

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické technologie**

**OLIGOESTERY VĚTVENÉ DIPENTAERYTHRITOLEM**  
**JAKO ADHEZIVNÍ NOSIČE LÉČIV**

**Diplomová práce**

**Kateřina Doležalová**

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

Děkuji PharmDr. Evě Šnejdové Ph.D za odborné vedení při vypracování diplomové práce.

## Obsah

1. Úvod.....	5
2. Cíl práce.....	6
3. Seznam zkratk .....	7
4. Teoretická část .....	8
4.1. Biomateriály .....	8
4.1.1. Hydrolyticky degradabilní polymery .....	9
4.1.2. Enzymaticky degradabilní polymery .....	14
4.2. Bioadheze.....	17
4.2.1. Teorie adheze.....	17
4.2.2. Substráty pro adhezi.....	19
4.2.3. Adhezivní testy .....	20
4.2.4. Bioadhezivní materiály .....	21
5. Experimentální část.....	24
5.1. Použité suroviny .....	24
5.2. Použité přístroje .....	25
5.3. Plastifikace nosičů .....	25
5.4. Příprava matric.....	25
5.5. Příprava liberačního media .....	26
5.6. Kalibrační přímka acikloviru .....	26
5.7. Kalibrační přímka flukonazolu .....	27
5.8. Příprava matric.....	29
5.9. Disoluční test .....	29
5.10. Měření adheze.....	29
6. Výsledky .....	31
6.1. Vzhled matric v průběhu disolučního testu .....	31
6.2. Adhezivita matric s léčivem a bez léčiva.....	34
6.3. Liberace léčiv.....	36
7. Diskuse.....	43
7.1. Charakteristika oligoesterů větvených dipentaerythritolem .....	43
7.2. Vzhled matic v průběhu disolučního testu.....	45

7.3.	Adhezivní vlastnosti oligoesterů větvených dipentaerythritolem.....	46
7.4.	Liberace léčiv z oligoesterů větvených dipentaerythritolem .....	49
8.	Závěry .....	52
9.	Abstrakt.....	53
10.	Abstract.....	53
11.	Seznam použité literatury .....	54

## 1. Úvod

Tato práce se zabývá studiem průběhu liberace a adhezivními vlastnostmi oligoesterových nosičů D,L-mléčné kyseliny a kyseliny glykolové. Tyto látky jsou důležitými biomateriály a bioadhezivy. Práce studuje jejich schopnost uvolňovat léčiva (aciklovir, flukonazol) do liberačního media za definovaných podmínek (pH pufru, teploty, 4% léčiva, 20% plastifikátoru triethylcitrátu, stanovené doby odběru media). Obsah uvolněného léčiva byl hodnocen spektrofotometricky. Adhezivita oligoesterových nosičů byla studována in vitro na materiálovém zkušebním stroji. Zkoušení adhezivitu probíhalo na materiálovém zkušebním stroji Zwick/Roel T1-FR050TH.A1. Měřila se síla v Newtonech potřebná pro odtržení adheziva od substrátu. Hodnotila se adheziva plastifikovaná 20% triethylcitrátu a adheziva plastifikovaná 20% triethylcitrátu s obsahem léčiva acikloviru. Na katedře farmaceutické technologie farmaceutické fakulty jsou dlouhodobě tyto oligoesterové nosiče studovány. Tato práce navazuje na řadu předchozích, které již v minulosti vznikly<sup>1, 2</sup>.

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo hodnocení adhezivních a disolučních charakteristik plastifikovaných oligoesterových nosičů obsahujících aciklovir (ACV) a flukonazol (FLU). Nosiče byly připraveny z oligoesteru kyseliny D,L-mléčné a kyseliny glykolové a byly větveny dipentaerytritolem (D) v různých procentuelních zastoupeních. Byly použity nosiče s 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5% a 8% dipentaerytritolu (z toho vychází pracovní označení 0,5D, 1D, 2D, 3D, 5D, 8D). Nosiče byly plastifikovány 20% triethylcitrátu.

Úkol práce lze rozdělit do těchto bodů:

1. Plastifikace nosičů 20% triethylcitrátu (TEC).
2. Měření adhezivních vlastností plastifikovaných nosičů na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell.
3. Příprava matric obsahujících 4% ACV, nebo FLU z nosičů 0,5D, 1D, 2D, 3D, 5D, 8D plastifikovaných triethylcitrátem.
4. Liberace ACV, FLU do fosfát-citrátového pufru z matric ve statickém disolučním testu při 37 °C.
5. Stanovení množství uvolněného ACV, FLU měřením absorbance proti pufru při 256nm (ACV), 261nm (FLU).
6. Zhodnocení průběhu liberace ACV, FLU z nosičů.
7. Zhodnocení adhezivních vlastností plastifikovaných nosičů.

### 3. Seznam zkratek

0,5D	oligoester kyseliny D,L-mléčné a glykolové a 0,5% dipentaerythritolu
1D	oligoester kyseliny D,L-mléčné a glykolové a 1% dipentaerythritolu
2D	oligoester kyseliny D,L-mléčné a glykolové a 2% dipentaerythritolu
3D	oligoester kyseliny D,L-mléčné a glykolové a 3% dipentaerythritolu
5D	oligoester kyseliny D,L-mléčné a glykolové a 5% dipentaerythritolu
8D	oligoester kyseliny D,L-mléčné a glykolové a 8% dipentaerythritolu
ACV	aciklovir
D	dipentaerythritol
$F_{\max}$	maximální síla nutná k odtržení obou ploch při měření adheze
F/S	síla odtržení obou ploch na jednotku plochy
FLU	flukonazol
s $F_{\max}$	směrodatná odchylka měření $F_{\max}$
s F/S	směrodatná odchylka síly odtržení obou ploch na jednotku plochy
S	plocha adheze
TEC	triethylcitrát
$\bar{\varnothing} F_{\max}$	aritmetický průměr naměřených $F_{\max}$ jednoho adheziva

## 4. Teoretická část

### 4.1. Biomateriály<sup>3</sup>

Biomateriály jsou materiály určené ke kontaktu s biologickým systémem za účelem léčení, nahrazení, zlepšení biologické struktury, nebo orgánu. Jejich důležitou vlastností je schopnost určitého materiálu provádět vhodnou odezvu na biogenním materiálu, tedy biokompatibilita. Biokompatibilita záleží na mnoha faktorech, jako jsou fyzikální, chemické a biologické vlastnosti biomateriálu. U biodegradabilních materiálů se předpokládá jejich biokompatibilita po celou dobu jejich použití. To znamená, že i produkty vzniklé biodegradací by měly být biokompatibilní. Biomateriály, ani produkty jejich rozkladu, nesmí způsobovat zánět, nebo toxickou reakci, musí mít přijatelnou dobu degradace. Také mechanické vlastnosti materiálu by měly být kompatibilní s požadavky. Produkty rozkladu biomateriálů by měly být snadno metabolicky odbouratelné.<sup>4</sup>

Biodegradace zahrnuje enzymatické a hydrolytické štěpení polymeru vedoucí k jeho postupnému rozkladu. Polymery tak lze rozdělit na ty s převážně hydrolytickým a převážně enzymatickým rozkladem. Biomateriály lze využít jako dočasné šrouby a pláty do kostí, matrice pro kontraseptivní implantáty, degradabilní šicí materiály, různé matrice, nebo membrány pro řízené uvolňování léčiv, nebo jako lešení pro tkáň v tkáňovém inženýrství. Z lékových forem se používají pevné implantáty, implantáty in situ, vaginální inserty, nebo mikrosféry. V těchto systémech se využívají hlavně polymery kyseliny mléčné, kyseliny glykolové, kyseliny vinné, polyanhydridy, polyorthoestery.<sup>5</sup>

Jako první byly používány přírodní polymery. Mezi jejich nevýhody patří variabilní možnost degradace v závislosti na koncentraci a biologické aktivitě enzymů. Další nevýhodou je schopnost vazby ligand-receptor, která může vést k jejich imunogenitě. Problematické bývá i získávání těchto polymerů, protože je nutno zajistit jejich čistotu a biologickou nezávadnost. Mnoho těchto látek je savčímu tělu vlastní, tyto pak mívají výbornou biokompatibilitu. Díky dlouhodobému používání v praxi je jejich bezpečnost dostatečně prověřena. Patří sem např. fibrin, albumin, kyselina hyaluronová.

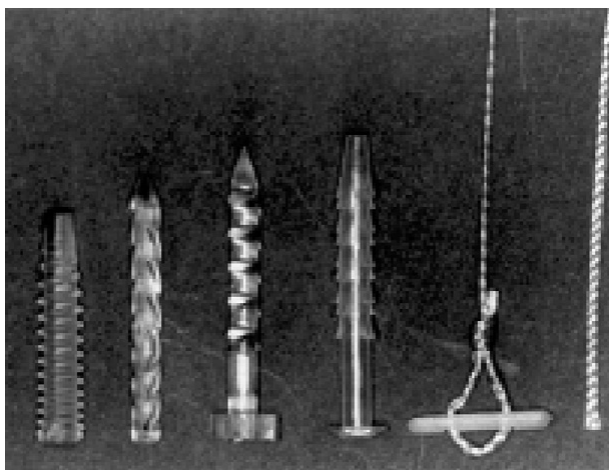
Syntetické biopolymery mají lépe předvídatelné vlastnosti a při výrobě lze přesně definovat chemické vlastnosti celé šarže. Navíc lze jednotlivé polymery modifikovat a tak připravit látku odpovídající aktuálním požadavkům.



#### 4.1.1. Hydrolyticky degradabilní polymery

Hydrolyticky degradabilní polymery obsahují funkční skupiny, které jsou citlivé k hydrolyze. Chemicky jsou to estery, anhydridy, uhličitany, amidy, urethráty a další. <sup>6</sup> Pro přípravu hydrolyticky degradabilních polymerů lze použít polykondenzaci, nebo ring-opening polymerizaci. Radikálovou reakci pro syntézu nelze použít, protože při ní vznikají biostabilní polymery. <sup>7</sup>

Poly( $\alpha$  estery) jsou lineární, termoplastické a hydrolyticky dobře rozložitelné. Chemicky jde o poly- $\alpha$ -hydroxykyseliny a jejich estery a další estery polymerů s, a nebo bez kyslíku v sousedství karboxyskupiny. Mezi poly( $\alpha$  estery) patří polymery kyseliny glykolové a mléčné. Polymery kyseliny glykolové byly jako první použity v 60. letech, jako umělé šicí materiály. Od té doby se na ně trvale soustředí pozornost díky jejich výborné biokompatibilitě a snadné kontrole degradace.



Obr. 1: Chirurgické implantáty pro opravu menisku z poly( $\alpha$ esterů) <sup>8</sup>

Poly( $\alpha$  estery) lze získat polykondenzací kyseliny mléčné a glykolové, nebo pomocí ROP (ring-opening polymerization), kdy dochází k polymerizaci cyklických dimerů kyseliny mléčné a glykolové. Při vzniku polymerů polykondenzací je obtížné dosáhnout dostatečně velké molekulové hmotnosti produktu. ROP umožňuje vyšší kontrolu nad polymerací, vyžaduje však katalýzu a nastavení přiměřených podmínek. <sup>9</sup> ROP je výhodnější i z hlediska kratšího reakčního času, mírnějších podmínek reakce a použití i u šesti-, nebo sedmičlenných laktonů. Tyto látky lze též připravit biosynteticky pomocí bakterií.

**Polyglykolidy** (PGA) byly prvním syntetickým polymerem použitým jako biomateriál. Byly z nich vyrobeny první umělé stehy DEXON<sup>s</sup><sup>®</sup>. Přes jejich nízkou rozpustnost ve většině běžných rozpouštědel lze tyto látky tvarovat extruzí, vztřikováním i kompresí. Vzniklá vlákna se vyznačují vysokou krystalinitou (45-55%), proto jsou velmi pevná v tahu. Díky již zmíněné vysoké krystalinitě mají polyglykolidy výbornou pevnost a lze je použít jako dočasné kostní náhrady, nebo výstuhy, tzv. vnitřní fixační pomůcky (Biofix<sup>®</sup>).<sup>10</sup> Polyglykolidy jsou v těle degradovány na glycin. V konečné fázi jsou tedy vyloučeny močí, nebo využity v Krebsově cyklu za vzniku oxidu uhličitého a vody.<sup>11</sup> Nevýhodou polyglykolidů je relativně vysoká rychlost rozkladu (jsou hydrolyzovány během 1 až 2 měsíců). Proto je snaha vytvářet kopolymery obsahující polylaktidovou část.

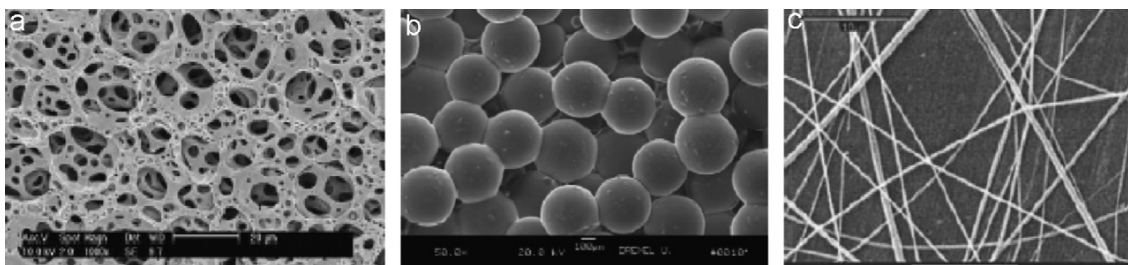
Také od kyseliny mléčné lze připravit poly- $\alpha$ -estery (PLA), **polylaktidy**. Kyselina mléčná je na rozdíl od kyselin glykolové chirální, a proto polymerace vede ke dvěma formám: poly-D-laktidy(PLLA) a poly-L-laktidy(PDLA). Polymerace racemátu kyseliny mléčné vede ke vzniku amorfního polymeru. Polymerace čisté D, nebo L formy vede ke vzniku částečně krystalické formy. Poly -L-laktidy mají podobně jako PGA vysokou krystalinitu (až 37 %). Na rozdíl od polyglykolidů jsou degradovány mnohem pomaleji. Výborně se hodí jako orthopedické fixační pomůcky, kdy jsou šroub, nebo destička z těchto polymerů využity jako dočasná opora hojících se tkání. Polylaktidy mají téměř ideální profil pro toto použití: vynikající kompatibilitu, kompletní degradaci materiálu, odpovídající pevnost implanátu v počátku i během degradace. Je známo, že PLLA jsou v organismu degradovány v závislosti na molekulové hmotnosti 2,5 až 6 let.<sup>10</sup> Z PLA se vyráběly vstřebatelné chirurgické šicí materiály s lepšími vlastnostmi než DEXON<sup>s</sup><sup>®</sup>. Dále lze PLA využít jako náhrady cév<sup>12</sup>, a nebo pro vyplnění míst vzniklých lipoatrofií u pacientů s AIDS.

Lze připravovat i materiály, které obsahují **kopolymery kyseliny L-mléčné a D-mléčné**. Poly(D,L-laktidy) (PDLLA) jsou amorfní látky s náhodnou distribucí D a L jednotek kyseliny mléčné. V organismu ztrácí pevnost do 1-2 měsíců a jsou plně hydrolyzovány do 6 měsíců. Polymery kyseliny mléčné jsou v organismu rozkládány na kyselinu mléčnou, která je cestou Krebsova cyklu též rozkládána na vodu a oxid uhličitý. Z polylaktidů lze také připravovat nanočástice. Nanočástice tvořené kyselinou poly(mléčnou) v krvi snadno podléhají rozkladu, nebo jsou vychytávány v játrech v důsledku rychlé

opsonizace makrofágy. Při injekčním podání obvykle do 2 až 3 minut. Proto je nutné jejich povrch potahovat PEG (polyethylenglykol).

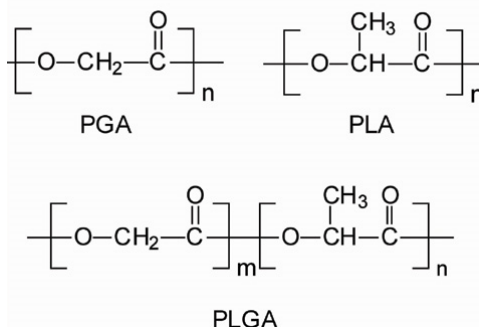
Tyto částice pak mají prodlouženou cirkulaci v krevním oběhu. Molekulová hmotnost se pohybuje u PLA od 2 do 110 kDa a u PEG 20 až 750 kDa. Bylo prokázáno, že částice PLA mají hydrofobní jádro a částice PEG mají na svém povrchu hydrofilní solvovanou vrstvu. Léčiva pak mohou být začleněna do hydrofobní části, odkud potom pomalu difundují.

**Poly(laktidy-co-glykolidy) (PLGA)** jsou kopolymery kyseliny L,D mléčné a kyseliny glykolové. Tyto látky jsou v organismu rozkládány v závislosti na složení kopolymeru. Kopolymer obsahující 50 : 50 (mléčná : glykolová) degraduje během 1-2 měsíců, 75 : 25 (mléčná : glykolová) během 4,5 měsíců, 85 : 15 (mléčná : glykolová) během 5-6 měsíců. Tyto polymery jsou hojně využívány jako vstřebatelný šicí materiál, jako lešení v tkáňovém inženýrství při transplantaci kůže.<sup>13</sup>



Obr. 2: Trojrozměrné struktury vyrobené z PGLA<sup>14</sup>

PLGA jsou též využívány jako matrice pro řízené uvolňování léčiv, nebo bílkovin (ve formě mikrosfér, nanotobolek, mikrovláken). Využití je však omezeno tím, že produkty rozkladu samotného polymeru jsou kyselé povahy (nesmí dojít k interakci s léčivem, nebo jeho negativnímu ovlivnění). Řešením tohoto problému nemůže být enkapsulace dané účinné látky.



Obr. 3: Chemická struktura polymerů kyseliny mléčné a glykolové <sup>15</sup>

Mezi hlavní potíže při zpracování těchto polymerů patří autokatalytická povaha hydrolyzy PLA, která vede k heterogennímu rozkladu. Druhým hlavním problémem je krystalizace polymerů kyseliny mléčné i glykolové v průběhu degradace. Tyto fenomény je potřeba brát v potaz při studiu degradace těchto látek. <sup>16</sup>

Při degradaci PLA/PGLA ve vodném prostředí dochází nejdříve k absorpci vody do matrice. Pronikající voda pak rychle vytváří negativní gradient koncentrace vody ve směru z povrchu matrice do centra. Tento gradient však v několika dnech mizí a dochází k homogennímu rozmístění vody po celé matrici. Proto se lze domnívat, že zpočátku dochází k homogenní degradaci. Avšak při hydrolyze se zvyšuje počet volných karboxylových skupin, které působí katalyticky na další degradaci. Při hydrolyze pak také vznikají kratší oligomery, které jsou lépe rozpustné. A pokud se nachází na povrchu matrice, mohou být odplaveny před úplnou degradací na monomery. Když se tyto oligomery nachází uvnitř matrice, nemohou být odplaveny a působí tu opět jako katalyzátory hydrolytické reakce. Nižší koncentrace oligomerů na povrchu vede k jeho pomalejší degradaci. Tloušťka tohoto povrchu potom záleží na mnoha faktorech, jako je rychlost difúze, rychlost štěpení esterové vazby, obsah a podíl jednotlivých izomerů kyseliny mléčné a v neposlední řadě na povaze média, ve kterém degradace probíhá (iontová síla, pH, teplota, rozpustnost). Jestliže je degradován kopolymer kyseliny mléčné a glykolové, dochází k preferenčnímu PGA štěpení. V případě matrice tvořené PLA dochází k rychlejší degradaci amorfní části, než části krystalické. Rychlost degradace také závisí na

léčiv, které je v matrici zadržováno. Je například zjištěno, že matrice PLA bez gentamicinu je degradována rychleji, než matrice s gentamicinem.<sup>17</sup>

Z imunologického hlediska dochází k minimálnímu nahromadění makrofágů v okolí implantátů. Makrofágy zde provádí fagocytózu a clearance materiálu. V cévách v okolí implantátů nedochází k hromadění žádných zánětlivých markerů. Pouze těsně po voperování implantátu dochází k nahromadění lymfocytů, polymorfonukleárů a granulocytů, zřejmě v souvislosti s chirurgickým zákrokem. Imunitní reakce nezávisí na tloušťce ani povrchu implantátu.<sup>18</sup>

PLA, PGA a PGLA jsou výbornými biomateriály, avšak co se týká mechanických vlastností, nejsou vždy optimální. Tyto vlastnosti, lze upravit jejich mísením. Pro toto mísení je potřeba dodat povrchově aktivní látky, jako je kopolymer ethylenoxidu, nebo propylenoxidu. PLLA je křehký a tvrdý. Po přidání PDLLA nebo polykapronolaktonu se stává odolnějším a houževnatějším.<sup>19</sup>

Kromě poly( $\alpha$  esterů) se jako hydrolyticky degradabilní polymery používají i další látky.

Polydioxany jsou látky, ze kterých se připravují šicí materiály, které jsou monofilamentární (na rozdíl od multifilamentárních vláken z PLGA, PLA, PGA, u kterých hrozí vyšší riziko infekce). Dále jsou používány v orthopedii ve formě vstřebatelných implantátů, šroubů atd. Polydioxany jsou v organismu rozkládány na glyoxylát, glycin, vodu a oxid uhličitý. Plně jsou rozloženy během 6-12 měsíců a pevnost si zachovávají 1-2 měsíce.<sup>11</sup>

Polykaprolaktony jsou látky na které je soustředěn zájem pro jejich relativně nízkou cenu. Tyto látky jsou v organismu relativně pomalu degradovány (2-3 roky) a jejich produkty jsou netoxické. Proto jsou intenzivně studovány pro možnost využití na dlouhodobé implantáty, nebo dlouhodobou vakcinaci. V praxi je již implantát s dlouhodobým uvolňováním levonorgestrelu s kinetikou nultého řádu Capronors®. Kompozity polykapronátů s fosforečnanem vápenatým jsou zkoumány jako řešení v tkáňovém inženýrství kostní tkáně.<sup>20</sup>

Bakteriální polyestery jsou tvořeny bakteriemi jako zdroj energie. Nejdůležitějším bakteriálním polyesterem je poly(hydroxybutyrát) (PHB), který byl objeven už v roce 1920. Později byly objeveny další polymery a též docházelo k jejich syntetickým obměnám. Nejdůležitější syntetickou obměnou je kopolymer poly(hydroxybutyrátu) a poly(3-

hydroxyvalerátu). Homopolymer PHB je křehký, proto je jeho kopolymer s 3-hydroxyvalerovou výhodnější pro svou vyšší mechanickou odolnost. Z těchto látek lze připravovat nejrůznější destičky, vlákna, orthopedické šrouby a další. Degradace bakteriálních polyesterů probíhá pomalu a pouze povrchově. Připravují se z nich dlouhodobé implantáty.<sup>21</sup>

Pro doplnění lze uvést další biopolymery. Biostabilní polyuretany jsou používány jako dlouhodobé implantáty např. jako kardiostimulátory nebo cévní štěpy. Biodegradabilní polyuretany jsou studovány pro možnost využití v tkáňovém inženýrství, nebo v orthopedii.<sup>22</sup> Polyamidy jsou velmi dobře degradovány v důsledku hydrolytické lability amidové vazby. Využití těchto látek je v degradabilních šicích materiálech. Polyorthoestery jsou na rozdíl od ostatních hydrofobní, proto degradují pouze povrchovou erozí. Další unikátní vlastností polyorthoesterů je jejich citlivost na pH. Z polyorthoesterů se vytváří dlouhodobé implantáty.<sup>23</sup> Polyanhydridy jsou hydrolyticky velmi labilní díky nestabilní anhydritové vazbě. Původně byly navrženy jako textilní materiál, avšak brzy se začalo uvažovat o jejich využití jako biomateriálu. V roce 1992 byly schváleny FDA, jako látky vhodné pro řízené uvolňování léků.<sup>24</sup>

#### **4.1.2. Enzymaticky degradabilní polymery**

Enzymaticky degradabilní biomateriály lze rozdělit na proteiny a poly(aminokyseliny), polysacharidy lidského původu a polysacharidy jiného než lidského původu. Proteiny jsou hlavní stavební složkou mnoha tkání. Mají široké využití v tkáňovém inženýrství, jako šicí materiály, hemostatické materiály, nebo v technologii implantátů. Proteiny se vyznačují složitou strukturou.

Kolagen je jedna z nejčastějších bílkovin vyskytujících se v organismu živočichů. Obsahuje 33% glycinu, 25% prolinu a 25% hydroxyprolinu s relativní hojností lysinu. Primární struktura je dána opakováním tripletů aminokyselin, proto má kolagen trojšroubovicovou strukturu s vysokou pevností. Kolagen podléhá enzymatickému odbourávání kolagenázami a metaloproteázami. Využití kolagenu jako biomateriálu je široké. Lze z něj formovat různé houby, pěny, nanotrubicе, sféry, injekční vizkoznní roztoky a disperze. Kolagen se účastní koagulační kaskády, díky tomu je používán jako hemostatické agens. Dále je používán spolu s hovězím trombinem jako tkáňový tmel při

kardiovaskulárních, či spinálních zákrocích. Také je ideálním fyziologickým lešením pro tkáňové inženýrství. Kolagenní houby obsahující oxidovanou celulosu byly zavedeny pro terapii diabetických vředových ran.<sup>25</sup> Ve farmaceutické technologii je kolagen využíván jako matrice pro lokální uvolňování nízkomolekulárních léčiv a antibiotik. Stejně tak lze použít kolagenní matrice pro uvolňování bílkovin, nebo DNA ve formě plastidu. Překážkou v používání kolagenu může být jeho imunogenita.<sup>26</sup>

Přírodní poly(aminokyseliny) jsou biodegradabilní iontové polymery, které se od bílkovin a peptidů liší tím, že jsou složeny z převážně z jedné aminokyseliny. Příkladem je cyanofycin, poly(L-lysin), kopolymer L,D glutamové. Tyto polymery byly dále upravovány pro získání výhodnějších vlastností. Příkladem je benzylester kyseliny poly(L, D glutamové), který degraduje velmi pomalu a degradace je závislá na pH. Tento ester je vyvinut jako dlouhodobý nosič pro 5-fluorouracyl. Poly(L-lysin) vykazuje cytotoxický, antivirový a antibakteriální efekt. Byl by ideálním nosičem cytostatik, antibiotik a antivirových, avšak jeho použití je limitováno výraznou cytotoxicitou, která je dána velkým kladným nábojem.<sup>27</sup>

Elastin je protein odpovědný za elasticitu mnoha tkání, např. cév, nebo plicní tkáně. Je tvořen molekulami topoelastinu. Topoelastin je bílkovina, která se skládá z několika opakujících se sekvencí tetrapeptidů, pentapeptidů, hexapeptidů a nonapeptidů. Je produkován intracelulárně hladkosvalovými buňkami a fibroblasty. Elastin je však imunogenní, a proto má omezené použití pro biomedicínskou aplikaci. Díky své minimální interakci s trombocyty je využíván na cévní štěpy.<sup>28</sup>

Elastin-like peptidy jsou tvořeny z pentapeptidu lidského topoelastinu a jsou na rozdíl od elastinu neimmunogenní. Navíc lze upravit tak, aby jejich vlastnosti byly závislé na iontové síle, pH nebo světelných vlivech.<sup>29</sup>

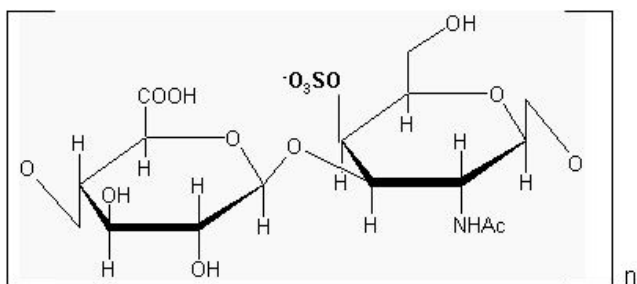
Albumin je důležitý protein lidské plasmy a téměř všechny tkáně v lidském organismu jsou schopny ho degradovat. Navíc ho lze velmi dobře zpracovat do různých mikrosfér, nanovláken či membrán. Albumin je používán jako tkáňové lepidlo, nosič léčiv, nebo jsou s ním potahovány kardiovaskulární přístroje.<sup>30</sup>

Fibrin je polymer účastnící se kaskády srážení krve. Fibrinogen je působením enzymu trombinu přeměňován na fibrin, který tvoří fibrinovou sraženinu. Fibrin je v organismu rozpuštěn plasminem. Vzhledem k tomu, že je fyziologický, tak má výbornou

biokompatibilitu. Fibrin, je používán k hemostáze, jako tkáňové lepidlo, a jako nosič léčivých látek.<sup>31</sup>

Kyselina hyaluronová patří mezi glykosaminoglykany. V její struktuře se střídá N-acetyl-D-glukosamin a kyselina glukuronová. Kyselina hyaluronová je ve vodě rozpustná za tvorby vysoce viskozních roztoků s unikátními viskoelastickými vlastnostmi. V organismu se nachází v pojivových tkáních. Díky své neimunogenitě je používána jako nosič léčiv, jako biomateriál v tkáňovém inženýrství, v traumatologii je využívána na podporu hojení ran.<sup>1</sup>

Chondroitinsulfát je tvořen fibroblasty při hojení ran. Tvoří tu hydrofilní matrice důležité pro remodelaci tkání. Chondroitinsulfát se nachází v kloubní chrupavce, kde stimuluje její metabolismus a působí protizánětlivě. Tyto vlastnosti ho předurčují pro biomedicínské využití.<sup>32</sup> Chondroitinsulfát je tvořen opakujícími se jednotkami N-acetylgalactosaminu a kyseliny glukuronové modifikované sulfatací.



Obr. 4: Struktura chondroitinsulfátu<sup>33</sup>

Díky své poddajnosti, neimunogenitě a biokompatibilitě je využíván jako hydrogelový „obvaz“ pro ošetření komplikovaných ran.<sup>34</sup> Chondroitin sulfát je fyziologickým lešením při regeneraci chrupavky, v tkáňovém inženýrství se používá k tomuto účelu.

V biomedicínské aplikaci se používá také chitosan získávaný acylací chitinu tj. polysacharid exoskeletu členovců. A dále polymery kyseliny alginové získávané z hnědých řas. Tyto látky se využívají jako matrice pro řízené uvolňování léčiv, nebo jako hydrogely pro vlhké hojení ran.<sup>35</sup>



## 4.2. Bioadheze

### 4.2.1. Teorie adheze

Termín bioadheze znamená schopnost materiálu udržet se na biologickém substrátu určitou dobu působením mezipovrchových sil.<sup>36</sup> Jiná definice říká, že bioadheze je adheze mezi dvěma substráty, kde alespoň jeden z nich je biologický. Adheze je interakce mezi dvěma nepodobnými povrchy, jsou-li v kontaktu. Dvoufázový průběh adheze zahrnuje nejprve těsný kontakt a po něm následující vznik adhezivních vazeb. V praxi lze někdy těsný kontakt zajistit mechanickým přitlačením např. při podání do oka, vaginy, dutiny ústní. Jindy se musí spoléhat na aerodynamiku orgánu (adheze na střevo přitlačným střevním obsahem).<sup>37</sup>

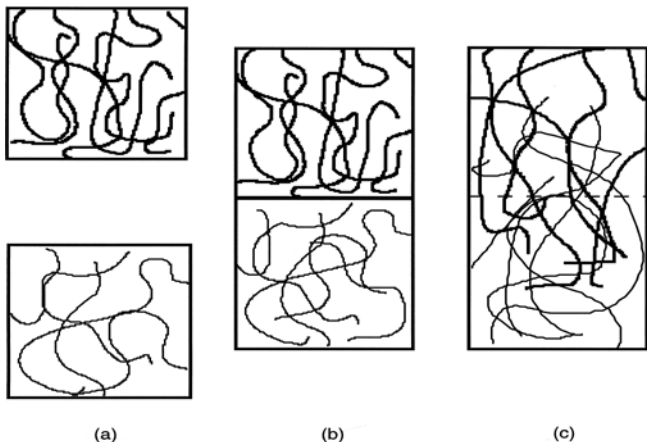
Mechanismus adheze je v literatuře vysvětlován několika různými teoriemi, avšak každá má své omezení. Skutečný mechanismus adheze je zřejmě dán kombinací těchto teorií.

1) **Elektronová teorie** předpokládá vznik elektrostatického náboje (elektrické dvojvrstvy) v důsledku přenosu elektronů přes rozhraní (elektrony přechází díky rozdílnému rozložení elektronů v jednotlivých molekulách). Bioadhezivní síla je pak přičítána přitažlivým silám v elektrické dvojvrstvě. Toto vysvětlení nachází své uplatnění hlavně při adhezi polymeru na kov. Přesto se předpokládá, že silový příspěvek elektrostatického náboje je menší než příspěvek Van der Walsových sil.

2) **Adsorpční teorie** předpokládá úzký kontakt, který vede ke vzniku interakcí: vodíkových vazeb - vodík vázaný na elektronegativní atom, jako je kyslík, fluor, dusík má částečně kladný náboj, a proto je přitahován ostatními elektronegativními atomy van der Walsových sil - slabé síly vznikající na základě interakce dipól-dipól, nebo mezi indukovanými dipóly disperzních sil - vznikají neuspořádaným pohybem elektronů kolem jádra, kde se mohou elektrony na chvíli nahromadit na jednom místě a tím vzniká krátkodobý dipól hydrofobních interakcí - zvýšená přitažlivost mezi dvěma částicemi ve vodném prostředí, v němž jsou interakce částice-voda slabší než interakce mezi molekulami vody

3) **Difuzní teorie** předpokládá fyzikální propletení řetězců vzájemně adhezivních polymerů. Hnací silou je koncentrační gradient na mezifázi. To vše může proběhnout za

předpokladu, že polymery jsou vzájemně kompatibilní, tedy mají podobný chemický charakter.<sup>38</sup>



Obr. 5: Schematické zobrazení difuzní teorie a) vrstvy před kontaktem b) vrstvy těsně po kontaktu c) vrstvy po určité době po kontaktu<sup>39</sup>

4) **Terorie smáčení** má primární využití u kapalných systémů a předpokládá vliv povrchové a mezipovrchové energie. Pro adhezi je důležitá schopnost kapaliny rozprostřít se po povrchu. Tuto schopnost lze popsat několika parametry. Mezi nejdůležitější patří kontaktní úhel  $\theta$ . Obecně platí, že čím menší je kontaktní úhel, tím lepší je afinita kapaliny k pevnému povrchu.

$$\cos \theta = \frac{\gamma_B - \gamma_{AB}}{\gamma_A}$$

$\gamma_A$  je mezipovrchové napětí kapaliny,  $\gamma_B$  je mezipovrchová energie pevné látky a  $\gamma_{AB}$  je mezipovrchové napětí mezi pevnou látkou a kapalinou.

Další parametr popisující adhezi je specifická práce adheze  $W$ .

$$W = \gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB}$$

$W$  je dáno energií, která je třeba k úplnému odtržení dvou vzájemně adheziujících substrátů.<sup>44</sup>

Z termodynamického hlediska k adhezi dojde pokud je změna volné energie záporná. Volná energie je tu dána osmotickým odporem, entropií vázaných řetězců a interakcí mezi vázanými řetězci a mucusem.

$$\Delta G_{AD} = \Delta H_{AD} - T \Delta S_{AD}$$

$G$  je volná energie adsorpce,  $H$  je enthalpie,  $S$  je entropie a  $T$  je termodynamická teplota adsorpce.

#### 4.2.2. Substráty pro adhezi

Substráty pro bioadhezi jsou mukus (hlen) a epiteliární membrána. Mukus pokrývá povrchy sliznic. Sliznice je výstelka, která kryje vnitřní povrchy těla. Je tvořena povrchovým epitelem (lamina epithelialis), pod ním je slizniční vazivo (lamina propria mucosae). Pod slizničním vazivem může být vrstva hladké svaloviny (lamina muscularis mucosae).<sup>41</sup>

Epitel je tkáň tvořená buňkami, které na sebe těsně naléhají, s minimem mezibuněčné hmoty. Tyto tzv. epiteliární buňky jsou spolu často pevně spojeny. Část buňky ústící do volného prostoru se nazývá distální (apikální) část, na opačné straně buňky se nalézá část proximální (bazální). Bazální částí buňky nasedají na bazální membránu. Epitelové buňky jsou vyživovány difúzí přes bazální membránu. Buněčná membrána je složena z lipidové dvojvrstvy se zakotvenými proteiny a polysacharidy. Podle počtu vrstev ze kterých je epitel složen, ho lze dělit na jednovrstevný, víceřadý, vrstevnatý a přechodný. Jednovrstevný epitel je tvořený jednou vrstvou buněk, jejich apikální povrch je volný, přivrácený do tělní dutiny, nebo na povrch těla. Jednovrstevný epitel je v žaludku, střevech, průduškách. Vrstevnatý epitel je tvořen několika vrstvami buněk. Nachází se například v jícnu, nebo v rohovce. U přechodného epitelu, např. v močovém měchýři, se počet vrstev mění v závislosti na náplni dutého orgánu. Víceřadý epitel je tvořen jednou vrstvou buněk, všechny se dotýkají bazální membrány, ale některé nedosahují až do tělní dutiny. Apikální povrchy buněk mohou být hladké, nebo pokud epitel vykonává ještě další funkce, buňka může být opatřena mikrovilli (nosní, střevní sliznice), pohyblivými i nepohyblivými řasinkami (sliznice dýchacích cest). Epitel sliznice je málo, nebo není vůbec keratinizován. Pokud obsahuje kreatin, může obsahovat ještě polární nebo nepolární lipidy vylučované do intercelulárních prostor. Pro krycí epitel je charakteristická neustálá obměna povrchových buněk, která je nezbytná pro udržení slizničního povrchu. Buňky se obnovují z tzv. germinativní vrstvy buněk při bazální membráně.<sup>40,41</sup>

Mucus může být vylučován kontinuálně, nebo přerušovaně. Jeho produkci zajišťují pohárkové buňky. Je složen z mucinu, elektrolytů, enzymů, lipidů, odumřelých epitelových buněk, produktů bakterií a vody (95%). Hlen obsahuje 12-17% proteinové složky. Charakter gelu, který je pro mukus nezbytný, je dán přítomností vysokomolekulárních vysoce glykosylovaných glykoproteinů. Glykosylováno je asi 50-80 % částí bílkovinného

řetězce. Stupeň glykosylace je závislý na podráždění pohárkových buněk. V případě podráždění (hodně kyselým pH, alkoholem, žlučovými kyselinami) dochází ke zvýšení stupně glykosylace a tedy ochrany sliznice. Proteinová část těchto glykoproteinů je tvořena asi 800 aminokyselinami. Na jednu molekulu připadá asi 200 oligosacharidických postranních řetězců. Oligosacharidické postranní řetězce chrání molekulu před proteolytickými enzymy, v místech glykosylace je proti nim molekula odolná. Oligosacharidy jsou tvořeny N-acetylglukosaminem, galaktosou, estery síranů, fukozou a zbytky kyseliny sialové. Díky kyselině sialové a síranovým zbytkům dochází při pH menším než 2,6 k plné ionizaci. A protože více než 50% oligosacharidových zbytků obsahuje kyselé skupiny, má tato ionizace významný vliv na charakter hlenu.<sup>42</sup> Výška a rychlost sekrece hlenu jsou důležitým faktorem ovlivňující bioadhezi. Problémem jsou onemocnění, kdy dochází k hyposekreci, nebo hypersekreci hlenu. Hypersekrece je častější reakce a dochází při ní ke zrychlené pasáži bolusu (a tedy i adhezivní lékové formy) trávicím traktem<sup>43</sup>.

#### **4.2.3. Adhezivní testy**

Pro popis adhezivních vlastností potenciaálních adheziv se provádí testy adhezivity. Zatím neexistuje žádná univerzální, standardní zkušební metoda. Adhezivitu lze studovat in vivo, in vitro, a ex vivo.

- Metody in vivo, kdy se pro zkoušení využívají celé živé organismy nejvíce vypovídají o tom, co se s adhezivem v organismu děje. Nicméně pro studování velkého množství potenciaálních adheziv se používají metody in vitro. In vivo dochází k hodnocení substrátu přímo v živém organismu, adhezivum je pozorováno pomocí scintigrafie, endoskopie, rentgenových technik atd. Pokud má látka dobré adhezivní vlastnosti in vitro, lze ji dále studovat in vivo.
- Testování in vitro využívá tahové zkoušky, sledování reologických charakteristik a další metody. Při tahových zkouškách se měří adhezivní síla, tedy síla, která je potřeba pro odtržení adheziva od substrátu. Podle směru odtržení adheziva od substrátu hodnotíme sílu tažnou, smykovou a odtrhávací. Velikost adhezivní síly je ovlivněna řadou testovacích faktorů : rychlost odtržení adheziva od substrátu, doba kontaktu adheziva se substrátem a velikost kontaktní síly.<sup>44</sup> Je však třeba

respektovat, že tyto proměnné se vždy musí nacházet v hranicích stanovených možnostmi živého organismu. Tedy např. že počáteční zatížení, tedy síla, kterou budou dvě adhezující plochy k sobě přitlačeny je v organismu malá. Hodnocenými veličinami jsou práce adheze a maximální síla odtržení. Při měření lze použít i metody trvalého a cyklického namáhání.

- Metody ex vivo se snaží napodobit podmínky v živém organismu pomocí izolovaných tkání a orgánů.<sup>45</sup>

#### **4.2.4. Bioadhezivní materiály**

Bioadhezivní materiály jsou polymerní látky přírodního, polosyntetického, nebo syntetického původu. Pro bioadhezivitu jsou důležité zejména tyto parametry:

- Vysoká molekulová hmotnost – pro každý polymer je optimální molekulová hmotnost pro adhezi jiná. Pro poly(akrylovou) kyselinu je to  $M_w$  kolem 750 000.
- Flexibilita polymerního řetězce – řetězce musí být dostatečně flexibilní, aby mohlo dojít k jejich propletení s řetězcem substrátu. Např. rozvětvené řetězce kyseliny polyakrylové vykazovaly menší adhezivitu, než řetězce lineární.
- Polarita – polaritu adhezivním polymerům udělují hydrofilní funkční skupiny. Hydrofilní funkční skupiny interagují s funkčními skupinami substrátu za vzniku různých interakcí.
- Bobtnání – je nepřímo úměrné stupni zesítnění.
- Elektrický náboj – polymery mohou být kladně, nebo záporně nabitě. Vzhledem k negativnímu náboji mucinu je důležité náboj posuzovat. Kationické polymery se váží na mucus elektrostatickými interakcemi. Anionické polymery se váží na mucus vodíkovými můstky.
- Konformace – konformace též může ovlivnit adhezivitu. Výhodná je konformace dvojšroubovice<sup>45</sup>.

Bioadheziva lze rozdělit do dvou generací.

Bioadheziva první generace jsou látky, které se ve farmacii používají již delší dobu jako pomocné látky (např. pojiva, masťové základy). Jejich výhodou je dlouhodobá zkušenost s používáním ve farmaceutické technologii. Problematická je jejich nedostatečná

specifita (vážou se k jakémukoli mukóznímu povrchu), proto je jejich použití omezeno. Mezi bioadheziva první generace patří deriváty celulosy (hyetellosa, sodná sůl karmelosy atd.), polyakryláty (karbomera, poly(methylmetakrylát) atd.), chitosan, pektin, agar atd.<sup>46</sup>

Bioadheziva druhé generace dovolují specifickou adhezi, prodloužení nebo zesílení adhezivních vlastností. Bioadheziva druhé generace lze použít k targetingu. Obsahují specifické molekuly, ligandy. Ligandy mohou být např. lektiny, molekulární adheziny, nebo specifické sekvence molekul. Lektiny jsou velkou skupinou proteinů, které dokáží s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat cukry, ať už volné, nebo vázané na glykoproteinech nebo glykolipidech. Lektiny se účastní mnoha dějů, ve kterých je nutné specifické rozpoznávání (imunologické reakce, kontakt buněk v tkáních, interakce patogenů s hostitelem,...). V trávicím traktu dochází ke specifické interakci lektinů s glykoproteiny slizničního hlenu, nebo glykolipidy membrán enterocytů. Problémem může být reprodukovatelnost rozsahu absorpce. Ten je třeba zvláště prozkoumat u léčiv s úzkým terapeutickým indexem.<sup>47</sup> Příkladem může být cílení PLGA nanočástic konjugovaných s aglutininem klíčků z Pšenice obecné. Tento lektin je preferovaným lektinem pro perorální podání pro svou afinitu k N-acetyl-D-glukosaminu a kyselině sialové (ty se nachází na M-buňkách a na enterocytech). Výhodou lektinů oproti protilátkám je jejich stabilita v kyselém prostředí a odolnost vůči proteolytickým enzymům.<sup>48</sup> Po začlenění thiolové skupiny dochází ke zvýšení adhezivity. Provádí se navázání cysteinu, nebo thioglykolové kyseliny. Teoreticky pak dochází ke vzniku disulfidických můstků mezi adhezivem samotným (vyšší zádržení vody) a mezi adhezivem a sliznicí. Takto byl upravován chitosan, algináty a karbomera.<sup>48</sup> Do molekuly polyakrylové kyseliny byla inkorporována molekula ethyl-hexyl akrylátu. Adhezivita se tímto zvýšila. Začlenění polyethylenglykolové skupiny do molekuly polyakrylové kyseliny též zvýší její adhezivitu. Předpokládá se, že polyethylenglykol zvyšuje interpenetraci řetězců adheziva a hlenu. Také použití poloxamerů může být výhodné díky jejich přechodům mezi kapalnou a polotuhou formou, které jsou teplotně závislé. Umožňují pak adhezivitu, nebo zpevnění v požadovaném místě (např. v místě zánětu se teplota zvyšuje).<sup>49</sup> Ze strukturálního hlediska můžeme na molekule adhezivního polymeru najít tzv. „adhezion promotores“, které jsou pro adhezi obzvláště důležité. Jde o kratší polymerní řetězce, nebo struktury navázané na polymeru, které jsou schopné tvořit trojrozměrnou síť.<sup>50</sup> Nově se při

designování molekul nových adhezivních polymerů používá právě přístup, kdy jsou využívány tyto „adhesion promotores“. Například bylo zjištěno, že pokud se na řetězec kyseliny polyakrylové naváží PEG zbytky, výrazně se zvýší její adhezivita, jelikož dojde k zapletení řetězců PEG a řetězců mukózy.<sup>51</sup>

## 5. Experimentální část

### 5.1. Použité suroviny

0,5D - Oligoester kys. D,L - mléčné, glykolové s 0,5 % dipentaerytholu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

1D - Oligoester kys. D,L - mléčné, glykolové s 1 % dipentaerytholu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

2D - Oligoester kys. D,L - mléčné, glykolové s 2 % dipentaerytholu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

3D - Oligoester kys. D,L - mléčné, glykolové s 3 % dipentaerytholu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

5D - Oligoester kys. D,L - mléčné, glykolové s 5 % dipentaerytholu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

8D - Oligoester kys. D,L - mléčné, glykolové s 1 % dipentaerytholu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

Aciklovir (Pliva Lachema)

Flukonazol (Zentiva a.s. Praha)

Triethylcitrát (Merck Mnichov)

Aceton čistý (Penta, výrobní divize Chrudim)

Čištěná voda (FaF UK HK)

Azid sodný (Fluka)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner Neratovice)

Kyselina citronová monohydrát, ČL 2002 (Penta, výrobní divize Praha)

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



## **5.2. Použité přístroje**

Digitální pH-metr HANNA pH 221

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

Digitální váhy KERN 440 – 33 ( max. 200g, d = 0,01g )

Analytické digitální váhy KERN ABS 220-4 ( max.220g, d = 0,0001 mg )

Spektrofotometr HELIOS GAMA (UV/VIS), Unicam

Biologický termostat BT 120

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

Horkovzdušná sušárna ULE 400, Memmert

## **5.3. Plastifikace nosičů**

Nosiče byly plastifikovány TEC v 20% koncentraci. Pro přípravu 10g plastifikovaného nosiče bylo použito vždy 8g daného nosiče a 2g TEC. Do kádinky na 25ml bylo naváženo 8,00g nosiče, který byl v sušárně roztaven (teplota v sušárně byla nastavena na 80°C). K roztavenému nosiči bylo postupně, za průběžné homogenizace, přiváženo 2,00g TEC. Homogenizace byla prováděna pomocí malé kovové kopistky. V průběhu homogenizace se směs nechala občas nahřát v sušárně při 80°C, odpařený TEC byl dovážen.

## **5.4. Příprava matric**

Od všech nosičů bylo připraveno 3,00g vzorku s léčivem (ACV, FLU). Bylo použito 4% léčiva.

Obecný předpis:

Plastifikovaný nosič	2,88g
Léčivo	0,12g

Na analytických vahách bylo naváženo do kádinky na 10ml 2,88g plastifikovaného nosiče, který byl pro snadnější manipulaci nahřátý v sušárně (na 80°C). Přimo do této kádinky se přivážilo ještě 0,12g léčiva. Vzorek se homogenizoval pomocí malé kovové kopistky.

### **5.5. Příprava liberačního media**

Pro disoluční test byl zvolen fosfát-citrátový pufr o pH 7,00. Pufr byl připraven dle chemických tabulek smícháním roztoku A a roztoku B. Roztok A má obsahovat 3,99 g monohydrátu kyseliny citrónové ve 190 ml vody, roztok B 28,84 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného v 810 ml vody. K dispozici byl však dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, proto musela být hmotnost přepočítána na dodekahydrát (Mr dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného je 178,14 g/mol; Mr dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného je 358,14 g/mol). Roztok B tedy obsahoval 57,97g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného v 810ml vody. Protimikrobní stabilizace byla provedena přidáním 0,02 % azidu sodného. Skutečná hodnota pH byla změřena digitálním pH metrem HANNA pH 221.

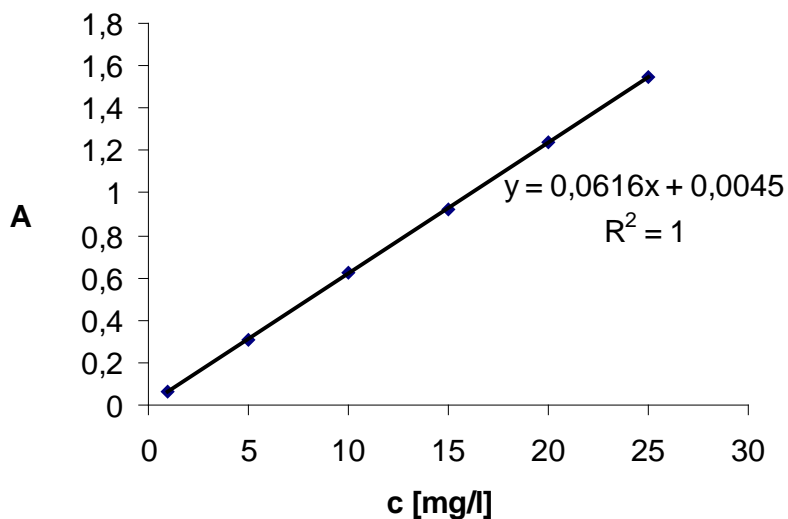
### **5.6. Kalibrační přímka acikloviru**

Kalibrační přímka ACV byla sestrojena pomocí měření řady roztoků ACV při vlnové délce 256nm, tedy v absorpčním maximu roztoku ACV ve fosfát-citrátovém pufru o pH 7,0. Bylo proměřeno 6 roztoků o rostoucí koncentraci ACV. S pomocí získaných absorbancí byla sestrojena kalibrační přímka, vytvořena její rovnice a hodnota korelačního koeficientu.

Tab. 1 : Absorbance roztoků ACV o klesající koncentraci

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

Obr. 6: Kalibrační přímka ACV při 256nm



Rovnice kalibrační přímky:  $y = a \cdot x + b$

y.....absorbance

x.....koncentrace acikloviru (mg/l)

a.....směrnice kalibrační přímky

b.....absolutní člen

R.....korelační koeficient

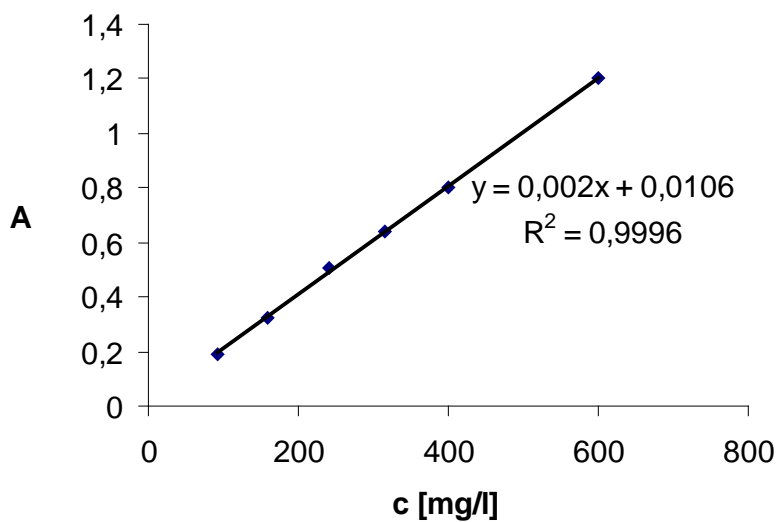
### 5.7. Kalibrační přímka flukonazolu

Kalibrační přímka FLU byla sestrojena pomocí měření řady roztoků FLU při vlnové délce 261nm, tedy v absorpčním maximu roztoku FLU ve fosfát-citrátovém pufru o pH 7,0. Bylo proměřeno 5 roztoků o rostoucí koncentraci FLU. S pomocí získaných absorbancí byla sestrojena kalibrační přímka, vytvořena její rovnice a hodnota korelačního koeficientu.

Tab. 2: Absorbance roztoků FLU o klesající koncentraci

Koncentrace flukonazolu mg/l	A
400	0,78
316,0334	0,625
241,994	0,494
158,8539	0,321
92,8373	0,191

Obr. 7: Kalibrační přímka FLU



Rovnice přímky  $y = 0,0019x + 0,0176$   
 $R^2 = 0,9991$

Rovnice kalibrační přímky:  $y = a \cdot x + b$

y.....absorbance

x.....koncentrace flukonazolu (mg/l)

a.....směrnice kalibrační přímky

b.....absolutní člen

R.....korelační koeficient

## 5.8. Příprava matic

Od každého vzorku s léčivem byly připraveny tři matrice. Vzorek s léčivem byl nahříván v sušárně (na 80°C), aby změkkl. Pomocí kovové kopistky se na analytických vahách odvažovaly matrice na dno scintilačních lahvíček. Matrice měly podobu malých čočkovitých útvarů uprostřed dna scintilační lahvičky. Hmotnost každé matrice byla asi 150mg.

## 5.9. Disoluční test

Matrice byly zality 15g fosfát-citrátového pufru o pH 7. Uzavřené scintilační lahvičky byly termostatovány při 37°C. Ve stanovených intervalech byly odebírány vzorky disoluční tekutiny tak, aby všechen nosič zůstal ve scintilačních lahvičkách. Obsah léčiva byl analyzován spektrofotometricky. V případě ACV při 256 nm, v případě FLU 261nm. Vzorky disoluční tekutiny byly odebírány v čase 3h, 6h, 24h, 48h, 72h a dále po 3 dnech. Měření absorbance bylo prováděno proti liberačnímu médiu. V některých případech bylo třeba vzorky disoluční tekutiny pro měření absorbance ředit. Ředění bylo prováděno objemově liberačním médiem. Vzorky byly odebírány, dokud se neuvolnilo veškeré léčivo, nebo když se léčivo uvolňovat přestalo.

## 5.10. Měření adheze

K měření adhezivních vlastností nosičů bylo použito materiálového zkušebního stroje T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell. Po nastavení požadovaných parametrů byla měřena maximální síla nutná k odtržení testovaných nosičů od substrátu  $F_{max}$ .

Byly nastaveny parametry :

LE (výchozí vzdálenost horní a dolní plochy).....	25mm
Doba kontaktu .....	60s
Jiná rychlost pro odlehčení (rychlost odtržení horní čelisti)....	100mm/min
Rychlost pohybu horní plochy směrem dolů z horní pozice 25mm do pozice 5mm.....	25mm/min
Rychlost pohybu horní plochy směrem dolů od pozice 5mm po kontakt s dolní plochou.....	10mm/min
Zatížení (síla působící horní plochou na dolní).....	5N

Plocha adheze ..... 317,63 mm<sup>2</sup>

Byla hodnocena maximální síla nutná k odtržení obou ploch  $F_{\max}$  [N].

Na horní plochu se v tenkých vrstvách pomocí kovové kopistky nanášel vzorek nosiče, nebo nosiče s léčivem. Na spodní plochu byla nanášena tenká vrstva roztoku mucinu. Od každého vzorku bylo provedeno 5 měření za daných podmínek. Mezi jednotlivými zkouškami se kontaktní plochy čistily acetonem a vodou.

#### Příprava roztoku mucinu

Do kádinky se navážilo předepsané množství mucinu. Mucin se převedl do třenky, kde se homogenizoval s 7,0ml fosfát-citrátovým pufrem o pH 7,0. Krátkodobě byl uchováván uzavřen v kelímku.

Mucin	1,00g
Fosfát-citrátový pufr pH7,0	7,0ml

## 6. Výsledky

### 6.1. Vzhled matric v průběhu disolučního testu

Na začátku disolučního testu byla na dně každé scintilační lahvičky matrice tvaru přisedlé kapky, barvy bílé, případně nažloutlé (8D).

Tab. 3: Vzhled matric tvořených nosičem 0,5D v průběhu disolučního testu

čas	Vzhled matrice 0,5D
6h	po dně lahvičky
24h	laločnatě vybíhá vzhůru do roztoku
2dny	vlasovitě vybíhá vzhůru do roztoku
4dny	po celém dně lahvičky, vlasovitě vybíhá vzhůru
6dnů	po celém dně lahvičky, vlasovitě vybíhá vzhůru
9dnů	desintegrovaná matrice, části oddělené do roztoku

Tab. 4: Vzhled matric tvořených nosičem 1D v průběhu disolučního testu

čas	Vzhled matrice 1D
6h	celistvá, po dně lahvičky
24h	při dně, prostředkem tence vybíhá vzhůru do roztoku
2dny	při dně, prostředkem tence vybíhá vzhůru do roztoku
4dny	rozprostřená po celém dně, silně prostředkem vybíhá vzhůru
6dnů	rozprostřená po celém dně, velmi silně prostředkem vybíhá vzhůru
9dnů	rozprostřená po celém dně, vlasovitě prostředkem vybíhá vzhůru

Tab. 5: Vzhled matric tvořených nosičem 2D v průběhu disolučního testu

čas	Vzhled matrice 2D
6h	drobně laločnatě vybíhající do roztoku
24h	při dně, prostředkem tence vybíhá vzhůru do roztoku
2dny	při dně, prostředkem tence vybíhá vzhůru do roztoku
4dny	mírně zbobtnalá, při dně
6dnů	při dně, zbobtnalá, vybíhá silně vzhůru, část plave na hladině
9dnů	nesouvisle pokrývá dno

Tab. 6: Vzhled matric tvořených nosičem 3D v průběhu disolučního testu

čas	Vzhled matrice 3D
6h	celistvá, při dně
24h	celistvá, při ½ dna lahvičky
2dny	při dně, hojně erodovaná
4dny	zbobtnalá, při dně
6dnů	při dně, zbobtnalá, bradavčitě vybíhá vzhůru
9dnů	při dně, zbobtnalá, bradavčitě vybíhá vzhůru

Tab. 7: Vzhled matric tvořených nosičem 5D v průběhu disolučního testu

čas	Vzhled matrice 5D
6h	celistvá, při dně
24h	celistvá, při dně
2dny	celistvá, změna barvy v nahnědlou
4dny	celistvá při dně, nahnědlá
6dnů	celistvá, po celém dně, nahnědlá
9dnů	celistvá, po celém dně, žlutavá



Tab. 8: Vzhled matric tvořených nosičem 8D v průběhu disolučního testu

čas	Vzhled matrice
6h	velmi desintegrovaná, žluto-hnědá
24h	zbytky matrice v malých částech při dně, většina rozpuštěna
2dny	zbytky matrice v malých částech při dně
4dny	drobné částčky při dně, nebo na stěnách lahvičky
6dnů	drobné částčky při dně, nebo na stěnách lahvičky
9dnů	velmi drobné částčky při dně, nebo na stěnách lahvičky

## 6.2. Adhezivita matric s léčivem a bez léčiva

Tab. 9: Adhezivita oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 20% triethylcitrátu

adhezivum	č.měření	Fmax[N]	Ø F max [N]	s Fmax[N]	F/S [mN/mm <sup>2</sup> ]	s F/S [mN/mm <sup>2</sup> ]
0,5D	1.	29,84	29,67	1,99	93,41	6,27
	2.	33,04				
	3.	28,13				
	4.	28,4				
	5.	28,93				
1D	1.	27,18	27,77	1,93	87,43	6,08
	2.	26,54				
	3.	27,47				
	4.	26,51				
	5.	31,15				
2D	1.	33,33	31,41	1,67	98,89	5,26
	2.	31,38				
	3.	29,67				
	4.	32,81				
	5.	29,85				
3D	1.	31,1	30,66	2,5	96,53	7,87
	2.	31,62				
	3.	28,49				
	4.	34,13				
	5.	27,99				
5D	1.	27,62	26,89	0,63	84,66	1,98
	2.	26,91				
	3.	25,95				
	4.	27,23				
	5.	26,73				
8D	1.	28,27	28,01	1,2	88,19	3,78
	2.	27,54				
	3.	29,93				
	4.	27,53				
	5.	26,77				

Tab. 10: Adhezivita matric tvořených nosičem, plastifikátorem a aciklovirem

adhezivum	č.měření	Fmax[N]	Ø F max [N]	s Fmax[N]	F/S [mN/mm2]	s F/S [mN/mm2]
0,5D+ACV	1.	30,09	29,07	2,31	91,52	7,27
	2.	27,58				
	3.	27				
	4.	28,04				
	5.	32,64				
1D+ACV	1.	30,25	28,13	1,55	88,56	4,91
	2.	26,79				
	3.	27,88				
	4.	26,62				
	5.	29,1				
2D+ACV	1.	28,24	29,64	1,25	93,31	3,94
	2.	28,77				
	3.	31,47				
	4.	29,68				
	5.	30,05				
3D+ACV	1.	34,12	31,42	2,16	98,92	6,8
	2.	30,41				
	3.	31,4				
	4.	32,72				
	5.	28,47				
5D+ACV	1.	28,92	28,08	0,78	88,41	2,46
	2.	28,86				
	3.	27,7				
	4.	27,14				
	5.	27,79				
8D+ACV	1.	27,44	27,23	0,5	85,73	1,57
	2.	27,77				
	3.	27,2				
	4.	26,43				
	5.	27,29				

### 6.3. Liberace léčiv

Tab. 11: Liberace FLU z nosiče 3D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]	[%]		
3 hod	0,081	1	0,501	8,21	9,99	9,99
	0,103	1	0,674	10,91		
	0,100	1	0,651	10,84		
6 hod	0,096	1	0,619	10,15	10,04	20,02
	0,089	1	0,564	9,12		
	0,100	1	0,651	10,84		
24 hod	0,422	1	3,193	52,34	44,38	64,40
	0,319	1	2,379	38,50		
	0,339	1	2,537	42,29		
48 hod	0,238	1	1,740	28,52	27,76	92,16
	0,245	1	1,795	29,05		
	0,213	1	1,543	25,71		
3 dny	0,086	1	0,540	8,85	7,98	100,14
	0,055	1	0,295	4,78		
	0,096	1	0,619	10,32		

Tab. 12: Liberace FLU z nosiče 5D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]	[%]		
3 hod	0,278	1	2,056	33,64	33,24	33,24
	0,270	1	1,993	32,37		
	0,282	1	2,087	33,71		
6 hod	0,146	1	1,014	16,59	16,90	50,14
	0,157	1	1,101	17,88		
	0,145	1	1,006	16,24		
24 hod	0,379	1	2,853	46,68	45,05	95,19
	0,373	1	2,806	45,58		
	0,354	1	2,656	42,89		
48 hod	0,169	1	1,195	19,56	19,26	114,45
	0,186	1	1,329	21,60		
	0,148	1	1,029	16,63		

Tab. 13: Liberace FLU z nosiče 8D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
3 hod	0,403	1	3,043	50,01	53,02	53,02
	0,453	1	3,437	56,42		
	0,433	1	3,279	52,62		
6 hod	0,278	1	2,056	33,79	32,04	85,05
	0,284	1	2,103	34,52		
	0,237	1	1,732	27,79		
24 hod	0,153	1	1,069	17,57	15,41	100,47
	0,124	1	0,840	13,79		
	0,135	1	0,927	14,87		
48 hod	0,123	1	0,832	13,68	12,24	112,71
	0,109	1	0,722	11,84		
	0,106	1	0,698	11,20		

Tab. 14: Liberace ACV z nosiče 0,5D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
3 hod	0,916	10	2,220	36,87	30,90	30,90
	0,689	10	1,667	27,72		
	0,700	10	1,694	28,11		
6 hod	0,569	10	1,375	22,83	22,66	53,57
	0,546	10	1,319	21,93		
	0,579	10	1,399	23,22		
24 hod	0,919	10	2,227	36,99	37,76	91,32
	0,961	10	2,329	38,74		
	0,933	10	2,261	37,53		
48 hod	0,524	2	0,253	4,20	4,25	95,57
	0,569	2	0,275	4,57		
	0,497	2	0,240	3,98		
3 dny	0,167	1	0,040	0,66	0,65	96,22
	0,159	1	0,038	0,63		
	0,166	1	0,039	0,65		

Tab. 15: Liberace ACV z nosiče 1D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]	[%]		
3 hod	0,765	5	0,926	15,42	14,05	14,05
	0,707	5	0,855	13,95		
	0,650	5	0,786	12,77		
6 hod	0,735	2	0,356	5,93	4,25	18,30
	0,560	2	0,271	4,41		
	0,309	2	0,148	2,41		
24 hod	0,942	10	2,283	38,02	35,23	53,53
	0,839	10	2,032	33,14		
	0,877	10	2,125	34,54		
48 hod	0,305	10	0,732	12,19	12,06	65,59
	0,423	10	1,019	16,62		
	0,191	10	0,454	7,38		
3 dny	0,721	3	0,523	8,72	8,91	74,50
	0,764	3	0,555	9,05		
	0,759	3	0,551	8,96		
6 dnů	0,874	3	0,635	10,58	10,55	85,06
	0,817	3	0,594	9,68		
	0,965	3	0,702	11,41		
9 dnů	0,740	2	0,358	5,97	6,07	91,13
	0,768	2	0,372	6,06		
	0,785	2	0,380	6,18		
13 dnů	0,621	2	0,300	5,00	4,87	95,99
	0,611	2	0,295	4,82		
	0,608	2	0,294	4,78		
16 dnů	0,359	1	0,086	1,44	1,50	97,49
	0,397	1	0,096	1,56		
	0,381	1	0,092	1,49		
21 dnů	0,308	1	0,074	1,23	1,06	98,55
	0,243	1	0,058	0,95		
	0,260	1	0,062	1,01		
27 dnů	0,185	1	0,044	0,73	0,61	99,16
	0,102	1	0,024	0,39		
	0,187	1	0,044	0,72		
34 dnů	0,066	1	0,015	0,25	0,33	99,50
	0,123	1	0,029	0,47		
	0,076	1	0,017	0,28		

Tab. 16: Liberace ACV z nosiče 2D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
3 hod	0,632	10	1,528	25,25	23,26	23,26
	0,538	10	1,299	21,48		
	0,578	10	1,397	23,06		
6 hod	0,419	10	1,009	16,68	15,07	38,33
	0,333	10	0,800	13,23		
	0,385	10	0,927	15,30		
24 hod	0,534	10	1,289	21,30	23,59	61,92
	0,648	10	1,567	25,91		
	0,590	10	1,426	23,54		
48 hod	0,995	1	0,241	3,99	2,83	64,75
	0,856	1	0,207	3,43		
	0,275	1	0,066	1,09		
3 dny	0,300	10	0,720	11,89	7,52	72,27
	0,170	10	0,403	6,66		
	0,104	10	0,242	4,00		
6 dnů	0,691	2	0,334	5,52	6,79	79,06
	0,737	3	0,535	8,85		
	0,750	2	0,363	6,00		
9 dnů	0,875	1	0,212	3,50	3,91	82,97
	0,543	2	0,262	4,34		
	0,974	1	0,236	3,90		
13 dnů	0,700	2	0,339	5,60	5,41	88,38
	0,649	2	0,314	5,19		
	0,680	2	0,329	5,43		
16 dnů	0,211	2	0,101	1,66	4,53	92,91
	0,775	2	0,375	6,20		
	0,717	2	0,347	5,73		
21 dnů	0,509	1	0,123	2,03	3,44	96,35
	0,648	1	0,157	2,59		
	0,713	2	0,345	5,70		
27 dnů	0,127	2	0,060	0,99	2,07	98,42
	0,294	2	0,141	2,33		
	0,364	2	0,175	2,89		
34 dnů	0,166	1	0,039	0,65	0,53	99,51
	0,130	1	0,031	0,51		
	0,110	1	0,026	0,42		

Tab. 17: Liberace ACV z nosiče 3D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
3 hod	0,845	1	0,205	3,34	3,15	3,15
	0,714	1	0,173	2,82		
	0,816	1	0,198	3,29		
6 hod	0,215	5	0,256	4,18	4,17	7,32
	0,198	5	0,236	3,85		
	0,225	5	0,268	4,47		
24 hod	0,360	5	0,433	7,06	6,49	13,81
	0,305	5	0,366	5,98		
	0,321	5	0,385	6,42		
48 hod	0,992	1	0,240	3,92	3,96	17,77
	0,559	2	0,270	4,42		
	0,875	1	0,212	3,53		
3 dny	0,647	1	0,156	2,55	3,13	20,89
	0,517	2	0,250	4,08		
	0,682	1	0,165	2,75		
6 dnů	0,390	10	0,939	15,31	12,69	33,59
	0,265	10	0,634	10,37		
	0,310	10	0,744	12,40		
9 dnů	0,413	10	0,995	16,22	14,49	48,07
	0,412	10	0,992	16,22		
	0,276	10	0,661	11,02		
13 dnů	0,235	10	0,561	9,15	14,67	62,74
	0,394	10	0,948	15,51		
	0,481	10	1,160	19,34		
16 dnů	0,281	10	0,673	10,98	13,36	76,10
	0,280	10	0,671	10,97		
	0,451	10	1,087	18,12		
21 dnů	0,341	10	0,819	13,36	14,57	90,67
	0,323	10	0,776	12,68		
	0,440	10	1,060	17,67		
27 dnů	0,466	1	0,112	1,83	1,75	100,57
	0,549	1	0,133	2,17		
	0,312	1	0,075	1,25		



Tab. 18: Liberace ACV z nosiče 5D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
3 hod	0,878	10	2,127	35,03	33,89	33,89
	0,820	10	1,986	32,70		
	0,846	10	2,049	33,95		
6 hod	0,891	10	2,159	35,55	35,69	69,58
	0,923	10	2,237	36,83		
	0,864	10	2,093	34,67		
24 hod	0,617	10	1,491	24,56	27,42	97,01
	0,756	10	1,830	30,14		
	0,688	10	1,664	27,57		
48 hod	0,522	2	0,252	4,15	4,72	101,73
	0,633	2	0,306	5,04		
	0,622	2	0,301	4,98		
3 dny	0,361	1	0,087	1,43	2,27	104,00
	0,798	1	0,193	3,18		
	0,546	1	0,132	2,18		
6 dnů	0,472	1	0,114	1,87	1,95	105,95
	0,297	1	0,071	1,17		
	0,700	1	0,169	2,81		
9 dnů	0,511	1	0,123	2,03	2,24	108,19
	0,318	1	0,076	1,26		
	0,431	2	0,208	3,44		
13 dnů	0,130	1	0,031	0,50	0,30	108,49
	0,053	1	0,012	0,19		
	0,054	1	0,012	0,20		

Tab. 19: Liberace ACV z nosiče 8D plastifikovaného 20% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
3 hod	0,720	15	2,613	43,01	43,84	43,84
	0,763	15	2,770	46,17		
	0,712	15	2,584	42,34		
6 hod	0,926	10	2,244	36,93	39,23	83,07
	0,997	10	2,417	40,28		
	1,019	10	2,470	40,47		
24 hod	0,313	10	0,751	12,36	11,90	94,97
	0,311	10	0,746	12,44		
	0,278	10	0,666	10,91		
48 hod	0,150	1	0,035	0,58	0,70	95,67
	0,235	1	0,056	0,94		
	0,147	1	0,035	0,57		
3 dny	0,073	1	0,017	0,27	0,28	95,95
	0,081	1	0,019	0,31		
	0,071	1	0,016	0,27		

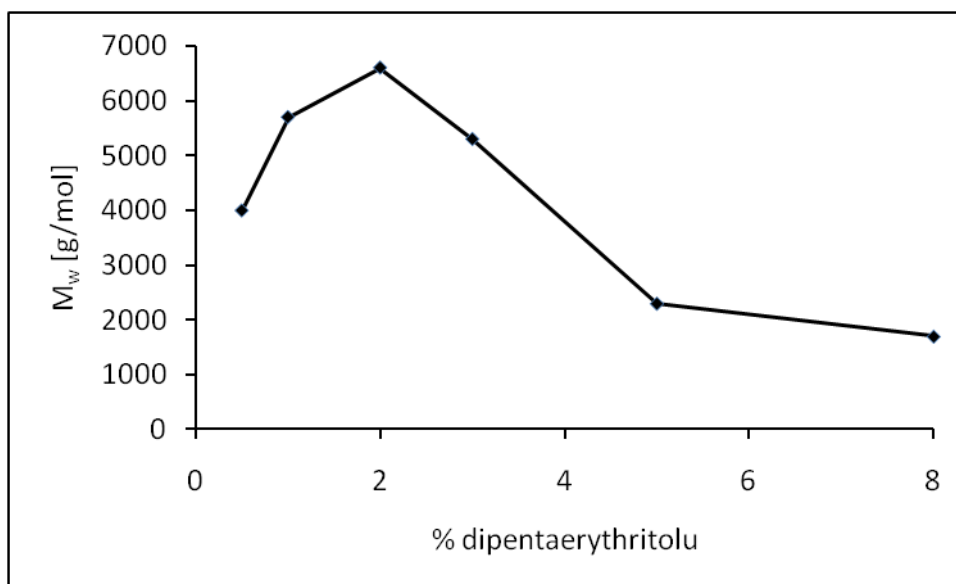
## 7. Diskuse

### 7.1. Charakteristika oligoesterů větvených dipentaerythritolem

V předložené diplomové práci byly testovány oligoestery kyseliny mléčné a glykolové větvené dipentaerythritolem a plastifikované 20 % trietylcitrátu. Tyto sloučeniny byly syntetizovány polykondenzační reakcí na katedře farmaceutické technologie FaF UK ve dvou etapách. Při syntéze byla v reakční směsi použita různá koncentrace dipentaerythritolu, protože u dipentaerythritolu bylo možno při stejné reaktivitě všech hydroxylů předpokládat přímou závislost mezi jeho podílem v reakční směsi a stupněm větvení nosičů.

Nejprve bylo v reakční směsi použito 3 %, 5 % nebo 8 % dipentaerythritolu ve funkci větvicí složky. Analýza těchto látek ukázala, že zvolené koncentrace větvicí složky vedou k nosičům s nízkou molární hmotností. Čím vyšší byla koncentrace větvicí složky v reakční směsi, tím nižší byla molární hmotnost nosiče.<sup>52</sup> Proto se při další syntéze použilo v reakční směsi pouze 0,5 %, 1 % nebo 2 % dipentaerythritolu s cílem získat nosiče s vyšší molární hmotnosti. Analýzou nově syntetizovaných nosičů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací dipentaerythritolu v řadě 0,5 % → 1 % → 2 % molární hmotnost a stupeň větvení rostou.<sup>53</sup> Závislost molární hmotnosti oligoesterů  $M_w$  na koncentraci větvicí složky v reakční směsi uvádí Obr.8. Stupeň větvení oligoesterů 3D, 5D a 8D byl stanoven jako poměr  $M_{w(SEC)}/M_w$ , přičemž nižší hodnota znamená vyšší stupeň větvení. Lineární PLGA má  $M_{w(SEC)}/M_w = 1,5$ . Při analýze oligoesterů 0,5D, 1D a 2D byl stupeň větvení vyjádřen jako větvicí poměr  $g' = (\eta_{br} / \eta_{lin})$ , stanovený z vnitřní viskozity lineárního (lin) a větveného (br) polymeru při shodné molární hmotnosti. Opět nižší hodnota znamená vyšší stupeň větvení, ale lineární PLGA má  $g'=1,0$ . Charakteristiky oligoesterů větvených dipentaerythritolem uvádí tabulka 20.

Obr.8: Vliv koncentrace větvicí složky v reakční směsi na molární hmotnost  $M_w$  oligoesterů<sup>52,53</sup>



Tab.20: Molární hmotnost a stupeň větvení oligoesterových nosičů

Označení nosiče	$M_n$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	$g'$	$M_{w(SEC)}/M_w$
0,5D	2200	4000	0,70	-
1D	2500	5700	0,58	-
2D	4300	6600	0,52	-
3D	3 600	5 300	-	1,19
5D	1 900	2 300	-	1,04
8D	1 400	1 700	-	0,94

$M_n$  [g/mol] je číselně střední molární hmotnost

$M_w$  [g/mol] je hmotnostně střední molární hmotnost

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

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

## **7.2. Vzhled matic v průběhu disolučního testu**

S maticemi složenými z nosiče (oligoester kyseliny mléčné a glykolové, větvený dipentaerythritolem), plastifikátoru (20 % triethylcitrátu) a léčiva (aciklovir nebo flukonazol) byl proveden statický disoluční test při 37°C za použití fosfátcitrátového pufru pH 7,0 jako disolučního média. Na začátku disolučního testu byla matrice čočkovitého tvaru o hmotnosti 150,0 mg přisedlá na dně scintilační lahvičky, barvy bílé, případně nažloutlé (8D).

Větvené oligoestery alifatických hydroxykyselin erodují již v počátečním stádiu působením vodního média. Předpokládá se eroze tělísek při zachování jejich integrity. S rostoucím stupněm větvení klesá stupeň bobtnání nosičů. V tabulkách 4-9 je popis vzhledu matic během disolučního testu.

Matrice 0,5D se zpočátku testu rozprostřela po dně scintilační lahvičky, po 24h začala vybíhat vzhůru do liberačního media a na konci testu se desintegrovala, v průběhu testu málo zbobtnala. Matrice 1D se rozprostřela po dně lahvičky, začala vlasovitě vybíhat do liberačního média, později vybíhala vzhůru do média silným sloupcem uprostřed lahvičky. Matrice 1D mírně bobtnala (o něco více, než 0,5D), po celou dobu byla celistvá. Matrice 2D hned z počátku testu vlasovitě vybíhala do liberačního media, vlasovité částičky pak sesedli zpět ke dnu a dále se celá matrice zvedala silně prostředkem vzhůru, velmi zbobtnala. Matrice 3D po celou dobu testu zůstala při dně lahvičky. Postupně povrch matrice erodoval až začal bradavčitě vybíhat vzhůru. Matrice 3D během testu velmi bobtnala. Matrice 5D po celou dobu testu zůstala při dně lahvičky, povrch zůstal neerodovaný, zcela celistvý, nezbobtnaný. Druhý den se barva změnila ze žlutavé na nahnědlou. Matrice 8D se desintegrovala a rychle rozpustila. Na konci testu zůstali jen drobné nahnědlé částičky při dně.

Tab.21: Vzhled matric v průběhu disolučního testu

matrice	bobtnání	vzestup do media	desintegrace
0,5D	velmi málo	značně	velmi
1D	mírně	značně	ne
2D	ano	značně	ne
3D	ano	slabě	ne
5D	ne	ne	ne
8D	ne	ne	velmi

### **7.3. Adhezivní vlastnosti oligoesterů větvených dipentaerythritolem**

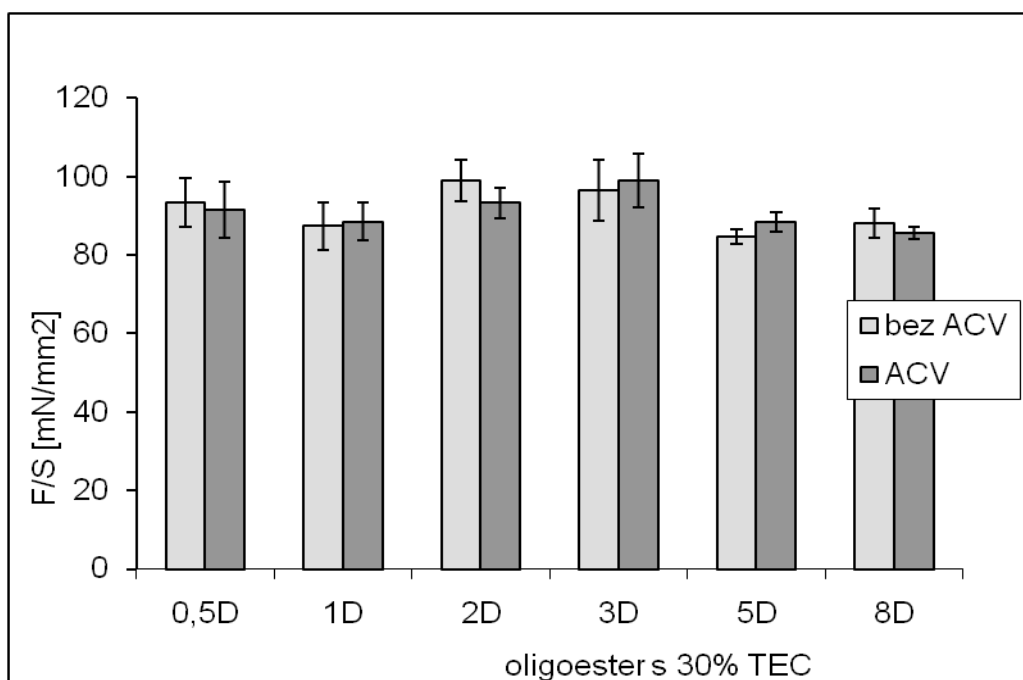
Byla měřena síla  $F_{max}$ , potřebná k odtržení vzorku od podkladu, jako míra adhezivních vlastností oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 20% triethylcitrátu (Tab.9) a stejných soustav s obsahem 4% acikloviru (Tab.10). Testy adheze byly realizovány při kontaktní době 60 s, kontaktní síle 5 N a rychlosti odtržení vzorku od podkladu 100 mm/min. Jako modelový podklad byl použit hydratovaný mucin z prasečích žaludků. Z pěti naměřených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Síla v Newtonech byla přepočtena na velikost adhezivní plochy a vyjádřena jako F/S v jednotkách mN/mm<sup>2</sup>.

Adhezi viskózních soustav k substrátu vysvětluje teorie smáčení. Podle této teorie jsou adhezivní vlastnosti materiálu dány schopností rozprostřít se po substrátu a vytvořit s ním těsný kontakt. Adhezivní vlastnosti viskózních soustav jsou tedy ovlivněny dynamickou viskozitou. Významný vliv na dynamickou viskozitu má stupeň plastifikace oligoesteru. Přídavkem plastifikátoru dojde ke zlepšení zpracovatelnosti, protože se významně sníží viskozita polymerní soustavy, a tím se zároveň umožní aplikace polymerního systému s inkorporovaným léčivem.<sup>54</sup> Plastifikátor jako složka polymerního systému není jednoznačně definován. Běžně používaným plastifikátorem polymerů je triethylcitrát, použitý v 20% koncentraci v této práci. Jeho výhodou je neškodnost prokovaná dlouhodobým používáním a vysoká účinnost při snižování teploty

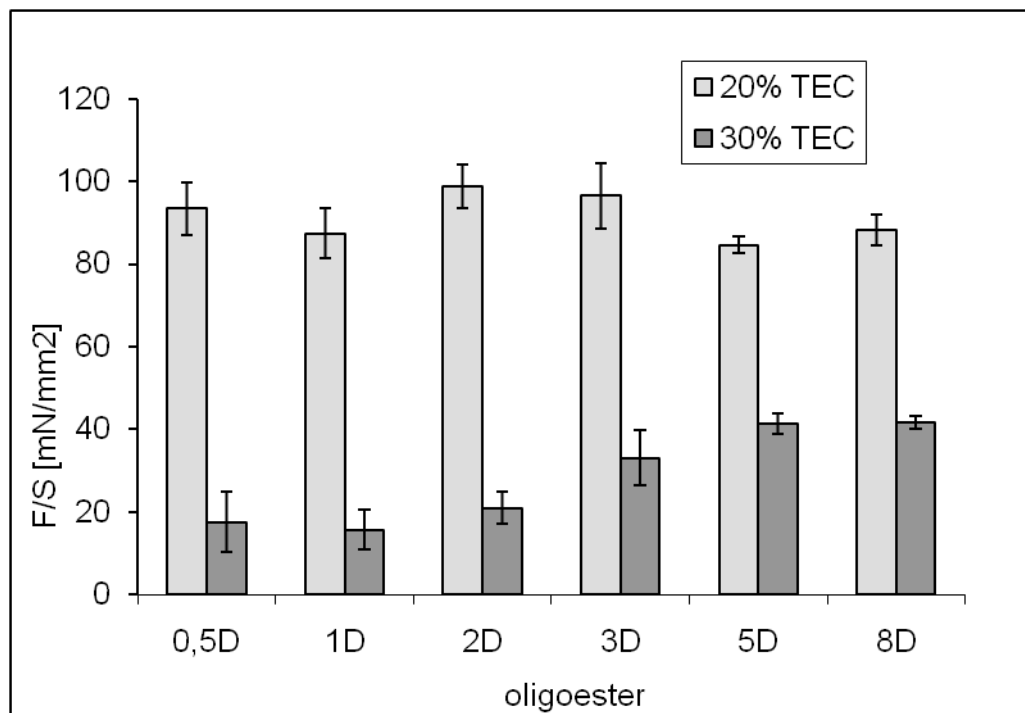
skelného přechodu alifatických polyesterů. Triethylcitrát je mísitelný s většinou polyesterových nosičů a může být použit téměř bez omezení.<sup>55</sup>

Adhezivní testy při použití mucinu z prasečích žaludků jako modelového podkladu ukázaly, že všechny studované oligoestery měly dostatečné adhezivní vlastnosti. Hodnoty adhezivní síly vztažené ke kontaktní ploše byly v rozmezí 85 až 100 mN/mm<sup>2</sup>. Na Obr. 9 je porovnána adhezivita plastifikovaných oligoesterů a adhezivita plastifikovaných oligoesterů obsahujících 4 % acikloviru. Z grafu vyplývá, že přítomnost léčiva v matici nemá na hodnotu adhezivní síly významný vliv. Vliv koncentrace TEC na adhezivitu oligoesterů větvených dipentaerythritolem je patrný z Obr.10. Při použití 20% TEC jako plastifikátoru oligoesterů větvených dipentaerythritolem je adhezivní síla několika násobně vyšší než při použití 30% TEC.<sup>2</sup>

Obr. 9: Adhezivita oligoesterů větvených dipentaerythritolem



Obr. 10: Porovnání adhezivity oligoesterů větvených dipentaerythritolem při koncentraci triethylcitrátu 20% a 30% <sup>2</sup>





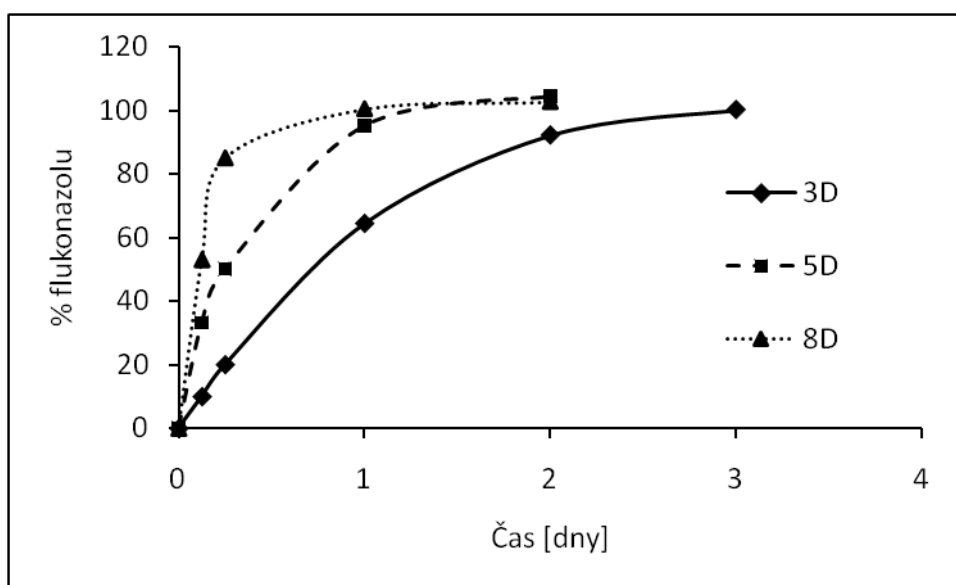
#### 7.4. Liberace léčiv z oligoesterů větvených dipentaerythritolem

Byla studována liberace acikloviru a flukonazolu z oligoesterů větvených dipentaerythritolem a plastifikovaných 20 % triethylcitrátu. Klíčovou úlohu při liberaci léčivých látek z oligoestrových nosičů má průběh jejich bobtnání a eroze. Větvené oligoestery alifatických hydroxykyselin mají relativně nízký stupeň bobtnání. Předpokládá se, liberace léčiv se realizuje erozí a rozpouštěním matricového systému.

Při disoluci flukonazolu z nosičů 0,5D, 1D a 2D se v disoluční tekutině odebrané v časovém intervalu 6 hodin od počátku liberace objevil neodstranitelný zákal. Byly naměřeny vysoké hodnoty absorbance, které po výpočtu kumulativních procent uvolněného flukonazolu vedly až k trojnásobným hodnotám.

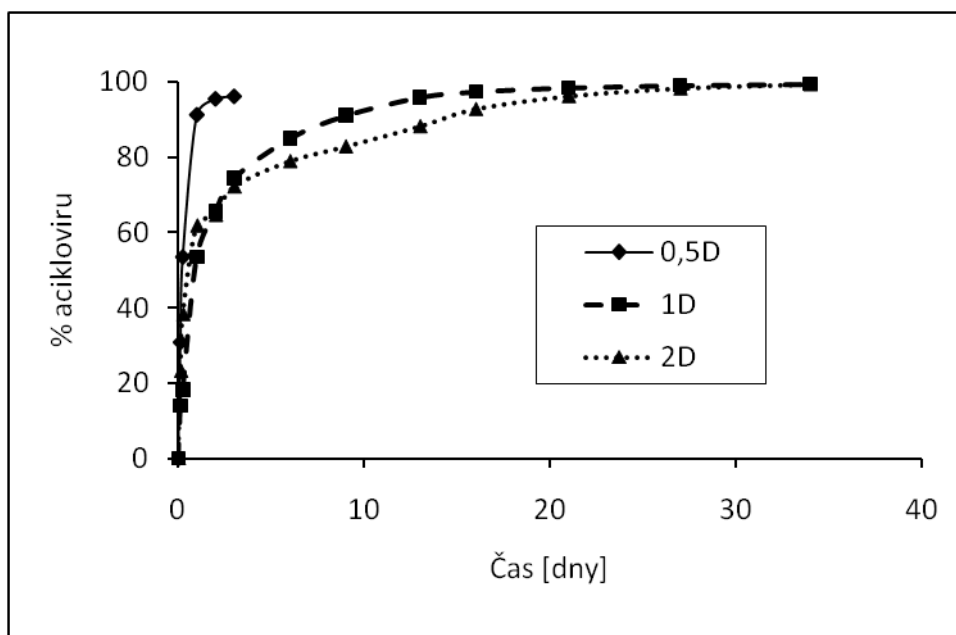
Na obrázku 11 je porovnán průběh liberace flukonazolu z oligoesterů 3D, 5D a 8D. Z nosiče 8D se flukonazol uvolnil velice rychle, během šesti hodin se uvolnilo 85 % léčiva a celková doba liberace byla 1 den. Průběh liberace z nosiče 5D byl pomalejší, ale celková doba liberace byla rovněž 24 hod. Nejpomaleji se uvolňoval flukonazol z nosiče 3D, za 24 hod. se uvolnilo 65% léčiva, celková doba liberace byla 3 dny. S klesající molární hmotností  $M_w$  a rostoucím stupněm větvení oligoesterů v řadě 3D→5D→8D (Tab.20) roste rychlost liberace flukonazolu.

Obr.11: Liberace flukonazolu z nosičů větvených dipenaerythritolem



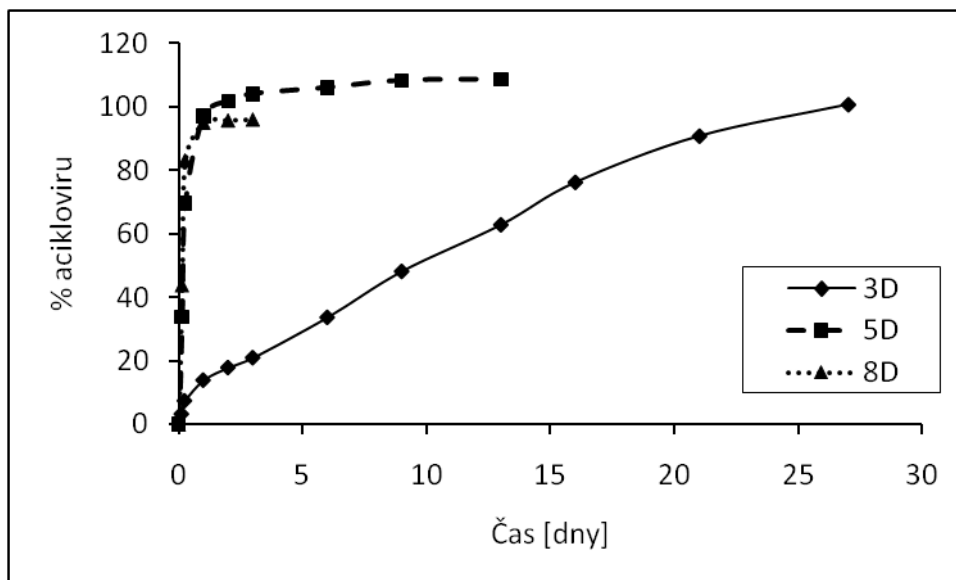
Liberace acikloviru z oligoesterů větvených nízkou koncentrací dipentaerythritolu a plastifikovaných 20 % dipentaerythritolu byla nejrychlejší u nosiče 0,5D. Za 24 hodin se uvolnilo přes 90 % léčiva. Z nosičů 1D a 2D se aciklovir uvolňoval pomaleji, průběh byl prakticky stejný. Jednodenní burst byl 50 % resp. 60 %, za 3 dny se uvolnilo přes 70 % inkorporovaného léčiva, poté došlo k výraznému zpomalení liberace, zejména u nosiče 2D. Celková doba liberace byla 21 dnů. S klesající molární hmotností  $M_w$  oligoesterů a klesajícím stupněm větvení oligoesterů v řadě 2D→1D→0,5D (Tab.20) roste rychlost liberace acikloviru.

Obr.12: Liberace acikloviru z nosičů větvených nízkou koncentrací dipentaerythritolu

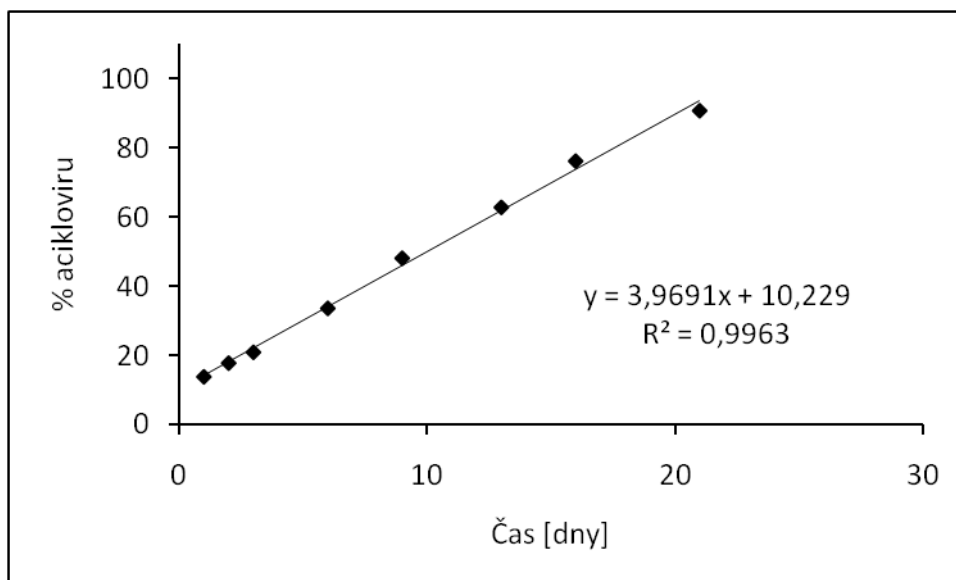


Oligoestery syntetizované z reakční směsi, ve které byla použita relativně vysoká koncentrace dipentaerythritolu, a to 5 % nebo 8 %, mají velmi nízkou molární hmotnost  $M_w$  (2300 g/mol resp. 1700 g/mol). Aciklovir se uvolnil během 24 hodin (Obr. 13). Výhodný průběh liberace acikloviru byl zaznamenán u oligoesteru 3D s  $M_w = 5300$  g/mol a relativně nízkým stupněm větvení. Jednodenní burst byl jen 14 %, v časovém intervalu 1 den až 21 dnů probíhala liberace kinetikou 0. řádu (Obr. 14) a uvolnilo se veškeré množství léčiva inkorporovaného v matrici.

Obr. 13: Liberace acikloviru z nosičů větvených vysokou koncentrací dipentaerythritolu



Obr. 14: Lineární fáze liberace acikloviru z oligoesteru 3D plastifikovaného 20 % dipentaerythritolu



## 8. Závěry

1. V práci testovné oligoestery kyseliny mléčné a glykolové větvené dipentaerythritolem a plastifikované 20 % triethylcitrátu byly syntetizovány polykondenzační reakcí na katedře farmaceutické technologie FaF UK. Při syntéze byla v reakční směsi použita různá koncentrace dipentaerythritolu. S rostoucí koncentrací dipentaerythritolu od 3% do 5% molární hmotnost nosiče klesala. Při použití pouze 0,5 %, 1 % nebo 2 % dipentaerythritolu molární hmotnost a stupeň větvení rostly.

2. Matrice 2D, 3D během disolučního testu bobtnaly, matrice 0,5D a 1D bobtnaly nevýznamně. Matrice 0,5D, 1D, 2D, 3D během testu nezůstaly při dně, ale bradavčitě, laločnatě, nebo vlasovitě vybíhaly vzhůru do liberačního media. Matrice 0,5D a 8D se během testu desintegrovaly, ostatní matrice zůstaly celistvé.

3. Adhezivní testy při použití mucinu z prasečích žaludků jako modelového podkladu ukázaly, že všechny studované oligoestery měly dostatečné adhezivní vlastnosti. Hodnoty adhezivní síly vztažené ke kontaktní ploše byly v rozmezí 85 až 100 mN/mm<sup>2</sup>. Přítomnost léčiva v matrici nemá na hodnotu adhezivní síly významný vliv. Při použití 20% TEC jako plastifikátoru oligoesterů větvených dipentaerythritolem je adhezivní síla několika násobně vyšší než při použití 30% TEC.

4. Při disoluci flukonazolu z nosičů 0,5D, 1D a 2D se v disoluční tekutině odebrané v časovém intervalu 6 hodin od počátku liberace objevil neodstranitelný zákal. Byly naměřeny vysoké hodnoty absorbance, které po výpočtu kumulativních procent uvolněného flukonazolu vedly až k trojnásobným hodnotám.

5. Výhodný průběh liberace acikloviru byl zaznamenán u oligoesteru 3D s  $M_w = 5300$  g/mol a relativně nízkým stupněm větvení. Jednodenní burst byl jen 14 %, v časovém intervalu 1 den až 21 dnů probíhala liberace kinetikou 0. řádu.

## 9. Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo studium disolučních a liberačních charakteristik oligoesterových nosičů kyseliny D, L mléčné a kyseliny glykolové. Teoretická část popisuje biomateriály a bioadhezivitu. Oligoesterové nosiče větvené dipentaerytritolem byly plastifikovány 20% triethylcitrátu. Adhezivní vlastnosti byly měřeny na materiálovém testovacím stroji Zwick/Roel T1-FR050TH.A1. Studována byla maximální síla nutná k odtržení vzorku od substrátu. Jako substrát byl zvolen roztok mucinu. Všechny studované oligoestery měly dostatečné adhezivní vlastnosti, přítomnost léčiva neměla významný vliv. Byl studován průběh liberace léčiv acikloviru a flukonazolu z plastifikovaných nosičů. Liberace probíhala za teploty 37°C, do fosfát-citrátového pufru. Obsah léčiva v liberačním mediu se hodnotil spektrofotometricky. S klesající molární hmotností  $M_w$  rostla rychlost liberace obou léčiv. Výhodné vlastnosti prokázal oligoester 3D, který uvolňoval aciklovir 21 dní kinetikou 0. řádu.

## 10. Abstract

The aim of this work was to study dissolution and adhesive characteristics of branched lactic and glycolic acid oligoesters. The theoretical part describes biomaterials and bioadhesion. Dipentaerythritol branched oligoester carriers were plastified 20% triethylcitrate. Adhesive properties were measured by material testing machine Zwick/Roel T1-FR050TH.A1K. The maximum force ( $F_{max}$ ), required to detach the polymer carrier from substrate, was measured for studying this material. Solution of mucin was used as a substrate for adhesion. All studied oligoesters had sufficient adhesive properties. There was not any significant influence of incorporated drug. Acyclovir and fluconazole release from plastified carriers was tested. Liberation was tested at 37°C to the phosphate-citrate medium. Concentration of drug in medium was measured by spectrophotometer. There was an increase of drug liberation caused by decreasing of molar weight  $M_w$ . Oligoester 3D shown advantageous properties, it liberated acyclovir for 21 days with zeroth order kinetics.

## 11. Seznam použité literatury

---

1. Jiráková, I.: Vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných 20% triethylcitrátu, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009, 57.
2. Dvořáková, L.: Adhezivní vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných triethylcitrátem a studium liberace léčiv z těchto nosičů, Rigorózní práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010, 71.
3. Nair, L., S., Laurencin, C., T.: Biodegradable polymers as biomaterials; *Prog. Polym. Sci.*, 2007, 32, 762–798.
4. Lloyd, A., W.: Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility; *Med. Dev. Tech.*, 2002, 13, 18–21.
5. Winzenburga, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Kissel, T.: Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery system; *Adv. Drug Del. Rev.* 2004, 56, 1453–1466.
6. Li, S.: Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids; *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, 48, 342–53.
7. Gautier, E., Fuertes, P., Cassagnau, P.: Synthesis and rheology of biodegradable Poly(glykolic acid) prepared by melt ring-opening polymerization of glycolide; *J. Polym. Sci.*, 2009, 47, 1440–1449.
8. Farng, E., Herman, O.: Meniscal repair devices: a clinical and biomechanical literature review; *J. Arthrosc. Relat. Surg.*, 2004, 20, 273–86.
9. Lofgren, A., Albertsson, A., C., Dubios, P., Herome, R.: Recent advances in ring opening polymerization of lactones and related compounds; *J. Polym. Sci.*, 1995, 35, 379–418.
10. Tormala, P.: Biodegradable self-reinforced composite materials: Manufacturing structure and mechanical properties; *Clin. Mater.*, 1992, 10, 29–34.
11. Maurus, P., B., Kaeding, C., C.: Bioabsorbable implant material review; *Oper. Tech. Sport. Med.*, 2004, 12, 158–160.

- 
12. Zilberman, M., Nelson, K., D., Eberhart, R., C.: Mechanical properties and in vitro degradation of bioresorbable fibers and expandable fiber-based stents; *J. Biomed. Mater. Res. B.* 2005, 74, 792–799.
  13. Middleton, J., C., Tipton, A., J.: Synthetic biodegradable polymers as medical device; *Biomaterials*, 1998, 5, 30-39.
  14. Prior, T., D., Grace, D.,L., MacLean, J., B., Allen ,P., W., Chapman, P., G., Day, A.: Correction of hallux abductus valgus by Mitchell’s metatarsal osteotomy: comparing standard fixation methods with absorbable polydioxanone pins; *Foot*, 1997, 7, 121–125.
  15. Hug, K., H., Cho, Y., W., Park, K.: PLGA-PEG Block copolymers for drug formulations; *Drug Del. Tech.*, 2003, 3, 156-163.
  16. Han, X., Pan, J.: A model for simultaneous crystallisation and biodegradation of biodegradable polymers; *Biomaterials*, 2009, 30, 423–430.
  17. Vert, M., Mauduit, J., Li, S.: Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity; *Biomaterials*, 1994, 15, 1209-1213.
  18. De Jong, W., H., Bergsma, E., Robinson, J.: Tissue response to partially in vitro predegraded, poly-L-lactide implants; *Biomaterials*, 2005, 26, 1781–1791.
  19. Chen, Ch., Chueh, J., Tseng, H., Juany, H., Lee, S.: Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends; *Biomaterials*, 2003, 24,1167–1173.
  20. Sinha, V., R., Bansal, K., Kaushik, K., Kumria, R., Trehan, A.: Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres; *Int. J. Pharm.*, 2004, 278, 1–23.
  21. Pouton, C., W., Akhtar, S.: Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery; *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 1996, 18, 133–162.
  22. Saad, B., Hirt, T., D., Welti, M., Uhlscgmid, G., K., Neuenschwander, P., Suter, U., W.: Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: in vitro and in vivo evaluations; *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, 36, 65–74.
  23. Heller, J., Barr, J., Ng, S., Y., Abdellauoi, K., S., Gurny, R.: Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses; *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2002, 54, 1015–39.
  24. Leong, K., W., Brott, B., C., Langer, R.: Biodegradable polyanhydrides as drug carrier matrices. Characterization, degradation and release characteristics; *J. Biomed. Mater. Res.*, 1985, 19, 941–55.

- 
25. Vin, F., Teot, L., Measume, S.: The healing properties of Promogran in venous leg ulcers; *J. Wound Care*, 2002, 11, 335–7.
  26. Gruessner, U., Clemens, M., Pahlplatz, P., V., Sperling, P., Witte, J. et al.: Improvement of perineal wound healing by local administration of gentamicin-impregnated collagen fleeces after abdominoperineal excision of rectal cancer; *Am. J. Surg.*, 2001, 182, 502–509.
  27. Kishida, A., Murakami, K., Goto, H., Akashi, M., Kubota, H., Endo, T.: Polymer drugs and polymeric drugs X: slow release of 5-fluorouracil from biodegradable poly(g-glutamic acid) and its benzyl ester matrixes; *J. Bioact. Compaq. Polym.*, 1998, 13, 270–278.
  28. Mithieux, S., M., Rasko, J., E., J., Weiss, A., S.: Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of selforganized human protein monomers; *Biomaterials*, 2004, 25, 4921–4927.
  29. Nath, N., Chilkoti, A.: Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance; *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 8197–8202.
  30. Chuang, V., T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M.: Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin; *Pharm. Res.*, 2002, 19, 569–77.
  31. Soon, A., S., Stabenfeldt, S., E., Brown, W., E.: Engineering fibrin matrices: The engagement of polymerization pockets through fibrin knob technology for the delivery and retention of therapeutic proteins; *Biomaterials*, 31, 2009, 1944-1954.
  32. Kosir, M., A., Quinn, C., C., V., Wang, W., Tromp, G.: Matrix glycosaminoglycans in the growth phase of Fibroblasts: more of the story in wound healing; *J. Surg. Res.*, 2000, 92, 45–52.
  33. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Chondroitin\\_sulfat](http://cs.wikipedia.org/wiki/Chondroitin_sulfat) (12.2.2010)
  34. Gilbert, M., E., Kirker, K., R., Gray, S., D., Ward, P., D., Szakacs, J., G., Prestwich, G., D., et al.: Chondroitin sulfate hydrogel and wound healing in rabbit maxillary sinus mucosa.; *Laryngoskope*, 2004, 114, 406–9.
  35. Abraham, D., J.: Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review; *J. Control. Release.*, 2006, 114, 1–14.
  36. [www.informaworld.com/smpp/content](http://www.informaworld.com/smpp/content) (8.3.2010)
  37. Duchene, D., Ponchel, G.: Principle and investigation of the bioadhesion mechanism of solid dosage forms; *Biomaterials*, 1992, 13, 709-714.



- 
38. Chickering III, J., S., Mathiowitz, E.: Bioadhesive microspheres, II. Characterization and evaluation of bioadhesion involving hard, bioerodible polymers and soft tissue; *React. Polym.*, 1995, 25, 189-206
39. Huang, Y., Leobandung, W., Foss, A., Peppas, N.: Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethered structures and site-specific surfaces; *J. Control. Release.*, 2000, 65, 63–71.
40. Mikos, A., G., Peppas, N., A.: Measurement of the surface tension of mucin solutions; *Int. J. Pharm.*, 1989, 53, 1-5.
41. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Sliznice> (24.4.2010)
42. Duchene, D., Touchard, F., Peppas, N., A.: Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration; *Drug. Dev. Indust. Pharm.*, 1988, 14, 283-318.
43. Peppas, N., Sahlin, J.: Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review; *Biomaterials*, 1996, 17, 1553-1561.
44. Park, K., Park, H.: Test methods of bioadhesion; *Bioadhesive Drug Delivery Systems*. 1990, 43-64.
45. Smart, J., D.: The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion; *Adv. Drug Del. Rev.*, 2005, 57, 1556– 1568.
46. Bernkop-Schnurch, A., Scholler, S., Biebel, R., G.: Development of controlled release systems based on thiolated polymers; *J. Control. Release*, 2000, 66, 39–48.
47. Yin, Y., S., Chen, D., W., Qiao, M., X., Wei, X., X., Hu, H., Y.: Lecitin conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: Ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution; *J. Control. Release*, 2007, 123, 27–38.
48. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Lektiny> (15.1.2010)
49. Park, Y., Y., Yong, C., S., Kim, H., M., Rhee, J., D., Oh, Y., K.: Effect of sodium chloride on the release, absorption and safety of diclofenac sodium delivered by poloxamer gel; *Int. J. Pharm.*, 2003, 263, 105– 111.
50. De Ascentiis, A., Gratis, J., L., Bowman, C., N., Colombo, C., N. Peppas, N., A.: Mucoadhesion of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) is improved when linear poly(ethylene oxide) chains are added to the polymer network; *J. Control. Release*, 1995, 33, 197–201.
51. Alexander, S.: Adsorption of chain molecules with a polar head: a scaling description; *J. Phys.* 1977, 38, 983–987.

- 
52. Podzimek, Š.: Stanovení molární hmotnosti polyesterů metodou SEC-MALS. Synpo a.s. Pardubice, 2005, 8.
53. Podzimek, Š.: Charakterizace větvených oligoesterů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem. Synpo a.s. Pardubice, 2006, 3.
54. Ljungberg, N., Wesslén, B.: The effect of plasticizers on dynamic mechanical and thermal properties of poly(lactic acid); J. Appl. Polym. Sci., 2002, 86, 1227 – 1234.
55. Labrecque, L., V., Kumar, R., R., Davé, V., Gross, R., A., McCarthy, S., P.: Citrate as plasticizers for poly(lactic acid); J. Appl. Polym. Sci., 1997, 66, 1507 – 1513.