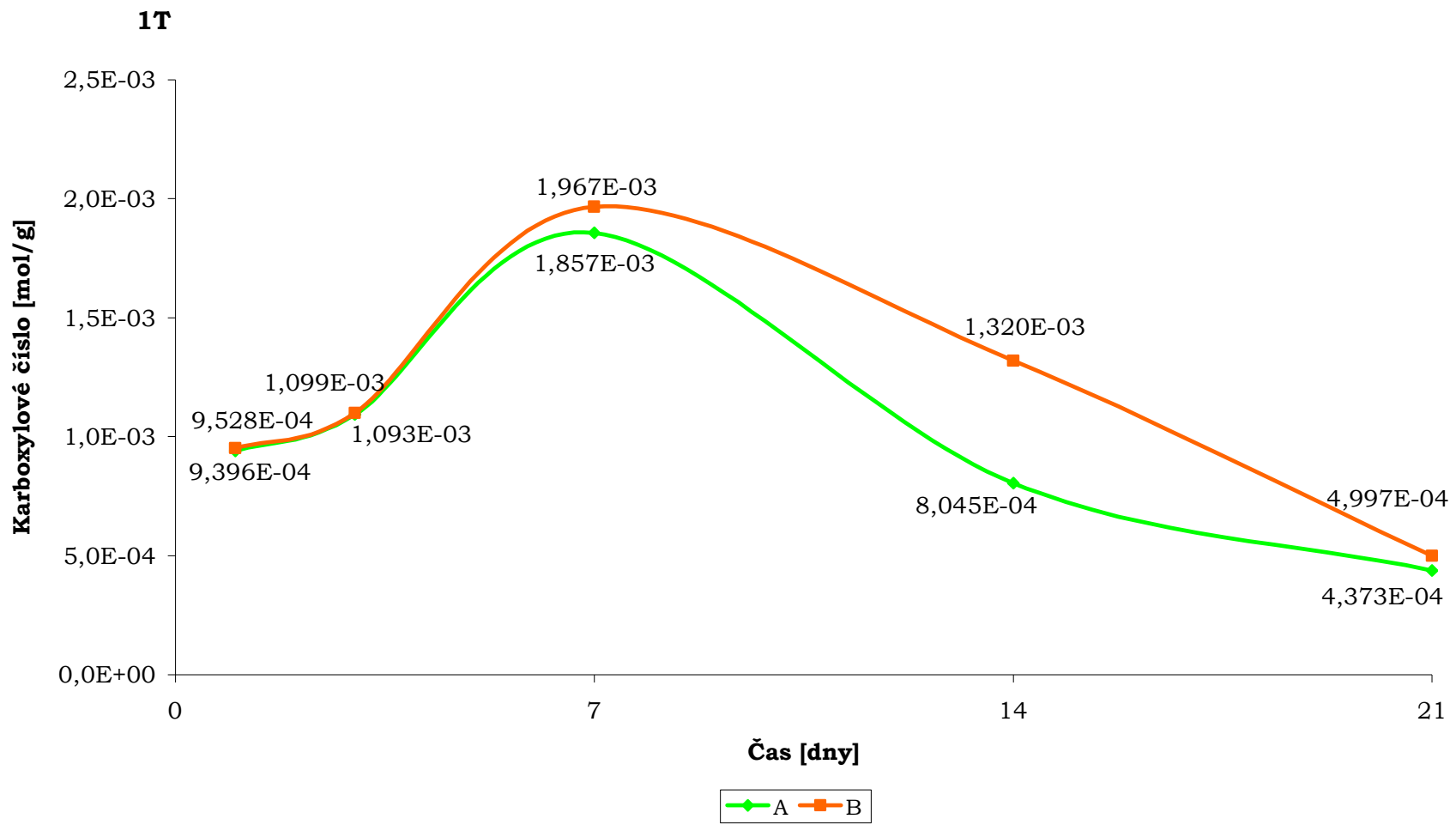
**Graf 9: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T**

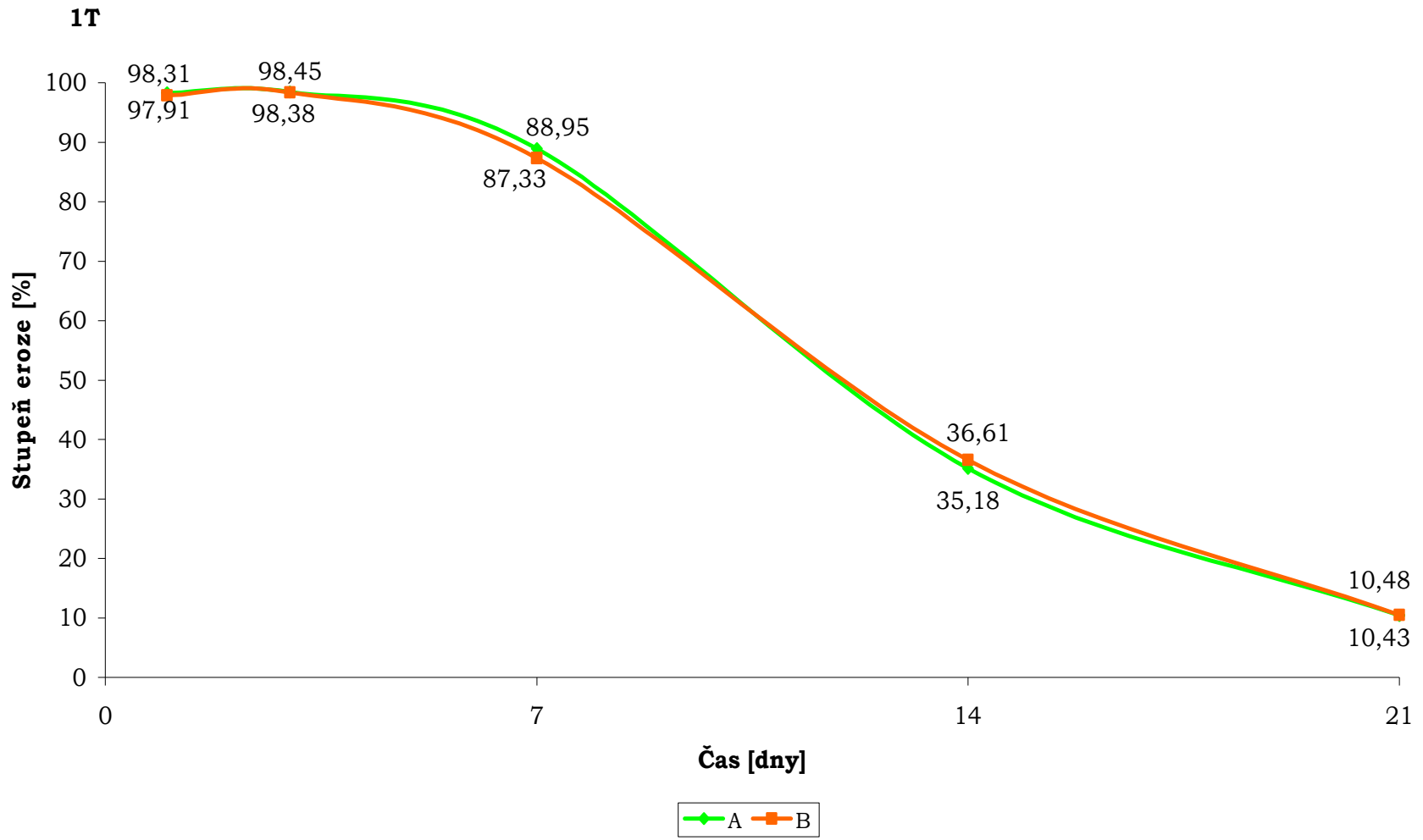


Graf 10: Časový průběh stupně botnění nosiče IT



Graf 11: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T





Graf 12: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T

## 5.2 VYSVĚTLIVKY ZKRATEK

$m_0$  počáteční hmotnost matrice [g]

$m_b$  hmotnost zbotnalé matrice [g]

$m_s$  hmotnost vysušené matrice [g]

$h$  hmotnost odebrané vodné fáze k titrování [g]

$V_{KOH}$  spotřeba odměrného roztoku KOH [ml]

$A, B$  opakování vzorku

## 6. DISKUSE

### 6.1 SOUVISLOSTI A METODIKA PRÁCE

Biodegradabilní nosiče byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie v roce 2006 polykondenzační reakcí z ekvimolární směsi kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a větvící složky, kterou byl v případě studovaného souboru dipentaerythritol nebo tripentaerythritol použitý v různé koncentraci. Byly takto získány produkty, které by v optimálním případě měly šest nebo osm řetězců vycházejících z větvící složky. Všechny koncové skupiny by v tomto případě byly karboxylové. Podíl hydroxylových skupin je tedy indikací nedokonalosti větvení produktů. Limitní hodnotou je maximálně 50% podíl vyjadřující opačný konstituční stav dokonalému větvení, tj. čistě lineární řetězce. Nosiče tohoto typu jsou produktem reakce hydroxykyselin bez přítomnosti větvící polyhydričké látky.

Polykondenzační reakce probíhala záměrně bez katalyzátoru a dlouhodobě. Je známo, že v pokročilém stádiu reakce se více uplatňují procesy štěpení vazeb. Proto je možno očekávat, že v produktech budou kromě vysoce větvených struktur struktury s nižším stupněm větvení a také molekuly s lineárními řetězci vzniklé termickou degradací probíhající současně s růstem řetězců. Stupeň větvení molekul a také maximální dosažitelná molekulová hmotnost produktů reakce byly regulovány změnami koncentrace větvící složky.

Bylo prokázáno, že sloučeniny typu větvených oligoesterů alifatických hydroxykyselin v prostředí pufrů botnají. Stupeň botnání je velmi důležitým parametrem, který velmi významně ovlivňuje kinetiku liberace léčiv inkorporovaných do matric. Je ovlivněn jednak stupněm větvení molekul, jednak koncentrací koncových karboxylů. Tyto dva parametry mají opačný vliv na stupeň botnání. Vyšší větvení vede ke snížení schopnosti botnat, zatímco vyšší koncentrace hydrofilních koncových skupin botnání zvyšuje. Další veličinou, která velmi výrazně ovlivňuje stupeň botnání, je ionizace koncových karboxylů, která se zvyšuje s hodnotami pH.



Bylo prokázáno, že stupeň botnání jednotlivých produktů se značně lišil. Dalšími faktory, které se podílely na změnách hodnot stupně botnání byly změny parametrů nosičů, ke kterým docházelo během působení vodných médií. Matrice se zmenšovaly erozí, docházelo ke změnám parametrů molekulové hmotnosti, měnila se hodnota pH a iontová síla v matricích. Vlivem změn parametrů matric z nosičů a jejich kapalného okolí byly dosahovány hodnoty stupně botnání od několika procent až po několik set procent.

Zajímavým jevem bylo dosažení oscilačního průběhu botnání matric z nosičů s jedním nebo s dvěma maximy hodnot. Byla zkoumána příčina tohoto jevu. Změna iontové síly se projevila změnami celkového rozsahu botnání, extréma charakteristiky však nebyla ovlivněna. Změny polarity média a vodíkových vazeb také nevedly ke konkrétnímu poznání. Byly provedeny analýzy stupně větvení metodou SEC-MALLS. Bylo zjištěno, že během degradace nosiče nedochází k významným změnám stupně větvení nosičů.

Proto byla navržena alkalimetrická metoda analýzy koncových karboxylů. Analyzována byla frakce matric rozpustná ve vodě. Vycházelo se z předpokladu, že právě tato frakce nízkomolekulárních degradačních produktů bude rozhodující proměnnou veličinou rozhodující o oscilačním chování matric.

Metoda separace vodorozpustné frakce vytřepáváním do vodné fáze z chloroformového roztoku je proveditelná pouze v případě použití vody jako média. Ve vodě byl jev oscilačního botnání prokázán, byl však podstatně méně výrazný než v prostředí pufrů. Proto byly vybrány pro danou studii pouze takové nosiče, které měly dostatečně výrazné maximum hodnot stupně botnání v prostředí čištěné vody.

## **6.2 INTERAKCE NOSIČE 2D S VODNÝM MÉDIEM**

Nosič označený symbolem 2D byl syntetizován z reakční směsi stejných molárních dílů kyselin DL-mléčné, glykolové doplněné dipentaerythritolem v hmotnostní koncentraci 2%. Dipentaerythritol je polyhydrická větvená sloučenina, která má šest hydroxylových skupin, které se významně neliší v reaktivitě s karboxyly hydroxykyselin. V ideálním případě by při syntéze vznikly struktury s šesti

polyesterovými řetězci. V tabulce 2 jsou základní parametry nosiče. Je z nich patrné, že se jedná o oligomer s relativně nízkou polydisperzitou molekulových hmotností. Vysoký stupeň větvení je možno předpokládat podle nízké hodnoty teploty skelného přechodu.

Na grafu 2 je znázorněn průběh hodnot získaných alkalimetrickou titrací vodných výřepků. Hodnoty koncentrace karboxylů postupně klesají. Rychlost poklesu hodnot koncentrace exponenciálně klesá. Na konci pokusu, za 21 dní působení vodného prostředí, se snížila koncentrace karboxylů oproti koncentraci v jednodenním intervalu 6,3krát. Je možno hledat souvislost se zmenšováním tělísek a se zkracováním difuzní dráhy při eluci nízkomolekulárních oligoesterových degradačních produktů. Není vyloučeno, že v matricích byly nízkomolekulární ve vodě rozpustné oligoestery obsaženy ještě před působením vody. Existenci píku by bylo nutno hledat v době kratší než jeden den zmenšením intervalů odběrů a zpracování vzorků během prvního dne interakce s médiem.

V grafu 1 je zachycen časový průběh hodnot stupně botnání matric z nosiče 2D. Stupeň botnání v prvním dnu je relativně vysoký, hodnoty jsou kolem 20%, a zvyšuje se do 3. dne experimentu. V tomto intervalu bylo prokázáno maximum následované prudkým poklesem na poloviční hodnoty charakteristiky v sedmidenním intervalu. V intervalu do 14 dní hodnoty botnání slabě stouply, aby v dalším týdnu významně poklesly. Porovnáním grafu 1 s grafem 2 je možno vyslovit závěr o vyšší citlivosti botnání ke změnám prostředí v matricích než odhalí alkalimetrická metoda. Druhou možností rozdílů v průběhu změn hodnot v čase je vliv koncových skupin ve vysoce větvených osmoticky aktivních ve vodě nerozpustných molekulách nosiče na průběh botnání. Tyto molekuly nebyly pro svoji nerozpustnost ve vodě alkalimetricky prokázány. Mezi mimořádně nízkým stupněm botnání nosiče a nízkou koncentrací ve vodě rozpustných molekul na konci pokusu v 21 denním intervalu je jistě příčinný vztah. Na nízkém stupni botnání se podílejí především vysoce větvené molekuly, které jsou odolnější k hydrolýze.

Matrice, které měly tvar válečku a hmotnost 150 mg, erodovaly kontinuálně již od začátku působení vody, jak je možno vidět z grafu 3. Rychlost eroze se pomalu snižovala se zmenšováním tělísek, což je v souladu s dříve publikovanými poznatky o rychlejší difuzi a snížení koncentrace vodorozpustných kyselých degradačních

produktů se zmenšením maticových systémů. Za tři týdny zbylo asi 12% neerodovaného nosiče. V obou paralelně sledovaných řadách matic byly zjištěny prakticky stejné výsledky.

### **6.3 INTERAKCE NOSIČE 5T S VODNÝM MÉDIEM**

Nosič 5T byl větvený tripentaerythritolem, měl tedy až osm větví. Podle molekulové hmotnosti  $M_w$  8 500 (tab. 2) je možno jej pokládat za oligomer s relativně vysokou polydisperzitou (2,8). O vysokém stupni větvení svědčí nízká hodnota teploty skelného přechodu (17,2 °C).

Na grafu 4 je vidět časový průběh hodnot stupně botnání matic z nosiče 5T. Z počátečních necelých 5% hodnot botnání roste. Maximální hodnota 42% byla naměřena v sedmidenním intervalu. Podle průběhu křivky je možno předpokládat, že maximální hodnota charakteristiky botnání bude kolem 8. dne experimentu. Potom následuje druhá fáze odbotnání matic, která je pomalejší než proces botnání. Na konci pokusu byla prokázána hodnota stupně botnání přes 16% s předpokladem jejího dalšího poklesu. Matrice se tedy zmenšují na základě dvou paralelně a kontinuálně probíhajících dějů, kterými jsou eroze a odbotnání.

Koncentrace extrahovatelných nízkomolekulárních fragmentů po degradaci molekul stoupala mezi 1. a 3. dnem, potom následoval postupný pokles hodnot (graf 5). Od 3. dne do 21. dne poklesla koncentrace nízkomolekulárních oligomerů v maticích 7,6krát, tedy velmi výrazně. Na rozdíl od nosiče 2D bylo prokázáno maximum v koncentraci karboxylových skupin.

Srovnáním průběhu změn koncentrace vodorozpustných molekul v maticích s průběhem změn stupně botnání je patrná shoda v dosažení maximální hodnoty. Rozdíl je v časovém intervalu píku. V případě koncentrace nízkomolekulárních fragmentů degradace bylo maximum dosaženo podstatně dříve než tomu bylo u botnání. Relace je vysvětlitelná na základě hystereze botnání jako jevu. V maticích dojde nejdříve ke zvýšení koncentrace osmoticky aktivních látek. Následuje pomalá relaxace struktury matrice. Při dostatečném botnání se otevřou difúzní cesty pro osmoticky aktivní

nízkomolekulární fragmenty. Dojde k eluci těchto složek. Osmotická aktivita matrice se sníží s důsledkem ve snížení stupně botnání.

Průběh eroze matric je zobrazen na grafu 6. Ve srovnání s matricemi z nosiče 2D jsou zřetelné dvě změny v průběhu děje. Jednou z nich je více než jednodenní prodlevy v začátku erozního procesu, druhou je pomalý průběh eroze. Za 21 dní se ještě nerozpadlo a nerozpustilo přes 40% z původní hmotnosti matric. Erozní proces je kontinuální, je možno předpovídat celkovou dobu eroze mezi 45 a 60 dny.

#### **6.4 INTERAKCE NOSIČE 3T S VODNÝM MÉDIEM**

Hlavní podíl na experimentálních pracích s tímto nosičem měl Antonín Faulner, posluchač 5. ročníku FaF.

Nosič označený 3T měl vysoký stupeň polydisperzity molekulových hmotností (4,0), hodnotou  $M_w$  13 300 je jej možno pokládat za polyester. O podílu vysoce větvených vysokomolekulárních produktů syntézy svědčí vysoké hodnoty  $M_z$  27 200 a  $M_{z+1}$ , která byla 43 200. Při hodnotě teploty skelného přechodu 21,7 °C a při vysoké polydisperzitě a vysoké hodnotě  $M_w$  je možno předpokládat vysoký stupeň větvení.

Průběh botnání uvádí graf 7. Probíhá obdobně jako změny koncentrace hydrofilních molekul. Pík je však posunut do 8denního intervalu. Na rozdíl od matrice 5T, která byla pravděpodobně více větvená, měla matrice z 3T méně výraznou hysterezi v rozsahu botnání vzhledem ke koncentraci hydrofilních fragmentů. Rozdíl je přibližně 3 dny u nosiče 3T oproti 5 dnům u nosiče 5T, což je možno přičítat vyššímu stupni větvení nosiče 5T. Z toho je možno vyslovit hypotézu, že více větvené struktury patrně reagují na změny osmotických poměrů v matricích pomaleji než lineární nebo méně větvené.

V grafu 8 jsou zobrazeny koncentrace hydrofilních oligoesterových molekul v matricích. Maximum hodnot se nachází kolem 5. dne působení vody jako degradačního média. Po dosažení píku hodnoty velmi prudce klesají do 14. dne, potom se jejich pokles výrazně zpomalí na hodnotu 7,7krát menší než je maximální prokázaná.

Na grafu 9 je vidět průběh eroze vyjádřený řadou dvou náhodně přiřazených matric. Eroze začíná až za tři dny po ponoření matric do vody. Další průběh je poměrně rychlý,

za 21 dní byl prokázán asi čtvrtinový zbytek. Je možno předpokládat, že k úplné erozi dojde do 45. dne.

## 6.5 INTERAKCE NOSIČE 1T S VODNÝM MÉDIEM

Hlavní podíl na experimentálních pracích s tímto nosičem měl Antonín Faulkner, posluchač 5. ročníku FaF.

Jako zajímavý je možno hodnotit průběh hodnot vyjadřujících koncentraci karboxylů a jejich srovnání s průběhem hodnot stupně botnání. Hodnoty maximálních hodnot byly dosaženy kolem sedmidenního odběrového intervalu, tedy v prakticky ve stejné době po začátku působení vody jako degradačního média. To tedy znamená, že na rozdíl od chování dříve popsaných matric nebyla zaznamenána hystereze v botnání jako důsledku zvýšené koncentrace osmoticky aktivních molekul v matricích. Z této relace je možno potvrdit předpoklad o rychlejší reakci lineárních nebo méně větvených struktur na změny v osmotických poměrech v matrici.

Jednou z přímých příčin rychlejší reakce na změnu v koncentraci nízkomolekulární hydrofilní frakce nosiče je vyšší stupeň botnání matric (graf 10). U nosiče 5T bylo maximum stupně botnání 42%, u nosiče 3T bylo maximum 49% a u nosiče 1T bylo maximum 54%.

Na grafu 12 je zachycen průběh eroze nosiče 1T. Od jiných nosičů testovaných v této práci se liší třemi fázemi. V první fázi nejméně do 3. dne eroze prakticky neprobíhá. Potom se její rychlost výrazně zvyšuje a od 14. dne dochází ke snižování. Za 21 dní se eroduje přibližně 90% nosiče. S ubývajícím podílem větvící složky se stupeň větvení snižuje a oddaluje se tak začátek ubývání materiálu matrice. Snižování stupně větvení dokládají zvyšující se hodnoty teploty skelného přechodu uvedené v tabulce 2. Nosič 5T měl hodnotu  $T_g$  17,2 °C, 3T měl  $T_g$  21,7 °C a nosič 1T měl  $T_g$  25,3 °C. Také hodnoty tepelné kapacity  $\Delta C_p$  v uvedené řadě stoupaly. Nosič měl také značnou polydisperzitu molekulových hmotností (4,2). Hodnota  $M_n$  byla 2 900, hodnota  $M_{z+1}$  byla 41 100. Je možno předpokládat, že nosič je pestrou směsicí molekul s různým stupněm větvení, včetně molekul s lineárními řetězci.

## 7. ZÁVĚR

- 1) Eroze oligoesterů a polyesterů alifatických  $\alpha$ -hydroxykyselin ve vodě při teplotě 37 °C je ovlivněna stupněm jejich větvení. Se zvyšováním stupně větvení se zkracuje doba začátku děje a zpomaluje rychlost děje. Matrice tvořené molekulami s vysoce větvenou konstitucí erodují již od začátku působení vody podle kinetiky nultého řádu.
- 2) Koncentraci malých fragmentů vzniklých degradací molekul nosičů je možno stanovit metodou jejich vytřepávání do vodné fáze z chloroformových roztoků. Hodnoty koncentrace těchto nízkomolekulárních ve vodě rozpustných oligoesterů mají maxima, jejichž časový interval souvisí se stupněm větvení. Se zvyšováním stupně větvení se doba dosažení maxima zkracuje.
- 3) Botnání matric z větvených oligoesterů a polyesterů probíhá nerovnovážně za současné degradace sloučenin. V několikadenních intervalech dosahují hodnoty stupně botnání maxima. Doba dosažení maxima ve stupni botnání je kratší u matric z více větvených molekul.
- 4) Mezi koncentrací osmoticky aktivních nízkomolekulárních degradačních produktů v matricích a hodnotami stupně botnání je přímá souvislost. Se zvyšujícím se větvením molekul nosičů se více projevuje hystereze mezi osmotickou aktivitou nízkomolekulární frakce a stupněm botnání. Podstatou hystereze je stupeň botnání souvisící s obstrukčními efekty při difúzi degradačních produktů z matric.
- 5) Obstrukční efekty jsou příčinou smíšeného typu degradace, která je v podstatě homogenní (objemová) projevující se částečně jako heterogenní (povrchová) s vyšší rychlostí eroze tělesa difúzí hydrofilních nízkomolekulárních degradačních produktů ze struktur, které jsou bližší jeho povrchu. Těleso si podržuje svoji integritu v celém procesu degradace.

## 8. LITERATURA

- [1] Rathbone, M.J., Witchey-Lakshmanan, L., Ciftci, K.: Veterinary Application. In: Mathiowitz, E., eds. Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. Wiley, New York, 1999, s. 1007-1037
- [2] Rathbone, M.J., Gurny, R.: Controlled Release Veterinary Drug Delivery. Elsevier Science, Amsterdam, 2000
- [3] Matschke, C., Isele, U., van Hoogevest, P., Fahr, A.: Sustained-release injectables formed in situ and their use for veterinary products. J. Control. Release 85, 2002, s.1-15
- [4] Miller, J.: Controlled release products for control of ectoparasites of livestock. In: Rathbone, M., Gurny, R., eds. Controlled Release Veterinary Drug Delivery. Elsevier Science, Amsterdam, 2000, s. 229-248
- [5] Rothen-Weinhold, A., Gurny, R., Dahn, M.: Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. Pharm. Sci. Technol. Today 3, 2000, s. 222-231
- [6] Walduck, A.K., Opdebeeck, J.P., Benson, H.E., Pranker, R.: Biodegradable implants for the delivery of veterinary vaccines: design, manufacture and antibody responses in sheep. J. Control. Release 51, 1998, s. 269-280
- [7] Witchey-Lakshmanan, L., Li, Y.: Controlled drug delivery in the companion animal. In: Rathbone, M., Gurny, R., eds. Controlled Release Veterinary Drug Delivery. Elsevier Science, Amsterdam, 2000, s. 249-267
- [8] Vert, M., Feijen, J., Albertsson, A., Scott, G., Chiellini, E.: Biodegradable polymers and plastics. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992
- [9] Li, S., Vert, M.: Biodegradable Polymers: Polyesters. In: Mathiowitz, E., eds. Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. Wiley John, New York, 1999, s. 71-93
- [10] Li, S., Vert, M., Scott, G., Gilead, D., eds. Degradable Polymers-Principles and Applications. Chapman and Hall, London, 1995, s. 43-87
- [11] Lewis, D. H.: Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin, M., Langer, R., eds. Biodegradable polymers as drug delivery systems. Marcel Dekker, New York, 1995, s.1-41

- [12] Pitt, C.G.: Non-microbial degradation of polyesters: mechanism and modifications. In: Vert, M., Feijen, J., Albertsson, A., Scott, G., Chiellini, E., eds. *Biodegradable polymers and plastics*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992, s. 7-19
- [13] Heller, J.: Fundamentals of Polymer Science. In: Robinson, J.R., Lee, V.H.L., eds. *Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications*. Marcel Dekker, New York 1987, s. 139-212
- [14] Bengs, H., Bayer, U., Krone, V., Lill, N., Sandow, J., Walch, A.: Polytartrate-a new biodegradable polymer. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 23, 1996, s. 114-115
- [15] Dahlmann, J., Rafler, G., Fechner, K., Melis, B.: Synthesis and properties of biodegradable aliphatic polyesters. *Br. Polymer J.* 23, Compendex, 1990, s. 235-240
- [16] Ahlers, M., Krone, V., Walch, A.: Microparticles from biodegradable polymers. *Adv. Mater.* 4, 1992, s. 230-234
- [17] Heller, J., Barr, J., Ng, S.Y., Shen, H-R., Schwach-Abdellaoui, K., Emmahl, S., Rothen-Weinhold, A., Gurny, R.: Poly(ortho esters)- their development and some recent applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 50, 2000, s. 121-128
- [18] Mao, H-Q., Kadiyala, I., Jeong, K.W., Ihao, Z., Dang, W.: Biodegradable polymers: Poly(phosphoester). In: Mathiowitz, E., eds. *Encyclopedia of controlled release delivery*, 1999, s. 45-61
- [19] Einmahl, S., Capancioni, S., Schwach-Abdellaoui, K., Moeller, M., Behar-Cohen, F., Gurny, R.: Therapeutic applications of viscous and injectable poly(ortho esters). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 2001, s. 45-73
- [20] Goepferich, A., Tessmar, J.: Polyanhydride degradation and erosion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 2002, s. 911-931
- [21] Goepferich, A.: Biodegradable polymers: Polyanhydride. In: Mathiowitz, E., eds. *Encyclopedia of Controlled Release Delivery*, 1999, s. 61-71
- [22] von Burkersroda, F., Schedl, L., Göpferich, A.: Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 23, 2002, s. 4221-4231
- [23] Ogle, C.R., Rathbone, M.J., Smith, J.F., Bunt, C., Burggraaf, S., Pickering, K.: Development of an injection moldable, biodegradable intravaginal insert technology. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, Boston, 1999, s. 66-67
- [24] Bunt, C.R., Woodward, V.G., Rathbone, M.J., Burggraaf, C., Ogle, C.R., Burke, C.R., Pickering, K.: A poly(epsilon-caprolactone) bovine intravaginal insert



- for the delivery of progesterone. Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., Boston, 1999, s. 70-71
- [25] Bunt, C.R., Rathbone, M.J., Burggraaf, C., Ogle, C.R., Burke, C.R.: Elevation of plasma progesterone levels in cattle using a poly(epsilon-caprolactone) and cyclodextrin intravaginal insert containing progesterone. Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., Boston, 1999, s. 1172- 1173
- [26] Johnson, C.A., Thompson, D.L.: Biodegradable delivery systems for estradiol: comparison between poly(D,L-lactide) microspheres and the SABER delivery system. Proc. Int Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 1999, s. 147-148
- [27] Ogawa, Y., Okada, H., Heya, T., Shimamoto, T.: Controlled release of LHRH agonist, leuprolide acetate, from microcapsules: serum drug level profiles and pharmacological effects in animals. J. Pharm. Pharmacol. 41, 1989, s. 439-444
- [28] Sandow, J., Jerabek-Sandow, G., Krauss, B., Schmidt-Gollwitzer, M.: Pharmacokinetics and metabolism of LHRH agonists, clinical aspects. In: Labrie, F., Belanger, A., Dupont, A., eds. LHRH and its analogues. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1984, s. 123-137
- [29] Ravivarapu, H.B., Moyer, K.L., Dunn, R.L.: Parameters affecting the efficacy of a sustained release polymeric implant of leuprolide. Int.J.Pharm. 194, 2000, s. 181- 191
- [30] Capancioni, S., Schwach-Abdellaoui, K., Zanello, P., Guyonnet, J., Kaltsatos, V., Gurny, R.: Semi-solid autocatalyzed poly(ortho ester) as a new veterinary drug delivery system for estrus synchronization in ewes. Proc. 4th World Meeting ADRITELV/APGI/APV, Florenz, 2001, s. 1539-1540
- [31] Jain, R.A.: The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials 21, 2000, s. 2475-2490
- [32] Radomsky, M.L., Bouwer, G., Floy, B.J., Loury, D.J., Chu, F., Tipton, A.J., Sanders, L.M.: The controlled release of Generalix from the Atrigel injectable implant system. Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 20, 1993, s. 458-459
- [33] Taylor, MA.: Recent Developments in Ectoparasiticides. Vet. J. 161, 2001, s. 253-268
- [34] Genchi, C., Rossi, L., Cardini, G., Kramer, L., Venco, L., Casiraghi, M., Genchi, M., Agostini, A.: Full season efficacy of moxidectin microsphere sustained release formulation for the prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. Vet. Parasitol. 110, 2002, s. 85-91

- [35] Jaffe, H., Miller, J., Giang, P., Hayes, D.: Implantable systems for delivery of insect growth regulators to livestock. Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 1980, s. 237-250
- [36] Carino, G.: Vaccine Delivery. In: Mathiowitz, E., eds. Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. Wiley, New York, 1999, s. 993-1006
- [37] O'Hagan, D., Singh, M., Gupta, R.: Poly(lactide-*co*-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. Adv. Drug Deliv. Rev. 32, 1998, s. 225- 246
- [38] Bowersock, T., Martin, S.: Controlled release vaccines in veterinary medicine. In: Rathbone, M., Gurny, R., eds. Controlled Release Veterinary Drug Delivery. Elsevier Science, Amsterdam, 2000, s. 269-309
- [39] Eldridge, J., Staas, J., Meulbroek, J., McGhee, T., Tice, R., Gilley, R.: Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. Mol. Immunol. 28, 1991, s. 287-294
- [40] Greenway, T., Eldridge, J., Ludwig, G., Staas, J., Smith, J., Gilley, R., Michalek, S.: Enhancement of protective immune response to Venezuelan equine encephalities (VEE) virus with mikroencapsulated vaccine. Vaccine 13, 1995, s. 1411-1420
- [41] Barr, I., Kleining, M., Thiel, W.: A single-dose vaccination system of inactivated veterinary vaccine. International Congress on the Regulation of Leukocyte Production and Immune Function, Sydney, 1993
- [42] Hazrati, A., Lewis, D., Atkins, T., Stohrer, R., McPhillips, C., Little, J.: Salmonella enteritidis vaccine utilizing biodegradable microspheres. Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mat., 1993, s.101-102
- [43] Estunigsih, S., Smooker, P., Wiedosari, E., Widjajanti, S., Vaiano, S., Partoutomo, S., Spithill, T.: Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccine againts tropical fasciolosis in cattle. Int. J. Parasitol. 27, 1997, s. 1419-1428
- [44] Preston, R.L.: Hormone containing growth promoting implants in farmed livestock. Adv. Drug Deliv. Rev 38, 1999, s. 123-138
- [45] Foster, T.P.: Somatotropin delivery to farmed animals. Adv. Drug Deliv. Rev. 38, 1999, s. 151-165
- [46] Foster, T., Moseley, W., Caputo, J., Alaniz, G., Leatherman, M., Yu, X., Claflin, W., Reeves, D., Cleary, M., Zantello, R.: Sustained elevated serum somatotropin concentrations in Holstein steers following subcutaneous delivery of a growth hormone releasing factor analog dispersed in water, oil or microspheres., J. Control. Release 47, 1997, s. 91-99

- [47] Wyse, J.W., Takahashi, Y., DeLuca, P.P.: Instability of porcine somatotropin in polyglycolic acid microspheres. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1989, s. 334-335
- [48] Thompson, W.W., Anderson, D.B., Heiman, M.L.: Biodegradable microspheres as a delivery system for rismorelin porcine, a porcine-growth-hormone-releasing-hormone. *J. Control. Release* 43, 1997, s. 9-22
- [49] Conrad, J.M., Skinner, D.S.: Controlled Sustained delivery of monensin in cattle: monensin R.D.D. *J. Control. Release* 9, 1989, s. 133-147
- [50] Bahk, J.Y., Hyun, J.S., Lee, J.Y., Kim, J., Cho, Y.H., Lee, J.H., Park, J.S., Kim, M.O.: Concentration of ofloxacin in canine tissue and prostate: fluid after intraprostatic injection of biodegradable sustained-releasing microspheres. *J. Urol.* 163, 2000, s. 1560-1564
- [51] [www.stockguard.co.nz](http://www.stockguard.co.nz)
- [52] Schwach-Abdellaoui, K., Moreau, M., Schneider, M., Boisram, B., Gurny, R.: Controlled delivery of metoclopramide using an injectable semi-solid poly(orthoester) for veterinary application. *Int. J. Pharm.* 248, 2002, s. 31-37
- [53] Verrijck, R., Smolders, I.J., Bosnie, N., Begg, A.C.: Reduction of systemic exposure and toxicity of cisplatin by encapsulation on poly-lactide-*co*-glycolide. *Cancer Research* 52, 1992, s. 6653-6656
- [54] Gupta, P.K., Johson, H., Allexon, C.: In vitro and in vivo evaluation of clarithromycin PLA microspheres for intramuscular drug delivery. *J. Control. Release* 26, 1993, s. 229-238
- [55] Sun, Y., Peng, Y., Aksornkoe, N., Johnson, J.R., Boring, J.G., Scruggs, D., Cooper, R.C., Laizure, S.C., Shukla, A.J.: Controlled release of oxytetracycline in sheep. *J. Control. Release* 85, 2002, s. 125-134
- [56] Ustariz-Peyret, C., Vert, M.: Labile conjugation of a hydrophilic drug to PLA oligomers to modify a drug delivery system: cephradine in PLAGA matrix. *J. Microencaps.* 17, 2000, s. 615-624