

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**VLASTNOSTI VĚTVENÝCH OLIGOESTERŮ
PLASTIFIKOVANÝCH 10 % TRIETHYLCITRÁTU**

Diplomová práce

Hradec Králové 2009

Jitka Třešňáková

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.

Velice děkuji PharmDr. Evě Šnejdové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při vypracování diplomové práce.

Jitka Třešňáková

Abstrakt

Cílem diplomové práce je studium reologických a adhezivních vlastností větvených oligoesterů a liberace acikloviru z těchto systémů. V teoretické části je uveden přehled o bioadhezi, o používaných adhezivních materiálech a jejich využití a také bioadhezivní přípravky registrované v České republice. Dále rozdělení bioadheze na nespecifickou a specifickou se zvláštním zaměřením na lektiny. V praktické části byly měřeny adhezivní síla a dynamická viskozita oligoesterů kyseliny mléčné a glykolové, větvených dipentaerythritolem (0,5D, 1D, 2D, 3D, 5D, 8D) a lineárního oligoesteru PLGA. Nosiče byly plastifikovány 10% triethylcitrátu. Nejvyšší adhezivní síla byla naměřena u oligoesterů 5D a 8D. Dynamická viskozita byla nejvyšší u oligoesterů 3D a PLGA. Liberace acikloviru byla studována u oligoesterů 0,5D, 1D a 2D. Nejrychleji se uvolnil aciklovir z oligoesteru 0,5D - za 48 hodin, z oligoesteru 1D se uvolňovalo léčivo 10 dnů a u 2D byla doba liberace 21 dnů.

Klíčová slova: bioadheze, bioadhezivní přípravky, lektiny, liberace acikloviru, viskozita

Abstract

This Graduation Theses objective is the study of rheologic and adhesion properties of branched oligoesters and acyclovir release from these systems. At the theoretic part there is introduced a basic survey of the bioadhesion and used adhesive materials and their possibilities of the exploitation. There is also the survey of bioadhesive dosage forms registrated in the Czech Republic. And further more there is an apportionment of the bioadhesion for the specific and nonspecific bioadhesion with a special focus on lectins. At the practical part the adhesion and the dynamic viscosity of the oligoesters of lactic and glycolic acid branched with various concentration of dipentaerythritol (0,5D, 1D, 2D, 3D, 5D, 8D) and linear PLGA were measured. Carriers were plasticized using 10% of triethylcitrate. The highest adhesion power was found out by oligoesters 5D and 8D. The dynamic viscosity was the highest by oligoesters 3D and PLGA. The release of acyclovir was studied by oligoesters 0,5D, 1D a 2D. The most fast acyclovir realize was measured regarding to oligoester 0,5 D, 48 hours. The acyclovir realize from oligoester 1D was 10 days and from oligoester 2D 21 days.

Keywords: bioadhesion, bioadhesive materials, lectins, acyclovir release, viscosity

Obsah

1.	ÚVOD.....	5
2.	CÍL PRÁCE.....	6
3.	SEZNAM ZKRATEK.....	7
4.	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
4.1.	Bioadheze a mukoadheze.....	9
4.1.1.	Historie.....	9
4.1.2.	Využití bio/mukoadheze.....	10
4.1.3.	Nevýhody bioadhezivních systémů.....	11
4.1.4.	Metody měření bioadheze.....	11
4.1.5.	Bioadhezivní přípravky v ČR.....	12
4.2.	Nespecifická bioadheze.....	13
4.2.1.	Struktura a typy používaných bioadhezivních polymerů.....	15
4.2.2.	Příklady bioadhezivních polymerů.....	16
4.3.	Specifická bioadheze.....	17
4.3.1.	Lektiny.....	18
4.3.2.	Bakteriální lektiny (adheziny).....	20
4.3.3.	Živočišné lektiny.....	20
4.3.4.	Rostlinné lektiny.....	21
4.3.5.	Využití lektinů.....	22
4.3.6.	Faktory limitující perorální podání lektinů.....	23
4.3.7.	Jiná přírodní bioadheziva.....	24
4.3.8.	Historické mezníky v oblasti lektinů.....	25
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
5.1.	Použité suroviny.....	27
5.2.	Použité přístroje.....	27
5.3.	Charakteristika testovaných oligoesterů.....	28
5.4.	Příprava vzorků.....	28
5.5.	Měření adheze.....	29
5.6.	Měření viskozity.....	30
5.7.	Disoluce acikloviru.....	31
5.7.1.	Příprava liberačního média.....	31
5.7.2.	Kalibrační přímka.....	31
5.7.3.	Průběh disolučního testu.....	32
5.7.4.	Výpočet množství uvolněného léčiva.....	33
6.	VÝSLEDKY.....	34
6.1.	Tabulky.....	34
6.1.1.	Měření adheze.....	34
6.1.2.	Měření viskozity.....	38
6.1.3.	Měření disoluce.....	39
6.2.	Grafy.....	42
6.2.1.	Adhezivní síla.....	42
6.2.2.	Dynamická viskozita.....	44
6.2.3.	Disoluce acikloviru.....	46
7.	DISKUSE.....	51
7.1.	Dynamická viskozita.....	51
7.2.	Adhezivní síla.....	52
7.3.	Liberace acikloviru.....	53
8.	ZÁVĚR.....	54

1. Úvod

Bioadhezivní materiály jsou schopny přilnout na různé povrchy v organismu a setrvat zde po delší dobu. Pokud je takovým povrchem slizniční membrána pokrytá vrstvou hlenu, hovoříme o mukoadhezi.¹ Speciálním případem je cytoadheze, kdy se některé molekuly specificky váží prostřednictvím receptorů na povrch buněk.

Využití bioadheziv je dáno jejich delší vazbou na biologické povrchy. Tím se zlepšuje absorpce dané léčivé látky inkorporované v bioadhezivním přípravku, zvyšuje se biodostupnost, může být prodlouženo uvolňování léčivé látky a výhodné jsou tyto systémy i z hlediska compliance pacienta (prodloužení dávkovacího intervalu).² Velkým přínosem by byla možnost perorálního podání peptidů a proteinů. I když právě aplikace bioadhezivních terapeutických systémů do gastrointestinálního traktu naráží na řadu komplikací, i zde probíhají intenzivní výzkumy a hledají se stále nové způsoby a modifikace systémů, které by tyto problémy překonaly.³ V současnosti se používají především bioadhezivní terapeutické systémy pro aplikaci do dutiny ústní, nosu, oka a pochvy.⁴

První výzkumy s bioadhezivními látkami se datují do 80. let dvacátého století.⁵ Nejprve byly jako potenciální bioadheziva zkoumány už známé polymery, které se běžně používaly jako pomocné látky a byly tak popsány jejich vlastnosti. To umožnilo rychlejší registraci nových bioadhezivních terapeutických systémů.⁶ Následuje období detailního zkoumání adhezivních materiálů, snaha podrobně popsat mechanismy adheze a najít látky s výhodnými vlastnostmi. Předpokládané účinky bioadhezivních systémů se sice ne vždy potvrdily, ale je zřejmé, že případné neúspěchy vedly k dalšímu, intenzivnímu hledání nových látek a aplikačních lékových forem. Tak se neustále rozšiřují jak poznatky, tak nové možnosti využití bioadhezivních terapeutických systémů.

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je studium reologických a adhezivních vlastností oligoesterů kyseliny D,L - mléčné a glykolové větvených dipentaerythritolem a studium liberace acikloviru z těchto systémů.

Úkol diplomové práce je možno rozdělit do těchto dílčích kroků:

1. Připravit vzorky pro měření viskozity a adheze: pro plastifikaci oligoesterů použít triethylcitrát v koncentraci 10%.
2. Na viskozimetru Brookfield DV-E s adaptérem pro malé množství vzorku změřit viskozitu plastifikovaných oligoesterů při 50°C teplotě vřetenem číslo 14.
3. Na materiálovém zkušebním stroji T1-FR050TH.A1K firmy Zwick/Roell měřit adhezivní vlastnosti plastifikovaných oligoesterů jako maximální sílu F_{max} v jednotkách Newton, potřebnou pro odtržení vzorku od podkladu za těchto testovacích podmínek: doba kontaktu 60 s, kontaktní síla 5 N a rychlost odtržení 300 mm/min.
4. Za stejných podmínek změřit dynamickou viskozitu a adhezivní sílu plastifikovaného lineárního oligoesteru, tvořeného ekvimolárním množstvím kyseliny mléčné a glykolové.
5. Zjistit průběh liberace acikloviru z oligoesterů 0,5D, 1D a 2D za statických podmínek do fosfát citrátového pufru pH 7,0.

3. Seznam zkratek

- 0,5D – oligoester kyseliny D,L – mléčné a glykolové s 0,5 % dipentaerythritolu
- 1D – oligoester kyseliny D,L – mléčné a glykolové s 1 % dipentaerythritolu
- 2D – oligoester kyseliny D,L – mléčné a glykolové s 2 % dipentaerythritolu
- 3D – oligoester kyseliny D,L – mléčné a glykolové s 3 % dipentaerythritolu
- 5D – oligoester kyseliny D,L – mléčné a glykolové s 5 % dipentaerythritolu
- 8D – oligoester kyseliny D,L – mléčné a glykolové s 8 % dipentaerythritolu
- ACV – aciklovir
- D – dipentaerythritol
- EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor (*epidermal growth factor receptor*)
- F/S – průměrná síla F_{\max} vztažená ke kontaktní ploše [mN/mm^2]
- F_{\max} – maximální síla potřebná pro odtržení vzorku od podkladu [N]
- Fuc – fukosa
- GA – kyselina glykolová (*glycolic acid*)
- Gal – galaktosa
- GalNAc – N-acetylgalaktosamin
- GIT – gastrointestinální trakt
- Glc – glukosa
- GlcNAc – N-acetylglukosamin
- HEB – hematoencefalická bariéra
- LA – kyselina mléčná (*lactic acid*)
- Man – manosa
- M_m – molární hmotnost [g/mol]
- M_n – číselně střední molární hmotnost [g/mol]
- M_w – hmotnostně střední molární hmotnost [g/mol]
- M_w/M_n – stupeň polydisperzity
- NeuNAc – sialová kyselina
- PLGA – oligoester kyseliny D,L - mléčné a glykolové (*poly (D,L)-lactic-co-glycolic acid*)
- RPM – počet otáček vřetena za minutu
- s – směrodatná odchylka [N]
- s/S – směrodatná odchylka veličiny F/S [mN/mm^2]
- TEC – triethylcitrát

T_g - teplota skelného přechodu [°C]

TSP – polysacharid ze semen tamaryšku indického (*tamarind seed polysacharide*)

VAA – lektin ze jmelí (*Viscum album* agglutinin)

WGA – lektin z pšeničných klíčků (*wheat germ agglutinin*)

η – dynamická viskozita [Pa.s]

4. Teoretická část

4.1. Bioadheze a mukoadheze

Bioadheze znamená přilnutí syntetických nebo přírodních makromolekul (bioadheziv) na biologický povrch.⁴

Pokud je daným povrchem slizniční membrána nebo hlen, děj je nazýván **mukoadheze**. Při specifické vazbě na povrch buněk pak hovoříme o **cytoadhezi**.

Bioadhezivní terapeutické systémy jsou využitelné z hlediska prodloužené doby setrvání léčiva na daném místě, a tím zvýšené biodostupnosti a absorpci léčiva. Kromě dobré přilnavosti k substrátu mohou navíc některá bioadheziva např. inhibovat enzymy, otevírat těsné spoje mezi buňkami nebo indukovat endocytózu.

Bioadheziva můžeme rozdělit dle typu vazby na nespecifická a specifická. K nespecifickým bioadhezivům patří některé syntetické a přírodní polymery, které se vyznačují schopností přilnout téměř ke každému povrchu.⁴ Do tzv. druhé generace bioadheziv jsou řazeny látky, u kterých byla navíc zjištěna schopnost inhibovat proteolytické enzymy nebo měnit permeabilitu epitelových buněk (tzv. multifunkční polymery). Výzkum probíhá také v oblasti specifických bioadheziv (lektinů a dalších přírodních adhezivních molekul), které mají schopnost přímé vazby na buněčné povrchy nebo receptory (tzv. cytoadheze). Jejich výhodou je tak možnost cíleného dodání léčiva do požadované oblasti.⁶

4.1.1. Historie

Nápad k využití bioadheze pro farmaceutické účely se datuje do začátku osmdesátých let dvacátého století.⁵

Zásadní byla práce T. Nagaie v letech 1970-1980, který ukázal na lepší lokální léčbu aftů pomocí protizánětlivých steroidů, pokud byl použit bioadhezivní polymer.⁷ Zjistil také mnohem větší biodostupnost při podání peptidu do nosní dutiny při použití bioadheziv.⁸

V osmdesátých letech se objevilo množství studií, které propagovaly představu, že se různé lékové formy budou moci na dané místo aplikace „přilepit“. Podle druhu zamýšlené aplikační cesty se staly substrátem pro takové bioadhezivní lékové formy oči, pokožka nebo sliznice trávicího traktu, úst, nosu, plic a pochvy. Protože všechny tyto sliznice jsou pokryté vrstvou hlenu (mukus), který zde tvoří spojovací článek

mezi epitelovými buňkami sliznice a adhezivním materiálem, byl pro tento specifický způsob adheze zaveden pojem mukoadheze.³

Výzkum začal s bioadhezivními polymery, které již byly používány jako pomocné látky a mohly být rychleji zavedeny v nových formulacích.⁶ Nevýhodou těchto polymerů tzv. 1. generace je jejich adheze téměř ke každému povrchu. Dalším výzkumem bioadhezivních látek a mechanismů bioadheze byly objeveny tzv. multifunkční polymery, schopné např. krátkodobě měnit permeabilitu epitelových buněk.

Kromě nespecifických bioadheziv jsou v současnosti také zkoumány lektiny a další přírodní bioadheziva, které se specificky váží na povrch buněk. První pokusy s využitím lektinů pro terapeutické systémy publikovali ve své práci v roce 1988 Woodley a Naisbett.⁹

4.1.2. Využití bio/mukoadheze

Terapeutické výhody bioadhezivních systémů léčiv spočívají ve zlepšení absorpce a biologické dostupnosti léčivé látky přinášené tímto systémem, dále v možnosti ovlivnění permeability membrán nebo inhibice některých enzymů a v případě specifické bioadheze i targetingu léčiva do požadované oblasti. Výhodné jsou tyto systémy i z hlediska compliance pacienta (prodloužením dávkovacího intervalu).

Léčiva mohou být podávány bioadhezivními systémy buď lokálně, nebo systémově; hlavními místy jejich aplikace je v současnosti dutina ústní, nosní, oči a pochva.⁴ Hledají se vhodné bioadhezivní materiály a systémy pro použití do gastrointestinálního traktu nebo plic.

Substrátem bioadhezivních systémů je epiteliální membrána, v případě mukoadheze je hlavním kontaktním místem vrstva hlenu. Právě pokrytí slizniční membrány vrstvou hlenu (a jeho častá obměna) v gastrointestinálním traktu, nose nebo pochvě je jedním z limitujících faktorů aplikace mukoadhezivních systémů do těchto oblastí.

Velkým přínosem by byla možnost perorálního podání peptidů a proteinů, které by mohly být bioadhezivním systémem zároveň chráněny před předčasným odbouráním lumenálními nebo mukózními proteasami, možnost perorální nebo nasální aplikace vakcinačních látek nebo cílené podání protinádorových léčiv.

Očekávané účinky bioadhezivních lékových forem se sice experimentálně ne vždy potvrdily, ale zkoumání nových látek a detailnější poznání mechanismů bioadheze přinášejí zajímavé výsledky. Tak byly objeveny tzv. multifunkční polymery schopné inhibovat některé enzymy nebo měnit buněčnou permeabilitu, také jsou zkoumány možnosti využití specifických bioadheziv (např. lektiny, proteiny fibronektin a laminin, protilátky a další), které by umožňovaly targeting léčiv do určitých oblastí.

Vhodnými formulacemi pro aplikaci do gastrointestinálního traktu se zdají být mukoadhezivní mikro- a nanočástice s polymerním obalem nebo s vysoce specifickými biologickými ligandami. Mikročástice mohou být použity pro řízené uvolňování léčiv a nanočástice pro místně specifickou absorpci.⁴

4.1.3. Nevýhody bioadhezivních systémů

Plné využití bioadhezivních terapeutických systémů je limitováno některými negativními faktory. U nespecifických bioadheziv je nevýhodou jejich vazba téměř ke každému biologickému povrchu, není zde možné cílenější podání. V mnohých případech nelze ovlivnit sílu bioadheze a kontaktní čas. V případě mukoadheze je velkým problémem rychlá obměna hlenové vrstvy. Mukoadhezivum se přednostně váže na vrstvu hlenu, velmi omezeně se může dostat přímo k slizniční membráně. Protože k obměně hlenu dochází během několika málo hodin, je silně limitována doba adheze. V ústní dutině je dalším limitujícím faktorem zkracujícím čas mukoadheze pohyb jazyka a tvorba slin, v nosní dutině probíhá mukociliární clearance. V gastrointestinálním traktu je problematické také velké množství uvolněného hlenu a dalších specifických látek, které pravděpodobně inaktivují mnoho polymerů ještě dříve, než vůbec dosáhnou povrchu sliznice.³ Tyto faktory zatím neumožňují perorální podání mukoadhezivních terapeutických systémů.

4.1.4. Metody měření bioadheze

Měření bioadheze je důležité pro srovnání adhezivní síly různých látek a pro zjištění jejich funkčnosti. Existuje velké množství metod měření jak *in vitro*, tak *in vivo*. Pro testování a porovnávání adhezivní síly různých bioadheziv je velmi důležité, aby metody byly spolehlivé a validní.

Metody *in vitro*¹⁰

Tyto testy byly zpočátku navrženy pro hledání potenciálních bioadheziv a v případě úspěchu se pokračovalo v *in vivo* testech. V současnosti je větší důraz kladen na precizní prozkoumání mechanismů bioadheze, protože poznání bioadhezivních vlastností látek je základem pro výzkum nových bioadheziv. Nejčastěji *in vitro* používanými technikami jsou: měření adhezivní síly, promývací technika (*perfusion wash technique*) a reologické testování.

Metody *in vivo*¹⁰

K monitorování bioadhezivních vlastností v organismu se používají nejčastěji tyto tři metody: gamma scintigrafie, izolované cyklické metody (*isolated loop techniques*) a tranzitní studie s radioaktivně nebo fluorescenčně značenými látkami.

4.1.5. Bioadhezivní přípravky v ČR

V současnosti se používají nebo budou uvedeny na trh bioadhezivní terapeutické systémy pro aplikaci do dutiny ústní, nosu, oka a pochvy.

V očních přípravcích se některé bioadhezivní polymery používají jako viskozifikanty. Tím dojde nejen k úpravě vlastního přípravku (zvýšením viskozity je také prodloužena doba kontaktu), ale může být ovlivněno i přilnutí očního přípravku k rohovce. Z používaných viskozifikantů vykazují dobré adhezivní vlastnosti karbomery, kyselina hyaluronová a xyloglukan. Karbomery jsou syntetické polymery kyseliny akrylové (karboxyvinylpolymery) s vysokou molekulovou hmotností. Jsou charakteristické velmi dobrými zvlhčujícími a bioadhezivními vlastnostmi, které umožňují dlouhý kontaktní čas s rohovkou. Z přípravků je v České republice registrován Vidisic[®] oční gel, určený jako náhrada slz při jejich nedostatečné produkci (tzv. „umělé“ slzy), nebo Oftagel[®], sloužící k léčbě syndromu suchého oka. Kyselina hyaluronová je fyziologicky se vyskytující polysacharid, vysoce hydrofilní, s dobrou bioadhezivitou i k epitelu rohovky. Z přípravků obsahujících hyaluronát (sůl kyseliny hyaluronové) jsou u nás k dispozici Hylo-Care[®] oční kapky, Hylo-Comod[®] a Oxyal[®]. Xyloglukan (neboli TSP – *tamarind seed polysacharide* – polysacharid získaný ze semen tamarisku indického) je vysoce hydrofilní polymer galaktosyl-glukanu. Tato látka, konfiguračně podobná mucinu fyziologicky obsaženému v slzách, vykazuje dobré viskoelastické a bioadhezivní vlastnosti, a tím i delší kontaktní čas na povrchu oka. TSP najdeme v přípravcích Visine[®] (Unavené oči, Unavené citlivé oči a Intenzivní).¹¹

Také přípravky určené do nosní dutiny obsahují jako pomocné látky viskozifikanty, z nichž některé mají mukoadhezivní vlastnosti; příkladem jsou karbomery, deriváty celulosy (hypromelosa, methylcelulosa, karmelosa), kyselina hyaluronová a její sodná sůl, alginát sodný nebo chitosan. Z přípravků obsahujících hypromelosu jsou u nás registrovány např. Otrivin[®], Vibrocil[®] nosní gel, Livostin[®] nosní sprej, Muconasal Plus[®] roztok ve spreji. Sodnou sůl karmelosity obsahuje Rhinocort Aqua[®]. Hyaluronát sodný najdeme v Olynth HA[®] nosním spreji.¹²

Z léčiv k vaginální aplikaci je v České republice registrován Crinone[®]. Tento vaginální gel s progesteronem obsahuje jako pomocné látky karbomery a polykarbophil, které se váží na vaginální mukózu a zajišťují zpomalení uvolňování progesteronu po dobu minimálně 3 dnů.¹³

Z přípravků určených do ústní dutiny je v České republice registrován zdravotnický prostředek Gelclair[®]. Tento viskózní gel je určený k ošetřování poškozených míst v dutině ústní při orální mukozitidě. Díky adhezivním vlastnostem vytváří na sliznici ochranný film, který zajišťuje pokrytím obnažených nervových zakončení snížení bolestivosti po dobu 5-7 hodin. Hlavními složkami gelu jsou bioadhezivní polymery povidon a hyaluronát sodný, který jako hydratační látka zároveň zvlhčuje ústní sliznici.¹⁴ Z dalších orálních adhezivních přípravků sem můžeme s určitou výhradou zařadit homeopatické přípravky Rhinallergy[®], Paragrippe[®] a Cocculine[®], registrované jako mukoadhezivní bukální tablety. Dále je u nás jako léčivo ve specifickém léčebném programu registrováno Carnitene Forme Orali[®], také ve formě mukoadhezivní bukální tablety.

4.2. Nespecifická bioadheze

Jako první adhezivní materiály byly zkoumány známé polymery, které se už delší dobu používaly pro farmaceutické a jiné účely jako různé pomocné látky, byly známy jejich vlastnosti a bezpečnost a mohly tak být rychleji registrovány pro nové aplikační formy.⁶

Nevýhodná se ale u těchto látek ukázala jejich nespecifická přilnavost téměř ke všem povrchům. U většiny polymerů byla prokázána jistá míra bioadheze k vlhkému slizničnímu povrchu, ale pouze některé jsou schopny adherovat k povrchům v nabobtnalém stavu³ a setrvat po delší dobu v této vazbě ve vlhkém nebo vodném prostředí. Roli při adhezi hraje množství fyzikálně-chemických faktorů,

vliv mají vlastnosti a stav jak polymerů, tak epiteliálního povrchu. Charakteristiku těchto tzv. polymerů první generace shrnuje tabulka 1.

Tab. 1: Vlastnosti nespecifických bioadhezivních polymerů tzv. první generace

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• silnější vazba k slizničním povrchům nebo hlenu• prodloužená doba setrvání v místě aplikace, resp. absorpce (zlepšení biodostupnosti)• polymery hydrofilní, s omezenou rozpustností v jiných rozpouštědlech, často citlivé na změnu pH ¹ |
|---|

Výzkum se proto obrátil na hledání látek s lepšími vlastnostmi. Při studiu mukoadhezivních systémů aplikovaných do gastrointestinálního traktu bylo zjištěno, že i zde dochází ke zvýšení biodostupnosti použitím mukoadhezivních polymerů, i když je zde určitým limitujícím faktorem pokrytí sliznice vrstvou hlenu a jeho rychlá obměna. Důvodem zlepšené absorpce léčiv pomocí mukoadheziv je pravděpodobně biologická aktivita některých pomocných látek. Různé bioadhezivní polymery jsou schopny krátkodobě a reverzibilně otevřít těsné spoje („tight junction“) mezi sousedními epitelovými buňkami, a tím umožnit prostup peptidů.³ Další příznivý efekt byl objeven u mukoadhezivních derivátů kyseliny polyakrylové, které jsou schopné inhibovat celou řadu proteolytických enzymů (např. trypsin a chymotrypsin). Mechanismus této inhibice spočívá ve vytváření komplexů s kovovými ionty ve funkci kofaktorů enzymů, což je podmíněno chelatovnými schopnostmi těchto polymerů.¹⁵ Vznikla tak tzv. druhá generace **multifunkčních polymerů**, někdy nazývaných jako biologicky aktivní pomocné látky. Některé vlastnosti, které vykazuje tato tzv. druhá generace polymerů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Vlastnosti multifunkčních bioadhezivních polymerů tzv. druhé generace ¹⁰

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• bioadhezivní vlastnosti jak v suchém, tak kapalném prostředí• schopnost přijmout jak hydrofobní, tak hydrofilní léčiva za účelem jejich řízeného uvolňování• inhibice proteolytických enzymů• modulace epitelové permeability, např. otevřením těsných spojů• indukce vezikulárních transportních procesů v buňkách (endocytózy, resp. transcytozy)• široká míra bezpečnosti jak při lokálním, tak systémovém použití |
|--|

4.2.1. Struktura a typy používaných bioadhezivních polymerů

Povrch buněk a mucinu (glykoproteinová složka hlenu) jsou za fyziologického pH záporně nabitě a reagují tak s kladně nabitými molekulami. Tyto elektrostatické síly se uplatňují při interakcích **kationaktivních polymerů** – např. chitosanu, který se získává desacetylací chitinu. Chitosan a jeho deriváty jsou zkoumány pro využití v terapeutických systémech do ústní a nosní dutiny.⁴

Na druhé straně jsou využívány **anionaktivní polymery** – např. deriváty kyseliny akrylové a metakrylové (karbomery, polykarbophil, polymetakryláty). Zde se uplatňují při adhezi jiné fyzikálně-chemické procesy, jako jsou hydrofóbní interakce, vodíkové vazby a van der Waalsovy interakce. Tyto bioadhezivní síly jsou ovlivňovány pH a iontovým složením.¹⁶

Kovalentní vazby se při bioadhezi většinou neuplatňují. Byl ale proveden pokus s derivátem kyseliny polyakrylové (polykarbophilem), který byl modifikován adicí aminokyseliny cysteinu. Tento polymer tvořil kovalentní disulfidické můstky s mucinem a byla tak významně zvýšena mukoadheze.¹⁷

Jiná studie použila tento modifikovaný polykarbophil spojený s ještě dalším bioadhezivním polymerem (karmelosou) za účelem inhibice trávicích enzymů. Komplex byl využit jako nosič insulínu pro ústní podání myši. Byly získány velmi povzbudivé výsledky, kdy bazální hladina krevní glukosy poklesla u diabetických myši o 20 až 40% oproti perorálnímu podání samotného insulínu a účinek byl velmi dlouhodobý, přetrvával 80 hodin po podání.¹⁸

U syntetických polymerů je schopnost bioadheze většinou zesílena s narůstající molekulovou hmotností polymeru. Spodní hranice molekulové hmotnosti se pohybuje okolo 100 000. Toto platí pro lineární polymery; u nelineárních struktur může být i velmi vysoká molekulová hmotnost provázána nižší adhezivitou, důvodem je pravděpodobně menší počet přístupných volných skupin podílejících se na adhezi.¹⁰ Obecně platí, že u každého polymeru existuje určitá molekulová hmotnost, při které dochází k nejvyšší adhezi.

Další faktory ovlivňující adhezivitu jsou koncentrace polymeru, konformace a flexibilita polymerních řetězců. Předpokládá se, že řetězce polymeru interpenetrují s řetězcem mucinu a toto vzájemné propletení také zvyšuje adhezivitu.¹⁹

Široce používané deriváty kyseliny polyakrylové (karbomery, polykarbophil, polymetakryláty) jsou ve vodě nerozpustné; karbomery ve vodě bobtnají a po přidání roztoku alkalické látky tvoří gely. U mnohých bioadhezivních polymerů (např. u derivátů celulosy) jejich adhezivní vlastnosti klesají úměrně s přijímaným objemem vody – tato jejich nevýhoda je označována jako nadměrná hydratace (*over-hydration*).³

4.2.2. Příklady bioadhezivních polymerů

Bioadhezivní vlastnosti vykazují některé přírodní a syntetické polymery. Většina v současnosti používaných syntetických bioadhezivních polymerů jsou látky odvozené od kyseliny akrylové a metakrylové a jejich derivátů (polyakryláty), slabší adhezivní vlastnosti vykazují také polyvinylolové sloučeniny.

Z přírodních polymerů mají bioadhezivní vlastnosti některé látky ze skupiny derivátů celulosy a další polysacharidy, dále někteří zástupci polyuronidů, kationaktivních polysacharidů nebo biotechnologicky získaných polysacharidů. Deriváty celulosy jsou z přírodních polymerů využívány nejvíce.

Obecně jsou preferovány anionaktivní polymery před kationaktivními díky nižší toxicitě, dále jsou upřednostňovány látky biodegradabilní, nedráždivé, neovlivňující vstřebávání daného léčiva a také cenově dostupné. Přehled látek shrnuje tabulka 3.

Tab. 3: Přírodní a syntetické polymery s bioadhezivními vlastnostmi

Přírodní polymery	
1. Deriváty celulosy	Popis, vlastnosti
hytelosa (HEC)	rozpustná ve studené vodě
hydroxypropylcelulosa (HPC)	rozpustná ve studené vodě
hypromelosa (HPMC)	rozpustná ve studené vodě
karmelosa (CMC) a její soli (sodná, vápenatá)	sodná sůl rozpustná ve vodě (polymer s velmi dobrými mukoadhezivními vlastnostmi), vápenatá sůl ve vodě bobtná
methylcelulosa (MC)	rozpustná ve studené vodě, povrchově aktivní
2. Další polysacharidy	Popis, vlastnosti
guar galaktomanan	lineární kopolymer galaktosy a manosy, rozpustný ve vodě
karagenan	polygalaktan esterifikovaný kyselinou sírovou

Tab. 3: Přírodní a syntetické polymery s bioadhezivními vlastnostmi (pokračování)

<i>Přírodní polymery</i>	
3. Polyuronidy	Popis, vlastnosti
kyselina alginová a její soli (algináty) – významná sodná sůl	sodná sůl kyseliny alginové rozpustná ve vodě
kyselina hyaluronová a její soli	glykosaminoglykan, tělu vlastní látka, významně váže vodu
pektin	lineární polysacharid, ve studené vodě bobtná, rozpustný v horké vodě
tragant	2 složky: tragakantin – rozpustný ve vodě a basorin – ve vodě bobtná
4. Kationaktivní polysacharidy	Popis, vlastnosti
chitosan	polyaminoglykan, vzniká desacetylací chitinu
5. Biotechnologické polysacharidy	Popis, vlastnosti
xanthanová klovatina	hlavní řetězec polyglykanový, vedlejší řetězce trisacharidové (manosa+kyselina glukuronová+manosa), rozpustná ve vodě
<i>Syntetické polymery</i>	
Polyakryláty	Popis, vlastnosti
karbomery (karboxyvinylpolymery)	síťované polymery kyseliny akrylové, ve vodě bobtnají
polykarbophil	vysokomolekulární kyselina polyakrylová, ve vodě nerozpustný, bobtná
polymetakryláty	polymery kyseliny metakrylové, nerozpustné ve vodě
Polyvinylové sloučeniny	Popis, vlastnosti
polyvinylalkohol	rozpustný ve vodě, směsích vody s alkoholy
povidon	rozpustný ve vodě, vícesytných alkoholech a lihu

4.3. Specifická bioadheze

Jako specifická bioadheziva jsou označovány látky, které mají schopnost cíleně se navázat na buněčné povrchy. Příkladem jsou lektiny, proteiny fibronektin a laminin, protilátky a další biologické molekuly, které se váží přímo na receptory nebo jiné struktury na povrchu buněk. Tím se zásadně odlišují od většiny syntetických polymerů, které se nespecificky váží téměř ke každému povrchu nebo vrstvě hlenu, zatímco specifické bioadhezivní molekuly umožňují cílenější vazbu pouze na určité buněčné povrchy nebo receptory tkání, buněk nebo pouze skupiny buněk, a tím umožňují i targeting léčiva do požadované oblasti.⁶ Cytoadheze tak překonává některé nedostatky mukoadheze.

Inspirací při hledání nových cytoadhezivních molekul se staly mikroorganismy. Přílnutí bakterií na buněčné povrchy je velmi specifické a efektivní, a to i v nepříznivých podmínkách. Specifická vazba bakterií je dána tzv. adheziny. Jsou to glykoproteiny, které dokáží rozpoznat určité povrchové struktury (zpravidla určité sekvence oligosacharidů) na povrchu hostitelské buňky a mohou se na ně specificky vázat.³

4.3.1. Lektiny

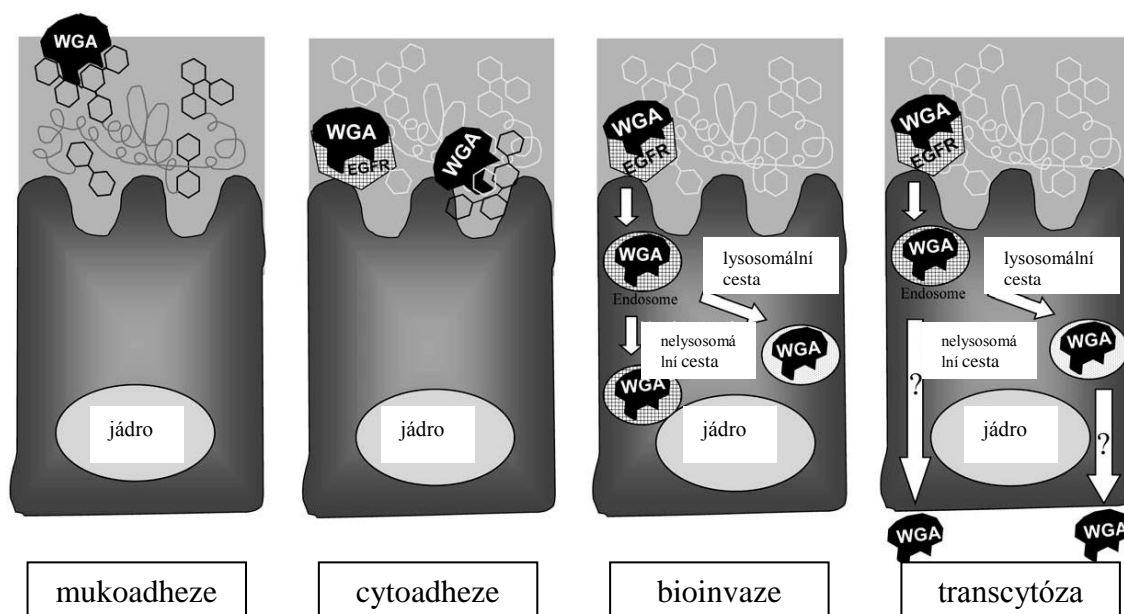
Adheziny tvoří pouze podskupinu molekul patřících do velké třídy tzv. lektinů. **Lektiny** jsou definovány jako proteiny nebo glykoproteiny neimunního původu, které se reversibilně váží na polysacharidové komplexy a tím dochází k vazbě nebo aglutinaci (shlukování) buněk. Většina proteinů na buněčném povrchu a velká část lipidů v buněčné membráně je glykosylována (vzniká tzv. glykokalyx – vnější buněčný plášť), a právě povrchové sacharidy glykokalyxu jsou vazebným místem pro lektiny. Existují různé druhy sacharidů na rozdílných typech buněk, také transformované nebo nádorové buňky často exprimují na svém povrchu jiné sacharidy.²⁰ Základem pro širokou škálu sacharidových komplexů je 5 cukerných jednotek: N-acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin, galaktosa, fukosa a sialová kyselina.¹⁰ Tyto stavební kameny jsou kombinovány do různých sacharidových komplexů s různou specifitou vazby k lektinům. Lektiny jsou proto schopny vázat se pouze na určité tkáně, buňky nebo skupiny buněk. Mohly by tak být využity jako nosiče léčiv při jejich targetingu pouze do určité tkáně nebo ke skupinám buněk. Protože ale zmíněné cukerné jednotky tvoří i strukturu hlenu, je někdy problémem vazba lektinů na mukus a omezený kontakt s povrchem buněk.

Interakce mezi lektiny a sacharidy řídí mnoho aspektů buněčného chování, jako růst, diferenciaci a migraci buněk.⁶ Některé lektiny jsou také schopny po navázání na buněčný receptor dát buňce signál k endocytóze takto navázaných ligandů (tzv. bioinvaze).³ Kromě lektinů izolovaných z rostlin a mikroorganismů byla receptorem zprostředkovaná endocytóza popsána také u řady rostlinných a bakteriálních toxinů, např. toxinu *Vibrio cholerae* (A-B5 toxin), *E. coli* (termolabilní toxin LTB) a *Shigella shigae*.²¹ I když tyto adhezivně/invazivní faktory nejsou lektiny v pravém slova smyslu, jejich bioinvazivní potenciál by také mohl být využit k targetingu léčiv.²⁰

Ze studie Haltnera a kolektivu²² vyplývá, že na vazbu a následně endocytózu má vliv také teplota a že některé endozomované lektiny splývají s lysozomy (kde dochází

zpravidla k degradaci obsahu), a naopak jiné endozómy nepodléhají této degradační metabolické cestě. Při targetingu léčiv pomocí lektinem konjugovaných nosičů tak bude nezbytné také detailnější prozkoumání těchto mechanismů transportu a výběr vhodných lektinů umožňujících endocytózu nebo u některých lektinů také transcytózu daných transportních nosičů. Případné děje při interakci sacharid-lektin znázorňuje obrázek 1.

Obr. 1: Možné cesty lektinem zprostředkovaného transportu léčiva (lektin+léčivo nebo lektin+nosič s léčivem) na příkladu lektinu z pšeničných klíčků (WGA) ²³



Popis obrázku 1:

Mukoadheze – vazba WGA na sacharidové jednotky mucinu, důležité složky slizničního hlenu (mukusu)

Cytoadheze – specifická vazba WGA na sacharidové molekuly nebo receptory na povrchu buněk (např. EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor)

Bioinvaze – endocytóza ligandu (WGA nebo nosič+WGA) zprostředkovaná navázáním lektinu na EGFR, endozóm je metabolizován lysosomální (zpravidla degradace endozomovaného ligandu) nebo nelysosomální cestou

Transcytóza – transport ligandu (WGA nebo nosič+WGA) skrz buňku, na jedné straně buňky dochází k endocytóze - (pohlcení) ligandu, na druhé straně buňky k exocytóze - (vyloučení) ligandu

Kromě tzv. exogenních lektinů, které se váží na molekuly sacharidů hostitelských buněk, existuje i opačný případ, kdy jsou exogenní molekuly cukru vázány pomocí endogenních lektinů hostitele.³ Např. je známa určitá střevní bakterie, která na své buněčné stěně exprimuje sacharidové kontaktní molekuly, kterými se váže prostřednictvím lektinů na povrch epitelálních buněk hostitele.²⁰ V roce 1980 studoval Kopecek a kol.²⁴ syntetické polymery spojené se sacharidovými jednotkami jako potenciální nosiče léčiv. Různé sacharidy vykazovaly rozdílnou interakci s tkání gastrointestinálního traktu. Polymer s galaktosou se silně vázal v proximální oblasti střev, zatímco fukosou konjugovaný polymer výrazně interagoval v distálních částech střeva.

4.3.2. Bakteriální lektiny (adheziny)

Na povrchu bakterií nebo na fimbríích (tzv. pili, nepohyblivých výběžcích bakterií) se nacházejí proteinové (glykoproteinové) komplexy, které jsou schopné adherovat a vázat se na polysacharidy epitelových buněk nebo na glykoproteinové povlaky zubů.²⁵ Vazbou na erythrocyty a jiné buňky dochází k výrazné aglutinaci. Lektiny slouží mikroorganismům k připojení na hostitelské buňky a jako rozpoznávací faktory se podílejí na buněčné adhezi a fagocytóze.²⁶ Mechanismem vazby lektin - sacharid je také vysvětlována schopnost některých bakterií (symbiotických nebo patogenních) kolonizovat gastrointestinální trakt, a to i za ne zcela příznivých podmínek, které zde panují. I když mukus hraje výraznou roli při ochraně slizničního povrchu a zadrží řadu mikroorganismů, jeho vrstva není zcela souvislá. Právě oblastí se slabším hlenovým povlakem mohou být startovním místem pro osídlení sliznice mikroorganismy.²⁵

Do skupiny bakteriálních lektinů řadíme i lektinům podobné substance, které se váží na sacharidy, ale nezpůsobují aglutinaci buněk. Tyto molekuly byly nalezeny např. u orálních aktinomycet (vazba na galaktosu) nebo u *Mycoplasma* spp. (molekuly specifické k sialové kyselině).²⁷

4.3.3. Živočišné lektiny

Lektiny živočichů můžeme rozdělit do tří různých skupin zahrnujících lektiny C-typu, galektiny (lektiny S-typu) a N-typ lektiny. Molekuly se uplatňují při apoptóze, váží bakterie na epitelální buňky (typ endogenních lektinů), chrání před

mikroorganismy, podílejí se na endocytóze a translokaci glykoproteinů, regulují migraci a adhezi buněk a jako opsoniny mají význam při fagocytóze.²⁶

Pro terapeutické využití jsou zkoumány asialoglykoproteinové lektiny. Tyto typické C-typ lektiny se nacházejí výhradně na hepatocytech. Byly mezi prvními identifikovanými savčími lektiny.²⁸ Váží se na galaktosová zakončení asialoglykoproteinů, u ptáků se váží na N-acetylglukosamin. Tyto jaterní lektiny jsou rozsáhle studovány a byly testovány různé komplexy léčiv se sacharidy jako potenciální nosiče protinádorových léčiv cíleně mířených do hepatocytů.²⁵

4.3.4. Rostlinné lektiny

Rostlinné lektiny zahrnují širokou skupinu proteinů vázajících se na různé sacharidové jednotky. Jako fytohemaglutiny jsou tyto látky schopné aglutinovat erythrocyty. Lektiny slouží k obraně proti rostlinným patogenům, chrání rostliny před predátory (zvířata, hmyz) nebo se uplatňují jako mediátory symbiózy.²⁶ Řada rostlinných lektinů je toxická, po požití takovýchto rostlin nebo po podání izolovaných lektinů by došlo k závažnému poškození buněk nebo k jinému nežádoucímu vlivu na organismus. Příkladem je silně toxický ricinový hemaglutinin (lektin z *Ricinus communis*) nebo lektin z červených fazolí (aglutinin *Phaseolus vulgaris*), který při požití špatně tepelně upravených fazolí vyvolává průjem, malabsorpci, inhibici růstu a naopak přerůstání manosa-senzitivní *E.coli*.²⁹ Ale u mnohých dalších rostlin, které běžně konzumujeme a přitom obsahují lektiny, nebyly pozorovány toxické účinky na organismus. Příkladem je rajčatový lektin nebo lektin z pšeničných klíčků.

V současnosti je nejvíce studovaným lektinem pro potenciální využití rajčatový lektin (aglutinin z *Lycopersicum esculentum*). Je netoxický a odolává enzymatické degradaci v gastrointestinálním traktu. Specificky se váže na N-acetylglukosamin.

Dalším široce studovaným lektinem je lektin z pšeničných klíčků (aglutinin z *Triticum vulgaris*). Váže se na sacharidy enterocytů i M-buněk Peyerových plaků a byla u něj popsána také endocytóza epiteliálními buňkami.³⁰ Je specifický k N-acetylglukosaminu a sialové kyselině.

Agglutinin rostliny *Ulex europaeus* (hlodáš evropský) je lektin, který se váže na sacharidové komplexy obsahující L-fukosu. Studie Clarka a kolektivu³¹ provedená na myším tenkém střevě prokázala u této látky vysokou specifitu vazby na M-buňky Peyerových plaků. Jsou testovány lipozómy konjugované tímto lektinem jako potenciální nosiče perorální vakcinace.³²

Fazolový lektin (hemaglutinin z *Phaseolus vulgaris*) se specificky váže na galaktosu a N-acetylgalaktosamin. Jeho použití pro perorální terapeutické systémy je problematické, protože u zvířat je silně mitogenní a dieta syrových fazolí vyvolává závažné gastrointestinální problémy. Studie Pusztaiho a kolektivu³³ prokázala jeho odolnost vůči enzymatické degradaci a vazbu na buňky kartáčového lemu ve střevě.

Lektiny ze jmelí (*Viscum album* aglutinin, VAA) jsou cytotoxické látky studované z hlediska jejich protinádorové aktivity. Nejzajímavější je typ VAA-I vázající se na galaktosu, dále se rozlišuje typ VAA-II specifický ke galaktose a N-acetylgalaktosaminu a VAA-III vázající se na N-acetylgalaktosamin, který by mohl být degradačním produktem VAA-I. Lektin ze jmelí, typ I, je potenciální inaktivátor ribozómů a inhibuje tak syntézu proteinů. Po navázání lektinu na sacharidy buněčných membrán je indukována endocytóza. Lektin VAA-I vykazuje jak cytostatický účinek indukci apoptózy, tak imunostimulační efekt daný podmětem k produkci cytokinů. Jak ukazují studie, tyto rozdílné efekty jsou silně závislé na podané dávce. Vyšší dávky VAA-I s cytostatickým/apoptotickým účinkem by mohly být terapeuticky využity k nastavení rovnováhy mezi růstem buněk a naprogramovanou buněčnou smrtí.³⁴

4.3.5. Využití lektinů

Lektiny byly nalezeny u bakterií, rostlin, obratlovců a bezobratlých živočichů.²⁷ Jsou studována jejich četná využití při cílení léčiv do gastrointestinálního traktu, nosní a ústní dutiny, oka, plic a k překonání hematoencefalické bariéry. Velkým přínosem by byla možnost cíleného podání protinádorových léčiv nebo perorální vakcinace. Příhodným místem pro imunizaci perorální cestou jsou M-buňky Peyerových plaků gastrointestinálního traktu, které jsou spojeny s lymfoidní tkání. M-buňky endocytózou a zpracováním makromolekul stimulují imunitní systém k tvorbě protilátek. Lektiny vázající se specificky na M-buňky by tak mohly být využity jako nosiče látek určených ke stimulaci imunitního systému organismu.²⁰

Také v nosní dutině se nachází tkáň asociovaná s lymfoidní tkání pokrytá epiteliální vrstvou M-buněk. Podání vakcín by tak bylo možné i do nosu, nevýhodou je ale krátký retenční čas z důvodu rychlé mukociliární clearance. K prodloužení doby kontaktu jsou studovány četné bioadhezivní polymery (chitosan, karbomery); s použitím lektinů do nosní dutiny je zatím vypracováno málo studií.²⁰ Přehled lektinů a jejich možné využití shrnuje tabulka 4.

Tab. 4: Lektiny a jejich využití při distribuci léčiv v organismu²⁰

Lektin	Zdroj	Specifikace (vazba na sacharid)	Využití
<i>Viscum album</i> aglutinin	jmelí	Gal, GalNAc	targeting do GITu
<i>Lycopersicum esculentum</i> aglutinin	rajče	GlcNAc	targeting do plic
<i>Ricinus communis</i> aglutinin	skočec	Gal	targeting do plic
<i>Urtica dioica</i> aglutinin	kopřiva	GlcNAc	targeting do GITu
<i>Triticum vulgare</i> aglutinin	pšeničné klíčky	GlcNAc, NeuNAc	(a endocytóza), plic, oka, HEB
<i>Galanthus nivalis</i> aglutinin	sněženka	Man	targeting do GITu
<i>Canavalia ensiformis</i> aglutinin	tzv. jack fazole	Man, Glc	
<i>Phaseolus vulgaris</i> aglutinin	fazole	Gal, GalNAc	
<i>Ulex europaeus</i> aglutinin	hlodáš	Fuc	
<i>Bandeira simplicifolia</i> isolektin B ₄	<i>Griffonia</i>	Gal	targeting do nosní sliznice

4.3.6. Faktory limitující perorální podání lektinů

Aplikace léčiv prostřednictvím lektiny modifikovaných terapeutických systémů je omezena zejména toxicitou a imunogenním potenciálem některých lektinů. Vliv má také současně podávaná potrava, k inhibici dochází zejména u lektinů vázajících se na glukosu nebo galaktosu, u lektinů specifických ke komplexním polysacharidům nebo např. u lektinu z pšeničných klíčků nedochází k interakci s potravou. Také u lektinů vázajících se na N-acetylglukosamin nebo kyselinu sialovou je minimální možnost interference. Řada lektinů je také rezistentní vůči proteolytickému štěpení v gastrointestinálním traktu, testy prokázaly vysokou odolnost proti degradaci u rajčatového lektinu a u lektinu z pšeničných klíčků.²³

Toxicita lektinů je známa např. u ricinového hemaglutinu nebo se mohou projevit nežádoucí účinky po konzumaci nedovařených červených fazolí (vliv aglutininu *Phaseolus vulgaris*). Naopak běžná konzumace rajčat nebo obilovin poukazuje na relativní bezpečnost rajčatového lektinu nebo lektinu z pšeničných klíčků. I když asi 30% lidské stravy, v čerstvém nebo vařeném stavu, obsahuje složky s prokázanou hemaglutinační aktivitou (aglutinace erytrocytů) a 53 jedlých rostlin obsahuje lektiny³⁵, konzumace nám v tomto směru nepřináší většinou žádné problémy.

Lektiny mohou také vyvolávat imunitní odpověď organismu. Lektiny představují určité cizorodé proteiny s rigidní strukturou a vysokou molekulovou hmotností, navíc řada z nich odolává enzymatické degradaci v gastrointestinálním traktu a mohou být bioinvazivní. Organismus reaguje na tyto molekuly místně nebo systémově jako na antigeny. Jak ukazují pokusy, ústní podání rajčatového lektinu myším a lidem může vyprovokovat tvorbu specifických protilátek.^{36,37} V krvi zdravých lidí byly nalezeny přirozené protilátky proti rostlinným lektinům, např. sójovému, arašídovému nebo lektinu z pšeničných klíčků.³⁸ Sporně je v tomto případě diskutována schopnost WGA vyvolávat celiakální onemocnění. Zdá se, že spíše než vliv WGA protilátek hrají roli při rozvoji celiakie genetické faktory, nedostatek enzymů a abnormální glykosylace enterocytů.³⁹

Pro perorální podání lektinů bude vhodné minimalizovat případnou imunogenicitu modifikací struktury rekombinantní DNA technologií. Naopak lektiny se specifickými k M-buňkám Peyerových plaků by mohly být využity k imunostimulaci organismu.²³

4.3.7. Jiná přírodní bioadheziva

Kromě protilátek vykazují specifickou adhezivní vazbu také proteiny fibronektin a laminin. Tyto glykoproteiny jsou součástí extracelulární matrix. Bioadhezivní vlastnosti mají také transferrin a ferritin.²⁵

Transferrin je chelatovná bílkovina, hojná v krevní plazmě, vázající a transportující železo. Molekula transferrinu obsahuje oligosacharidové řetězce s kyselinou sialovou schopné vazby na endogenní lektiny. Receptory pro transferrin najdeme na mnohých buňkách v organismu, zejména v játrech a kostní dřeni. Po navázání transferrinu na receptor dochází k endocytóze, a tím k utilizaci železa.⁴⁰

Značné zvýšení počtu transferrinových receptorů je pozorováno v nádorových buňkách. Terapeutické systémy využívající přes transferrinové receptory by tak mohly být využity k specifickému transportu léčiv.²⁵

4.3.8. Historické mezníky v oblasti lektinů

Už na konci 19. století byla prezentována práce mladého vědce H. Stillmarka popisující schopnost ricinu (látky extrahované ze semen skočce obecného) aglutinovat erythrocyty.²⁰ Slovo lektin ale bylo použito až v 50. letech dvacátého století pro popis substance z rostlin, schopné rozlišovat krevní skupiny na základě vazby na různé sacharidové jednotky na povrchu erythrocytů.⁴¹ V 70. letech se významně podílely na výzkumu rostlinných lektinů vědci Sharon a Lis; lektiny se v této době začínají široce používat např. v histopatologii.

V roce 1988 přicházejí s nápadem využít lektiny pro terapeutické systémy léčiv Woodley a Naisbett. Navrhli použít rajčatový lektin pro cílenou vazbu na slizniční povrch tenkého střeva.⁹ Jejich studie s radioaktivně značeným lektinem v *in vitro* testu provedeném na sliznicích krys prokázala silnou vazbu rajčatového lektinu na řadu glykoproteinů mukózních buněk tenkého střeva, ale *in vivo* studie nedopadly příliš přesvědčivě. Příčinou byla vazba lektinu na vrstvu mukusu, který je ve střevě neustále obměňován, a tak nedošlo k dostatečnému kontaktu lektinu s povrchem buněk. Toto zjištění vedlo k pokusům modifikovat lektinem nanočástice nebo lipozómy.²⁰ Ale i u lektinem konjugovaných nanočástic byla některými studii²⁰ prokázána, kromě vazby na slizniční buňky, i výrazná vazba na mucin. Je to dáno tím, že stejné cukerné jednotky pro vazbu lektinů na povrchu buněk tvoří také část struktury mucinu. Jsou proto hledány lektiny, které by se vázaly pouze na enterocyty, nebyly deaktivovány zkříženou vazbou s mucinem a byly netoxické pro organismus.⁶

U částic konjugovaných s lektinem, kde dochází k endocytóze do enterocytů, byla prokázána různými studii zvýšená biologická dostupnost oproti kontrolním vzorkům. Studie provedená Rusell-Josenem a kolektivem⁴², publikovaná v roce 1999, demonstrovala prostup vrstvou buněk (transcytózu) u nanočástic konjugovaných s lektiny z pšeničného klíčku, concanavalinu A (z *Canavalia ensiformis*) a s vazebnou podjednotkou termolabilního toxinu z *E. coli* (LTB). Tato *in vitro* studie tak naznačila možnost zvýšené dostupnosti léčiv v epitelových buňkách nebo v systémové cirkulaci u vhodných lékových formulací konjugovaných s lektiny nebo s využitím lektinů jako specifických nosičů léčiv.²⁰

Yin a kolektiv⁴³ se zabývali výzkumem lektinem konjugovaných nanočástic se zabudovaným imunomodulačním léčivem thymopentinem. Jako modelový lektin byl vybrán aglutinin z pšeničných klíčků, který byl konjugován s polyesterem kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) v poměru 50:50. Tento konjugát byl inkorporován do nanočástic obsahujících thymopentin (syntetický pentapeptid). Vědci při pokusu vyvinuli novou metodu přípravy WGA-PLGA konjugovaných nanočástic a zabudování thymopentinu pomocí emulsně – solventní evaporační techniky. *In-vitro* experiment s prasečím mucinem prokázal, že interakce konjugovaných WGA částic s mucinem byla zhruba 2-4krát větší než u nekonjugovaných nanočástic a že vazba na mucin byla významně snížena při přítomnosti komplementárního cukru k danému lektinu. Ale výsledky *in-vivo* pokusu prokázaly u imunosupresivních krys významný imunomodulační efekt podávaných konjugovaných WGA-thymopentin nanočástic oproti perorálnímu podání samotného thymopentinu nebo nanočástic s thymopentinem.

Studie⁴³ tak naznačila, že při p.o. podání nanočástic konjugovaných s lektinem se mohou čtené částice, díky bioadhezi a receptorem zprostředkované endo- a transcytóze, dostat do lymfatických orgánů a eventuálně vstoupit do systémové cirkulace. Dále byla publikována korelace mezi zvýšeným obsahem WGA v nanočásticích a zvýšenou absorpcí. Zdá se, že na tomto výsledku má vliv nejen větší uptake nanočástic, ale i větší ochrana thymopentinu před degradací. Začleněním thymopentinu do nanočástic, tvořených pevnou polymerní matricí a obklopených lektiny, se snížilo vystavení léčiva změnám pH a enzymatické degradaci. Studie tak potvrdila, že u lektinem konjugovaných PLGA nanočástic se zvýšila intestinální absorpce thymopentinu. Nabízí se tak zde velmi efektivní forma perorálního podání, zvláště pro peptidy nebo proteiny.

Do budoucna se počítá i s možností některé lektiny na molekulární úrovni cíleně změnit za pomoci genové technologie, dokonce i vytvořit adhezivní a invazivní faktory určitých kmenů bakterií ve vysoké čistotě a výtěžku, nebo získat méně imunogenní proteiny. Po připojení takovýchto molekulových struktur na povrch koloidních nosičových systémů léčiv (např. lipozómů nebo nanočástic) bychom získali nové, relativně bezpečné a cílené bioadhezivní, resp. bioinvazivní nosiče léčiv.³

5. Experimentální část

5.1. Použité suroviny

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

1D = Oligoester kys. D,L – mléčné a glykolové s 1 % dipentaerythritolu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

2D = Oligoester kys. D,L – mléčné a glykolové s 2 % dipentaerythritolu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

3D = Oligoester kys. D,L – mléčné a glykolové s 3 % dipentaerythritolu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

5D = Oligoester kys. D,L – mléčné a glykolové s 5 % dipentaerythritolu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

8D = Oligoester kys. D,L – mléčné a glykolové s 8 % dipentaerythritolu v reakční směsi ve funkci větvicí složky (FaF UK HK)

Aceton čistý (Penta, výrobní divize Chrudim)

Aciklovir (Pliva Lachema)

Azid sodný (Fluka)

Čištěná voda (FaF UK HK)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner Neratovice)

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

PLGA = Oligoester kys. D,L - mléčné a glykolové v poměru 50:50 (FaF UK HK)

Triethylcitrát (Merck Mnichov)

5.2. Použité přístroje

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

Biologický termostat BT 120

Brookfieldův digitální viskozimetr model DV – E

Digitální pH-metr HANNA pH 221

Digitální váhy KERN 440-33, max. 200g, d = 0,01g

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

Horkovzdušná sušárna ULE 400, Memmert

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

Spektrofotometr HELIOS GAMA (UV/VIS), Unicam

5.3. Charakteristika testovaných oligoesterů

Byly testovány oligoestery kyseliny D,L-mléčné a glykolové s dipentaerythritolem ve funkci větvičí složky. Tyto oligomery byly syntetizovány polykondenzační reakcí na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Koncentrace dipentaerythritolu v reakční směsi byla 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5% a 8% (označení 0,5D, 1D, 2D, 3D, 5D a 8D).

Tab. 5: Charakterizace použitých oligoesterů

Označení polymeru	Poměr LA/GA/D [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	M_w/M_n	T_g [°C]	Stupeň větvení $M_{w(sec)}/M_w$
PLGA	50/50/0	1833	4086	2,23	17,0	1,50
0,5D	49,75/49,75/0,5	2200	4000	1,8	17,7	0,70
1D	49,5/49,5/1,0	2500	5700	2,28	16,1	0,58
2D	49,0/49,0/2,0	4300	6600	1,53	17,9	0,52
3D	48,5/48,5/3,0	3600	5300	1,5	27,3	1,04
5D	47,5/47,5/5,0	1900	2300	1,2	16,3	1,38
8D	46,0/46,0/8,0	1400	1700	1,2	12,5	0,94

5.4. Příprava vzorků

Oligoesterové nosiče byly z důvodu snížení viskozity plastifikovány 10% triethylcitrátu (TEC). Bylo připraveno 10,0 g plastifikovaného oligoesteru.

Oligoester (0,5D až 8D)	9,0 g
Triethylcitrát	1,0 g

Oligoestery byly nejprve desintegrovány na menší kousky. Do malé kádinky (25 ml) bylo naváženo 9,0 g oligoesteru. Oligoester byl roztaven v horkovzdušné sušárně při teplotě 70-80°C. K tavenině byl pipetou přidán 1,0 g triethylcitrátu a směs byla důkladně zhomogenizována kovovou kopistkou.

Pokud bylo třeba oligoester během homogenizace znovu natavit, kádinka byla na krátkou dobu umístěna do horkovzdušné sušárny. Po ukončení homogenizace byla kádinka označena, zakryta alobalem a dána do exsikátoru.

Stejným způsobem byl připraven vzorek tvořený lineárním oligoesterem kyseliny D,L - mléčné a glykolové (PLGA) se zastoupením kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v poměru 50:50. Tento nosič byl plastifikován rovněž 10% triethylcitrátu. Vzorek plastifikovaného nevětveného nosiče sloužil pro porovnání adhezivních a reologických vlastností s větvenými nosiči.

PLGA	9,0 g
Triethylcitrát	1,0 g

Pro stanovení disoluce modelové léčivé látky z větvených nosičů byly připraveny vzorky se 4% acikloviru. Aciklovir byl inkorporován do předem připravených plastifikovaných oligoesterů 0,5D, 1D a 2D s 10% triethylcitrátu. Z toho byly formovány na dno scintilačních lahvíček matrice o hmotnosti 150,0 mg.

0,5D/ 1D/2D + 10% TEC	1,35 g
Aciklovir	0,0563 g

Plastifikovaný oligoester byl roztaven v sušárně při 70-80°C. Do malé kádinky (10 ml) bylo naváženo 1,35 g roztaveného oligoesteru (nadbytečné množství z důvodu ztrát při přípravě) a bylo přidáno 0,0563 g mikronizovaného acikloviru, předem naváženého na analytických vahách. Směs oligoesteru a aciklovirem byla důkladně zhomogenizována kovovou kopistkou. Pokud bylo třeba oligoester během homogenizace znovu natavit, kádinka byla na krátkou dobu umístěna do horkovzdušné sušárny při teplotě 60°C. Z připraveného vzorku s aciklovirem bylo naváženo po 150,0 mg do třech scintilačních lahvíček. Vzorek byl rovnoměrně rozprostřen po dně scintilační lahvíčky.

5.5. Měření adheze

Adheze byla měřena na Materiálovém zkušebním stroji firmy Zwick/Roell. Pro hodnocení adhezivních vlastností oligoesterů byla zaznamenána síla F_{\max} potřebná pro odtržení horní mobilní kontaktní plochy se vzorkem od dolní fixní kontaktní plochy. Pro vyjádření adhezivity oligoesterů byla průměrná síla $\bar{\Phi}F_{\max}$ přepočítána na velikost kontaktní plochy (průměr $d=28,04$ mm, $S=617,51$ mm²) – hodnota F/S .

Byly proměřeny oligoestery 0,5D až 8D plastifikované 10% triethylcitrátu a lineární PLGA plastifikovaný 10% triethylcitrátu.

1. Nejprve byl zapnut zkušební stroj, poté počítač a byly zkontrolovány nastavené parametry.
2. Na horní kontaktní plochu byla rovnoměrně nanесena kovovou kopistkou tenká vrstva vzorku (0,4-0,6 g u vzorků 0,5D až 8D a cca 0,3 g PLGA). Byla nastavena vzdálenost horní čelisti (pozice LE) na 25 mm, vynulována síla a spuštěn test.
3. Horní plocha se pohybovala směrem dolů rychlostí 25 mm/min do okamžiku, kdy se přiblížila k dolní ploše na zkušební vzdálenost 5 mm. Poté se rychlost snížila na 10 mm/min a klesání pokračovalo, dokud se plochy nedostaly do kontaktu.
4. Doba kontaktu byla 60 sekund při zatížení 5 N.
5. Po této době se horní plocha se vzorkem odtrhla rychlostí 300 mm/min a snímač síly zaznamenal sílu F_{max} .
6. Po ukončení testu byl kovovou kopistkou z obou kontaktních ploch odstraněn změřený vzorek, plochy byly důkladně vyčištěny acetonem a byl nanесen další vzorek.
7. Bylo provedeno deset měření při nastavení stejných parametrů.

5.6. Měření viskozity

Dynamická viskozita byla měřena v Brookfieldově digitálním viskozimetru - typ DV-E s adaptérem pro malé množství vzorků při teplotě 50°C. K měření bylo použito vřeteno č.14. Byly proměřeny všechny větvené oligoestery plastifikované 10% triethylcitrátu (0,5D až 8D) a lineární PLGA plastifikovaný 10% triethylcitrátu.

1. Byla zapnuta vodní lázeň a vyčkalo se na její vyhřátí na teplotu 50°C.
2. Oligoester byl roztaven v sušárně při 70-80°C a umístěn do adaptéru pro malá množství vzorku. Vzorek byl temperován v přístroji na 50°C po dobu asi 20 minut.
3. Byla nastavena nejnižší rychlost rotace – hodnota RPM (počet otáček vřetena za minutu), konkrétně RPM 0,3, a byl spuštěn motor.
4. Po pěti otáčkách vřetena ve vzorku byla zaznamenána hodnota dynamické viskozity η (mPa.s) a kroutící moment (procentuální hodnota) zobrazené

na displeji. Pro dosažení přesnosti výsledků nebyly započítávány údaje pod 10% kroutícího momentu.

5. Po proměření v celém rozsahu RPM bylo zastaveno otáčení vřetena, změřený vzorek byl odstraněn z adaptéru a vřeteno i adaptér byly důkladně vyčištěny acetonem.
6. Následně byl vpraven další vzorek a celý postup měření byl zopakován stejným způsobem.

5.7. Disoluce acikloviru

5.7.1. Příprava liberačního média

Při disoluci acikloviru z oligoesterových matric bylo použito jako liberační médium fosfát citrátový pufr pH 7,0. Podle chemických tabulek se 1000 ml pufru připraví smícháním x dílů roztoku A a $(100-x)$ dílů roztoku B. Konkrétně pro fosfát citrátový pufr o pH 7,0 je potřeba 19 dílů (190 ml) monohydrátu kyseliny citrónové (21,014 g/l) a 81 dílů (810 ml) dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného (35,60 g/l). **Roztok A** tedy obsahuje 3,99 g monohydrátu kyseliny citrónové ve 190 ml vody (0,1 mol/l), roztok B 28,84 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného v 810 ml vody (0,2 mol/l). Protože ale při přípravě pufru nebyl k dispozici dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného, ale dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, bylo nutné přepočítat hmotnost na dodekahydrát (M_m dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného je 178,14 g/mol; M_m dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného je 358,14 g/mol). **Roztok B** byl tak připraven z 57,97 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného v 810 ml vody. Po rozpuštění obou látek ve vodě a smíchání roztoku A a B byl do pufru jako antimikrobní přísada přidán azid sodný v množství 0,02 g na 1000 ml pufru. Na závěr byla zkontrolována hodnota pH digitálním pH metrem (byla potvrzena hodnota pH 7,0, nebylo třeba korigovat pH přidáním kyseliny citrónové nebo hydrogenfosforečnanu disodného).

5.7.2. Kalibrační přímka

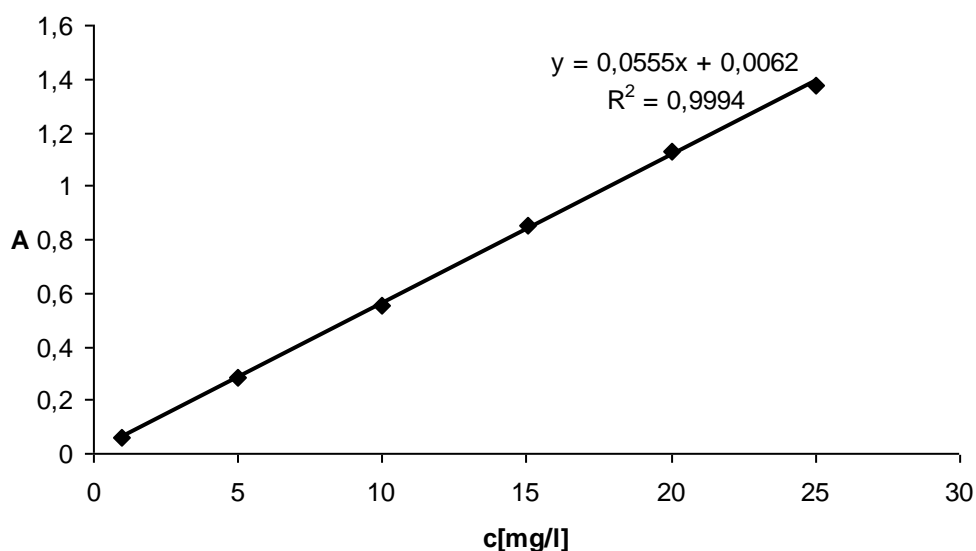
Absorpční maximum acikloviru ve fosfát citrátovém pufru o pH 7,0 je při 256 nm, absorbance tedy byla měřena při této vlnové délce. Pro sestavení kalibrační křivky bylo připraveno 6 roztoků o rostoucí koncentraci acikloviru (tab. 6).

Z naměřených hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační přímka, zjištěna její rovnice a hodnota korelačního koeficientu.

Tab. 6: Absorbance roztoků acikloviru o různé koncentraci

Koncentrace acikloviru c [mg/l]	Absorbance A
1	0,059
5	0,284
10	0,551
15	0,851
20	1,131
25	1,377

Obr. 2: Kalibrační přímka



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

5.7.3. Průběh disolučního testu

Scintilační lahvičky se vzorky byly zality 15,0 g fosfát citrátového pufru a za statických podmínek uchovávány v termostatu při 37°C. Ve stanovených časových intervalech (zpočátku 3 hodiny, 6 hodin a 24 hodinové intervaly) bylo disoluční

médium odebíráno ze scintilačních lahvíček, vzorky byly znovu zality 15,0 g pufru a umístěny zpět do termostatu. Disoluční médium muselo být odléváno ze scintilačních lahvíček velmi opatrně, protože vzorky bobtnaly a u některých došlo i k fragmentaci na různě velké části.

Intervaly odebírání disoluční tekutiny byly postupně prodlužovány dle množství průběžně uvolněného léčiva. Disoluce byla ukončena, pokud se z matric uvolnilo veškeré množství inkorporovaného acikloviru, nebo se aciklovir již neuvolňoval.

5.7.4. Výpočet množství uvolněného léčiva

Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace uvolněného acikloviru (ACV) v mg/l (x_1). Vypočtená koncentrace v mg/l byla převedena na koncentraci ACV v 15 ml disoluční tekutiny (x_2). Byl zjištěn procentuální podíl uvolněného ACV z celkového množství ACV v matrici ($x_{\%}$). V průběhu liberace byla počítána kumulativní procenta uvolněného ACV. Průběh liberace léčiva byl zaznamenán graficky jako závislost kumulativních procent uvolněného léčiva na čase.

Rovnice kalibrační přímky:

$$y = 0,0555x + 0,0062$$

Výpočet uvolněného acikloviru:

$$x_1 = \frac{y - 0,0062}{0,0555}$$

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

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

x_1koncentrace uvolněného ACV [mg/l]

x_2koncentrace ACV v 15 ml disolučního média [mg/l]

$x_{\%}$podíl liberovaného ACV [%]

D.....ředění vzorku

m_nnavážka matrice [mg]

y.....absorbance

6. Výsledky

6.1. Tabulky

6.1.1. Měření adheze

Tab. 7: Adhezivní síla oligoesteru **0,5D** plastifikovaného 10% TEC

Měření č.	F max[N]	ØF max[N]	s[N]	F/S[mN/mm ²]	s/S[mN/mm ²]
1	12,81	14,98	1,74	24,26	2,82
2	13,05				
3	13,23				
4	17,35				
5	14,29				
6	13,86				
7	16,04				
8	15,64				
9	17,34				
10	16,15				

Tab. 8: Adhezivní síla oligoesteru **1D** plastifikovaného 10% TEC

Měření č.	F max[N]	ØF max[N]	s[N]	F/S[mN/mm ²]	s/S[mN/mm ²]
1	12,44	8,78	2,90	14,22	4,70
2	8,82				
3	4,05				
4	6,17				
5	11,30				
6	6,66				
7	9,17				
8	12,63				
9	10,10				
10	6,44				

Tab. 9: Adhezivní síla oligoesteru **2D** plastifikovaného 10% TEC

Měření č.	F max[N]	ØF max[N]	s[N]	F/S[mN/mm ²]	s/S[mN/mm ²]
1	47,85	45,21	3,53	73,21	5,72
2	42,19				
3	48,09				
4	41,31				
5	47,07				
6	52,14				
7	41,12				
8	44,75				
9	44,13				
10	43,46				

Tab. 10: Adhezivní síla oligoesteru **5D** plastifikovaného 10% TEC

Měření č.	F max[N]	ØF max[N]	s[N]	F/S[mN/mm ²]	s/S[mN/mm ²]
1	231,25	216,07	12,84	349,90	20,79
2	228,24				
3	228,47				
4	202,96				
5	202,36				
6	224,07				
7	205,71				
8	228,31				
9	206,93				
10	202,38				

Tab. 11: Adhezivní síla oligoesteru **8D** plastifikovaného 10% TEC

Měření č.	F max[N]	ØF max[N]	s[N]	F/S[mN/mm ²]	s/S[mN/mm ²]
1	159,42	159,10	8,91	257,65	14,43
2	150,23				
3	167,47				
4	148,38				
5	160,56				
6	155,18				
7	175,34				
8	157,02				
9	149,61				
10	167,75				

Obr. 3: Vzor protokolu testu adheze

Zk. parametry:

Zkoušel(a) : Třešňáková Jitka
 Materiál : 5D+10%TEC
 Snímač síly : 2,5kN
 Jiná rychlost pro odlehčení : 300 mm/min
 Prodleva na ref. hodn. síly při zatěžování: 1:60
 Definování síly pro zatížení : 1:5

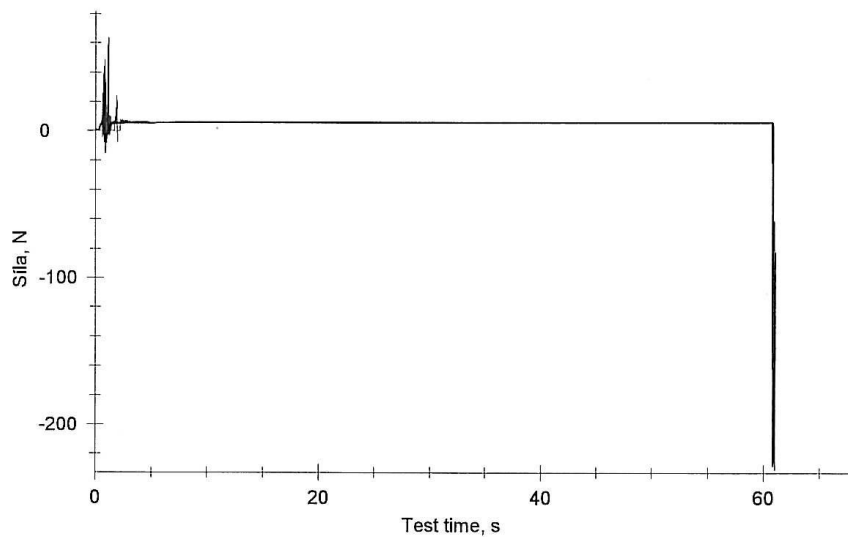
Výsledky:

Nr	Fa max. N
1	-231,25
2	-228,24
3	-228,47
4	-202,96
5	-202,36
6	-224,07
7	-205,71
8	-228,31
9	-206,93
10	-202,38

Statistika:

Série n = 10	Fa max. N
\bar{x}	-216,07
s	12,84
v	-5,94

Grafické záznamy zkoušek:



6.1.2. Měření viskozity

Tab. 12: Dynamická viskozita η [Pa.s] plastifikovaných oligoesterů

RPM	0,5D	1D	2D	3D	5D	8D	PLGA
ot./min	η [Pa.s]	η [Pa.s]	η [Pa.s]	η [Pa.s]	η [Pa.s]	η [Pa.s]	η [Pa.s]
0,3	1154,0	1654,0	417,0	2896,0			2437,0
0,5	1145,0	1630,0	420,0				2410,0
0,6	1146,0	1615,0	415,0				
1	1105,0		420,0				
1,5			423,3		125,8	75,8	
2			421,9		125,0	76,3	
2,5			419,5		125,0	76,5	
3					124,2	76,7	
4					123,4	76,6	
5					123,5	76,3	
6					123,1	75,8	
10					120,8	74,9	
12						74,5	
průměr	1137,5	1633,0	419,5	2896,0	123,9	75,9	2423,5

6.1.3. Měření disoluce

Tab. 13: Liberace acikloviru z oligoesteru **0,5D** plastifikovaného 10% TEC

Čas [dny]	A	Ředění	ACV [mg]	ACV [%]	Průměr	Kumulativní %
0,125	0,798	10	2,140	35,06	34,61	34,61
	0,892	10	2,394	40,58		
	0,649	10	1,737	28,20		
0,25	0,453	10	1,208	19,78	15,93	50,54
	0,292	10	0,772	13,09		
	0,346	10	0,918	14,91		
1	0,962	10	2,583	42,32	36,12	86,66
	0,748	10	2,005	33,98		
	0,737	10	1,975	32,06		
2	0,414	10	1,102	17,89	18,56	105,23
	0,512	10	1,367	22,19		
	0,362	10	0,962	15,61		
3	0,290	2	0,153	2,49	4,14	109,37
	0,900	2	0,483	7,84		
	0,245	2	0,129	2,10		

Tab. 14: Liberace acikloviru z oligoesteru **1D** plastifikovaného 10% TEC

Čas [dny]	A	Ředění	ACV [mg]	ACV [%]	Průměr	Kumulativní %
0,125	0,435	10	1,159	19,58	21,52	21,52
	0,414	10	1,102	18,44		
	0,578	10	1,545	26,55		
0,25	0,588	2	0,314	5,31	6,14	27,67
	0,461	2	0,246	4,11		
	0,975	2	0,524	9,00		
1	0,679	10	1,818	30,72	25,92	53,59
	0,592	10	1,583	26,49		
	0,449	10	1,197	20,56		
2	0,563	10	1,505	25,86	29,01	82,60
	0,833	10	2,235	38,40		
	0,497	10	1,326	22,79		
3	0,507	5	0,677	11,63	8,18	90,79
	0,331	5	0,439	7,54		
	0,238	5	0,313	5,38		
4	0,884	1	0,237	4,08	3,20	93,99
	0,955	1	0,256	4,41		
	0,247	1	0,065	1,12		
7	0,873	1	0,234	4,03	3,98	97,96
	0,799	1	0,214	3,68		
	0,915	1	0,246	4,22		
10	1,183	1	0,318	5,46	3,26	101,23
	0,565	1	0,151	2,59		
	0,378	1	0,100	1,73		
14	0,338	1	0,090	1,54	1,59	102,81
	0,586	1	0,157	2,69		
	0,120	1	0,031	0,53		

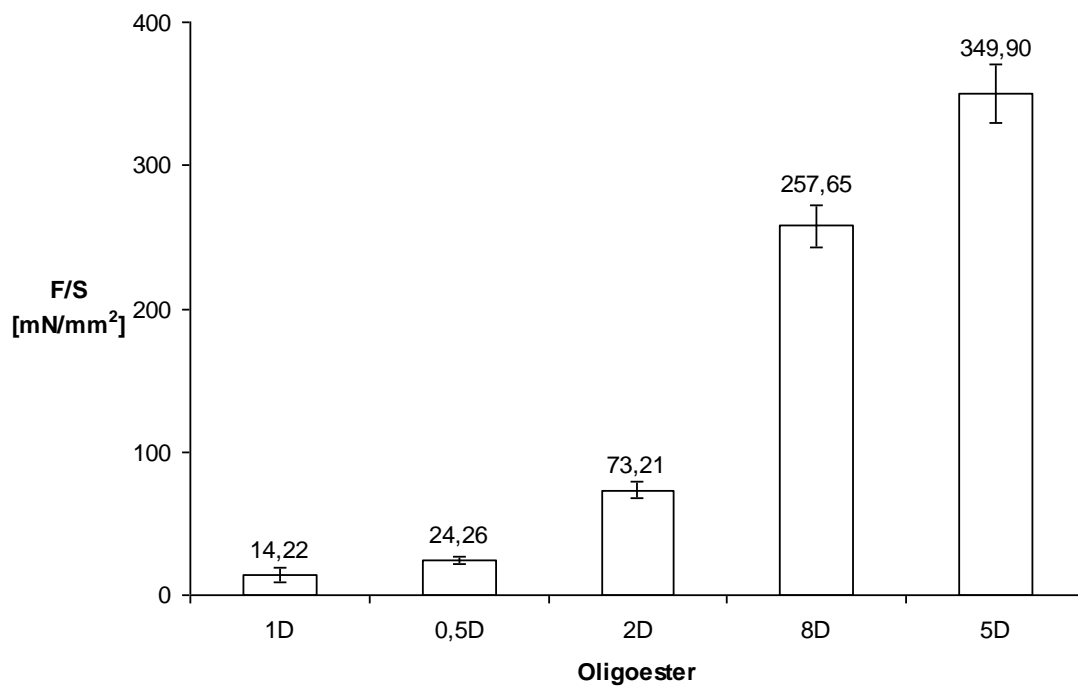
Tab. 15: Liberace acikloviru z oligoesteru **2D** plastifikovaného 10% TEC

Čas [dny]	A	Ředění	ACV [mg]	ACV [%]	Průměr	Kumulativní %
0,125	0,575	10	1,575	26,03	25,36	25,36
	0,550	10	1,503	25,60		
	0,531	10	1,449	24,45		
0,25	0,763	5	1,055	17,44	16,35	41,71
	0,698	5	0,962	16,39		
	0,656	5	0,903	15,23		
1	0,480	10	1,304	21,56	22,83	64,55
	0,505	10	1,375	23,42		
	0,485	10	1,318	22,24		
2	0,525	2	0,286	4,83	4,70	69,25
	0,537	2	0,293	4,95		
	0,473	2	0,257	4,33		
3	0,397	1	0,107	1,80	2,17	71,42
	0,522	1	0,142	2,40		
	0,504	1	0,137	2,32		
4	0,841	1	0,233	3,93	3,90	75,32
	0,873	1	0,242	4,09		
	0,787	1	0,218	3,67		
7	0,241	10	0,624	10,52	8,88	84,20
	0,360	5	0,481	8,12		
	0,355	5	0,474	8,00		
10	1,030	1	0,287	4,84	4,91	89,12
	1,018	1	0,284	4,78		
	1,088	1	0,303	5,12		
14	1,343	1	0,376	6,34	5,71	94,82
	1,268	1	0,355	5,98		
	1,020	1	0,284	4,79		
17	0,881	1	0,245	4,13	3,72	98,55
	0,488	1	0,133	2,24		
	1,023	1	0,285	4,81		
21	0,973	1	0,271	4,57	3,00	101,55
	0,221	1	0,057	0,96		
	0,746	1	0,206	3,48		
28	0,023	1	0,000	0,01	0,78	102,33
	0,058	1	0,010	0,17		
	0,471	1	0,128	2,16		

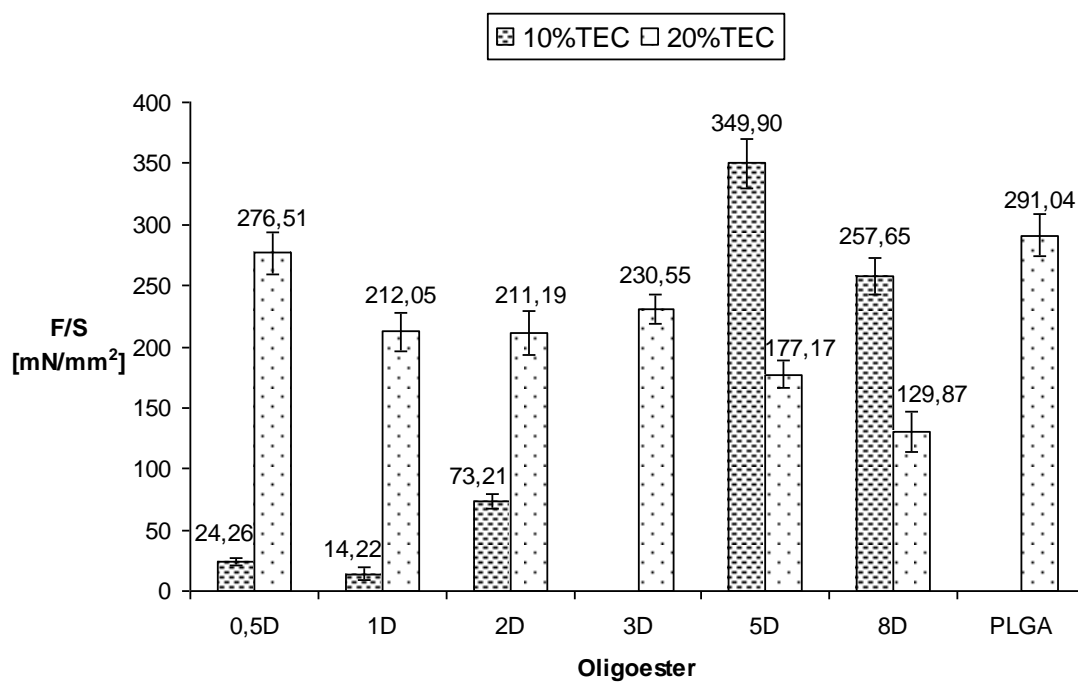
6.2. Grafy

6.2.1. Adhezivní síla

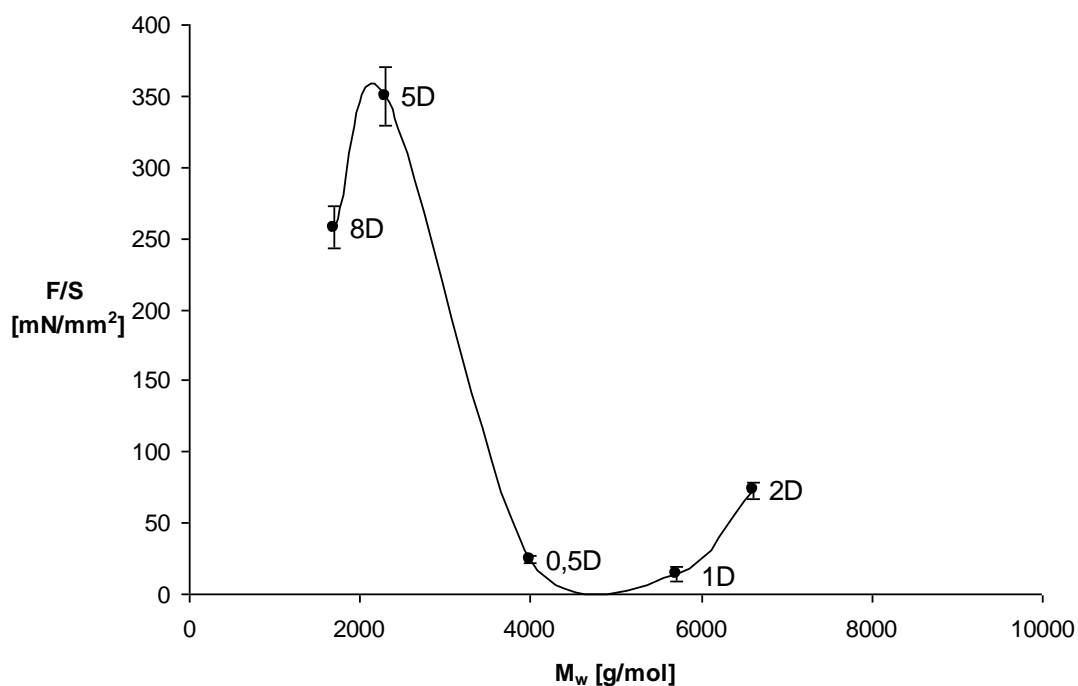
Obr. 4: Adhezivita oligoesterů plastifikovaných 10 % TEC



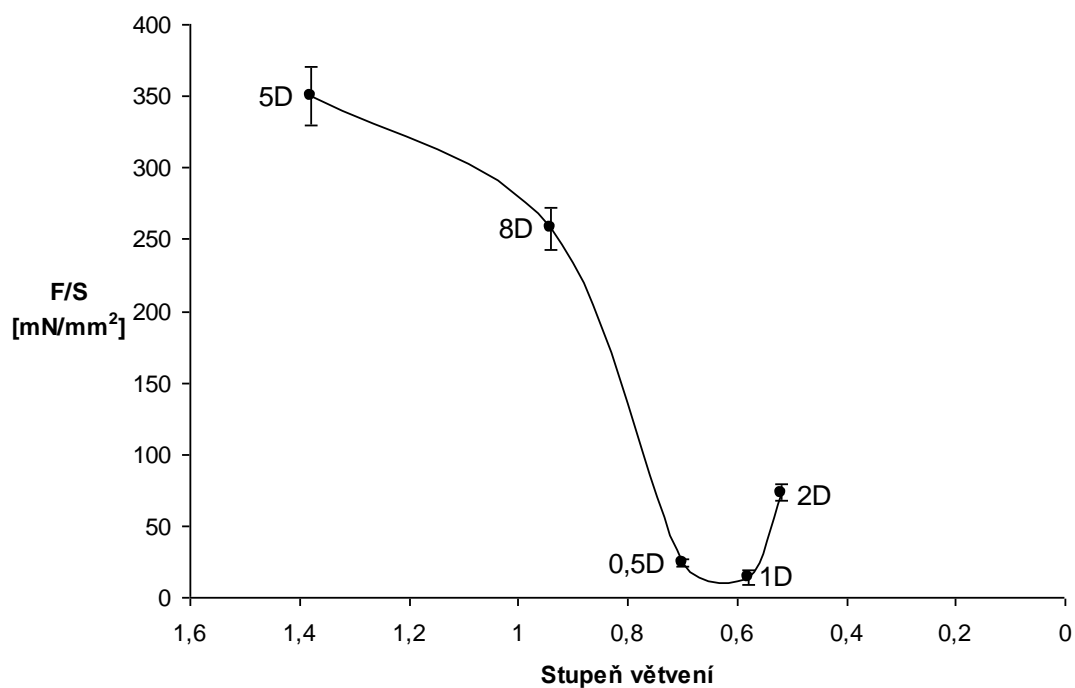
Obr. 5: Porovnání adhezivní síly oligoesterů plastifikovaných 10% a 20% TEC⁴⁴



Obr. 6: Závislost adhezivní síly oligoesterů plastifikovaných 10 % TEC na molární hmotnosti oligoesteru

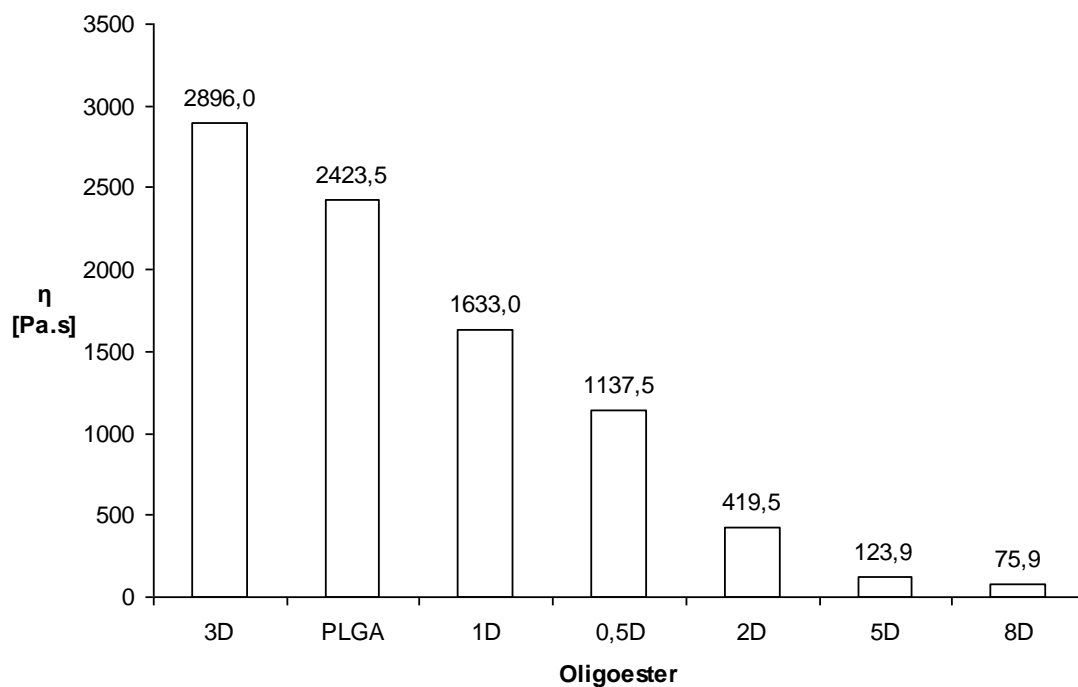


Obr. 7: Závislost adhezivní síly oligoesterů plastifikovaných 10 % TEC na stupni větvení oligoesteru

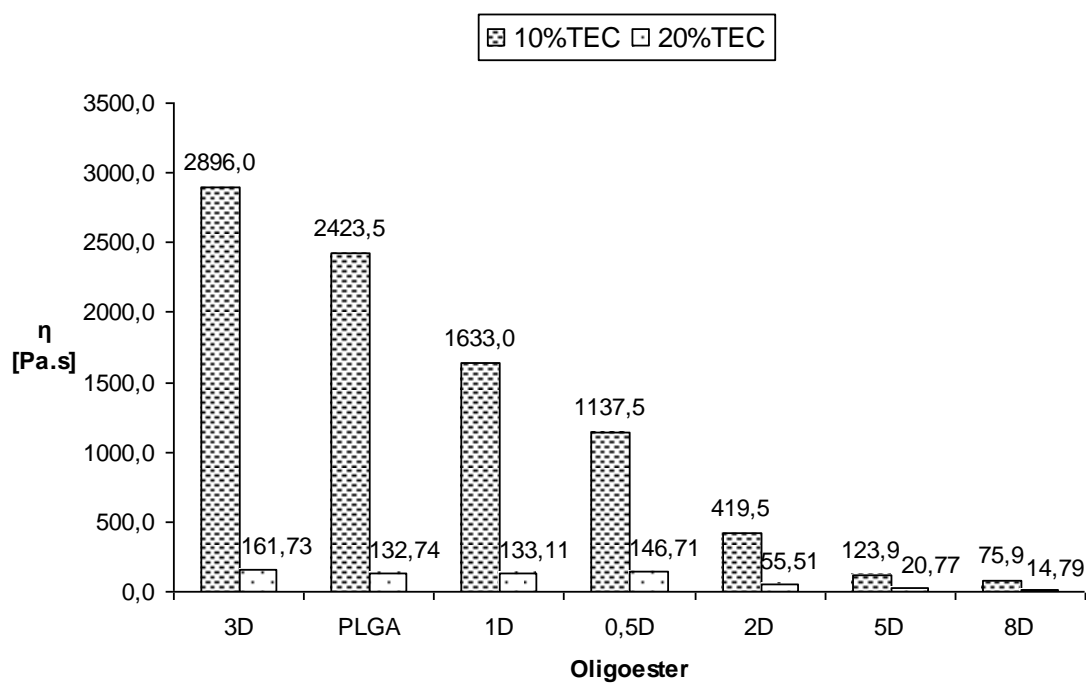


6.2.2. Dynamická viskozita

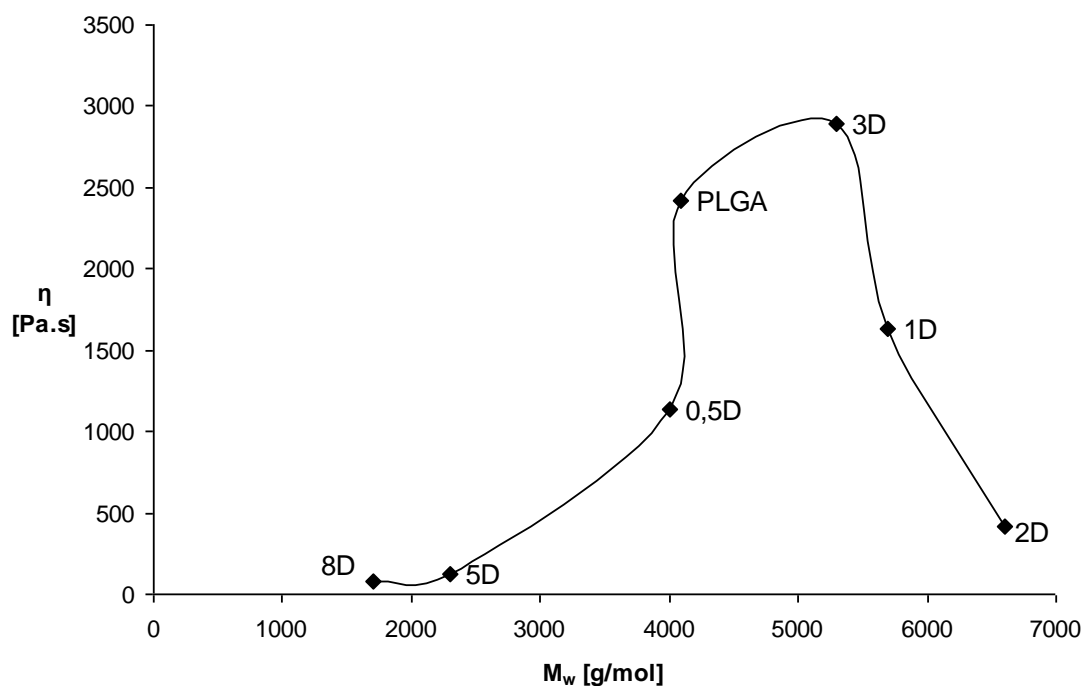
Obr. 8: Dynamická viskozita oligoesterů plastifikovaných 10 % TEC



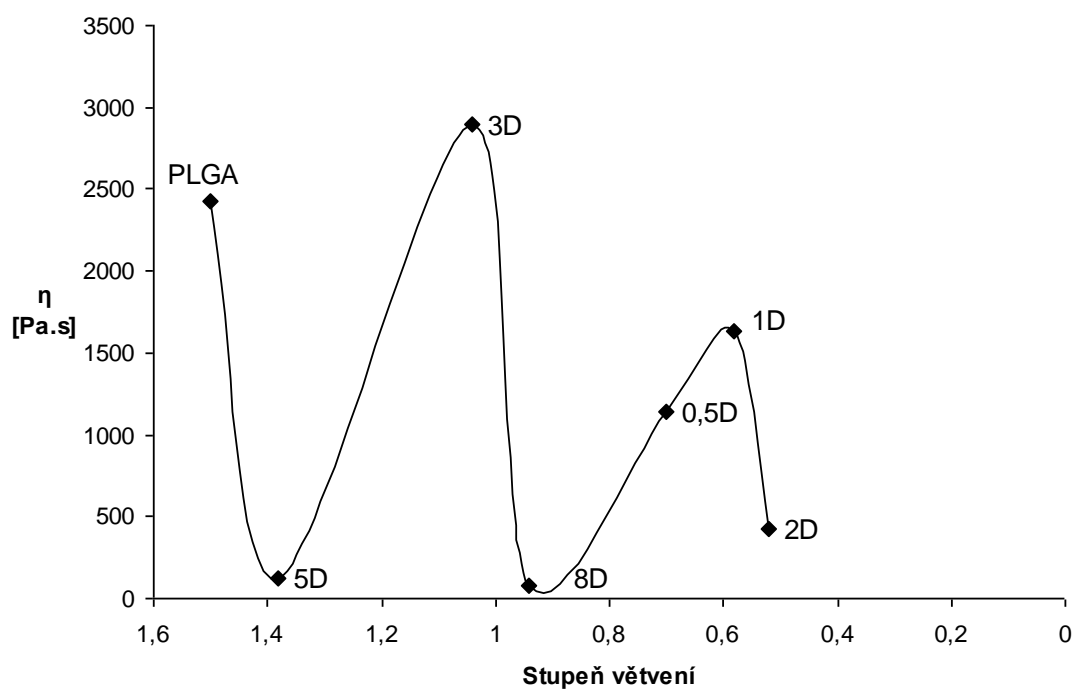
Obr. 9: Porovnání dynamické viskozity oligoesterů plastifikovaných 10% a 20% TEC⁴⁴



Obr. 10: Závislost dynamické viskozity oligoesterů plastifikovaných 10 % TEC na molární hmotnosti oligoesteru

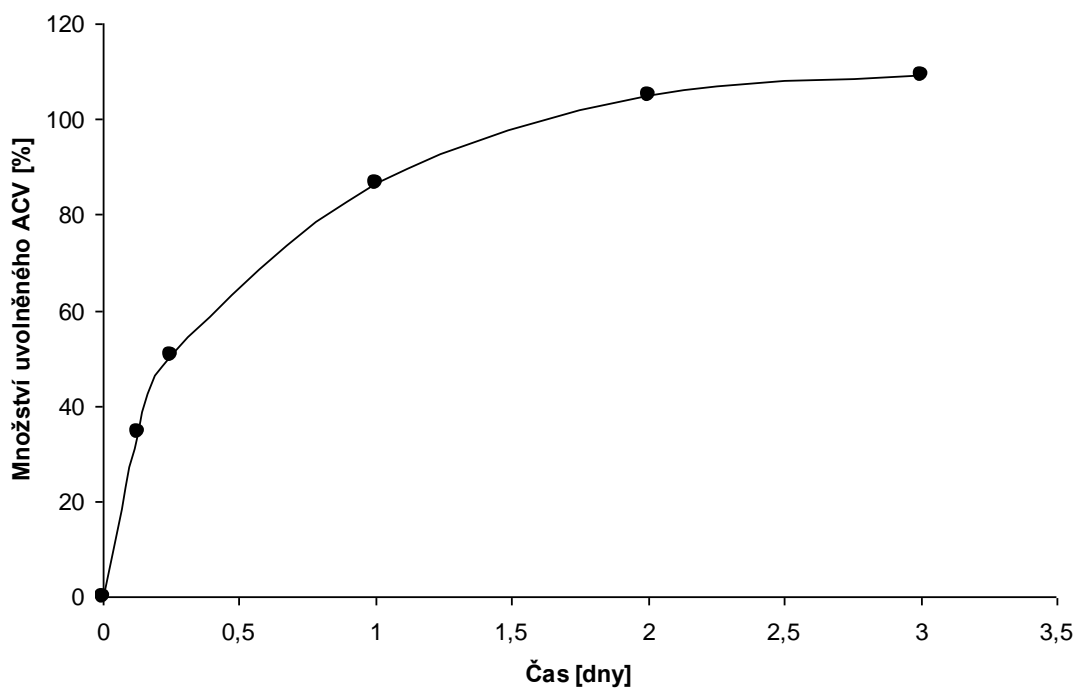


Obr. 11: Závislost dynamické viskozity oligoesterů plastifikovaných 10 % TEC na stupni větvení oligoesteru

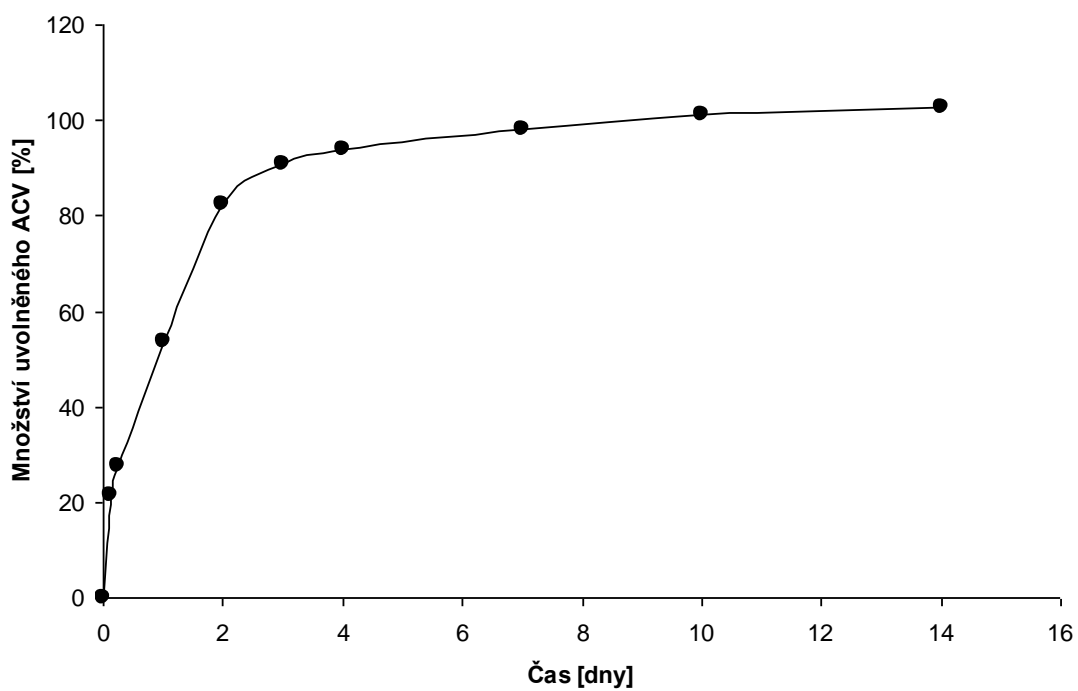


6.2.3. Disoluce acikloviru

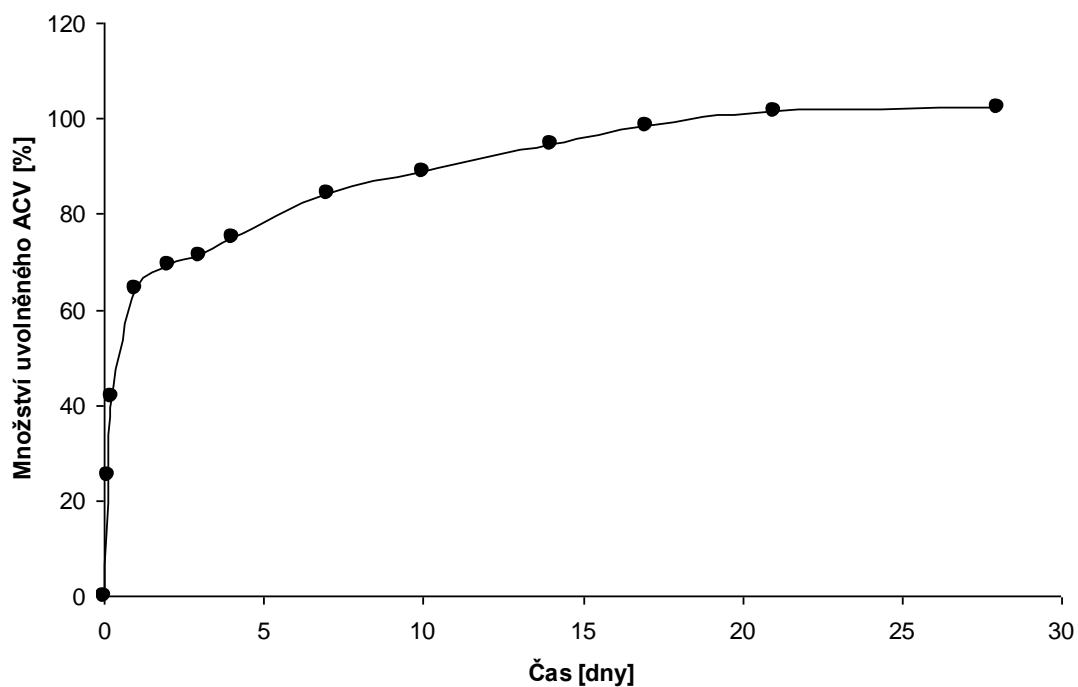
Obr. 12: Liberace acikloviru z oligoesteru **0,5D** plastifikovaného 10% TEC



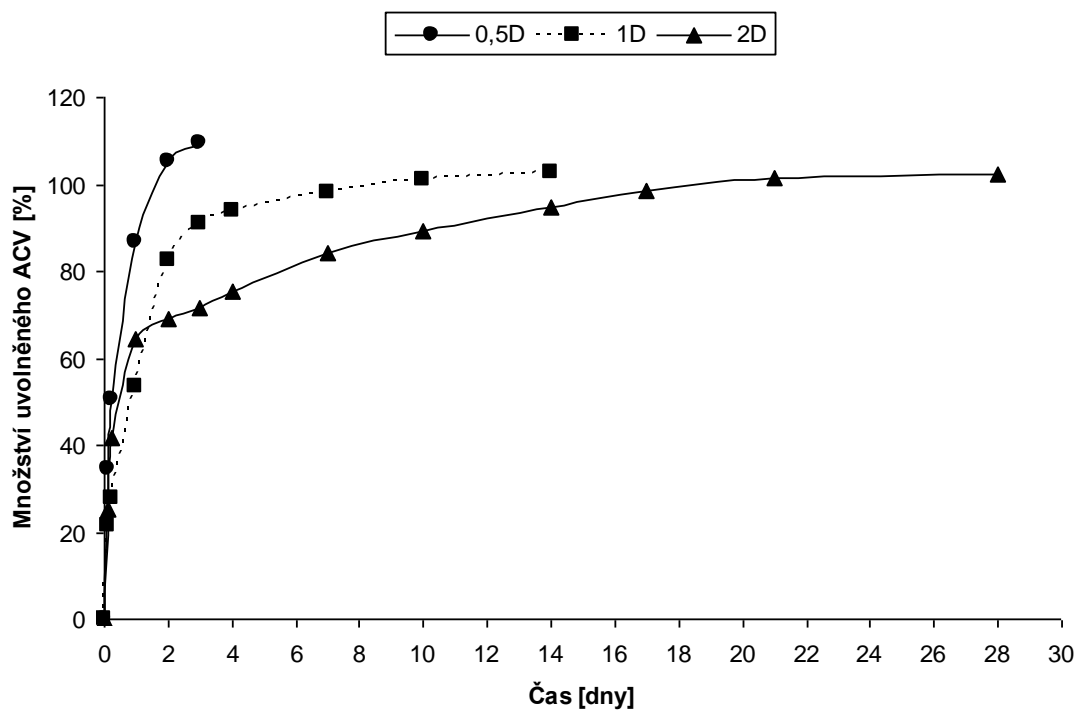
Obr. 13: Liberace acikloviru z oligoesteru **1D** plastifikovaného 10% TEC



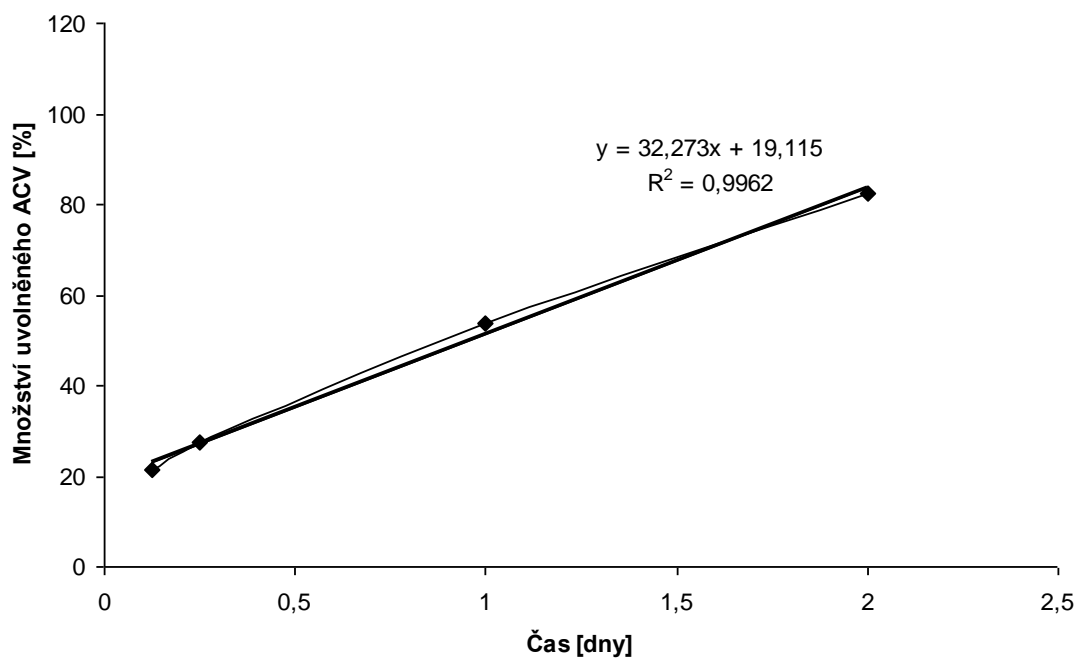
Obr. 14: Liberace acikloviru z oligoesteru **2D** plastifikovaného 10% TEC



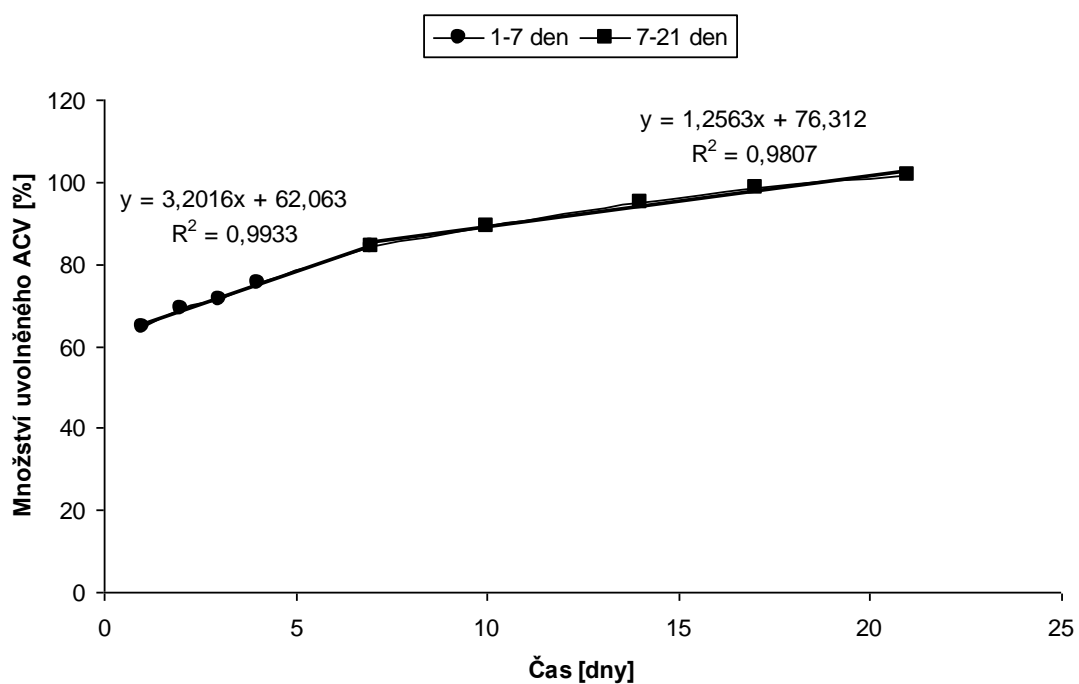
Obr. 15: Porovnání liberace acikloviru z testovaných oligoesterů



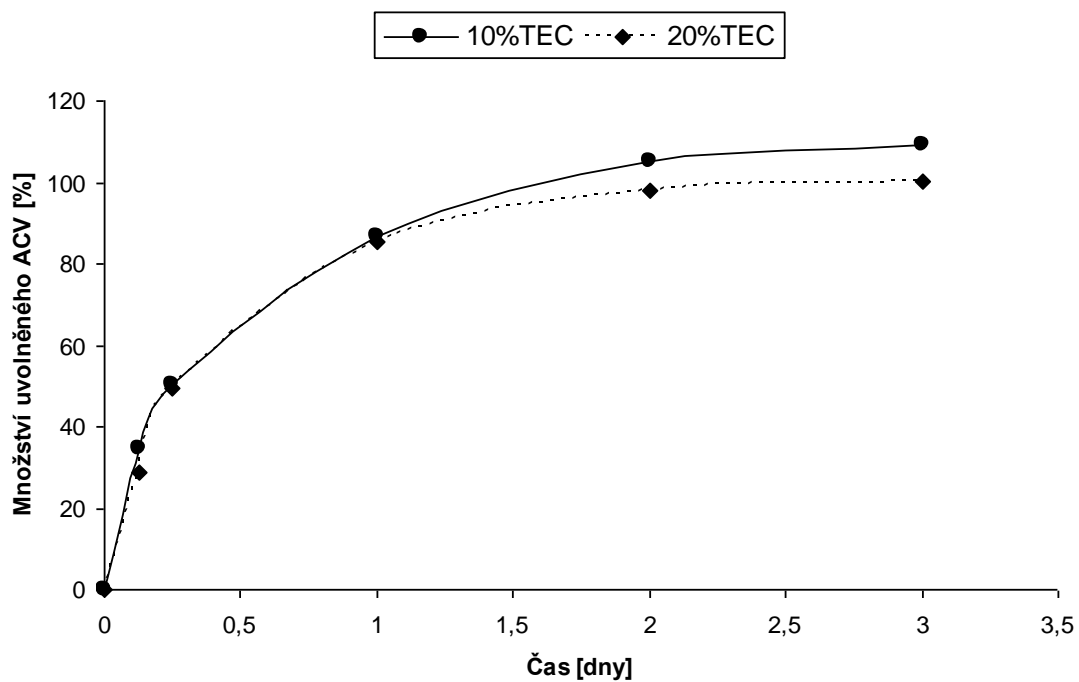
Obr. 16: Lineární fáze liberace acikloviru z oligoesteru **1D** plastifikovaného 10% TEC



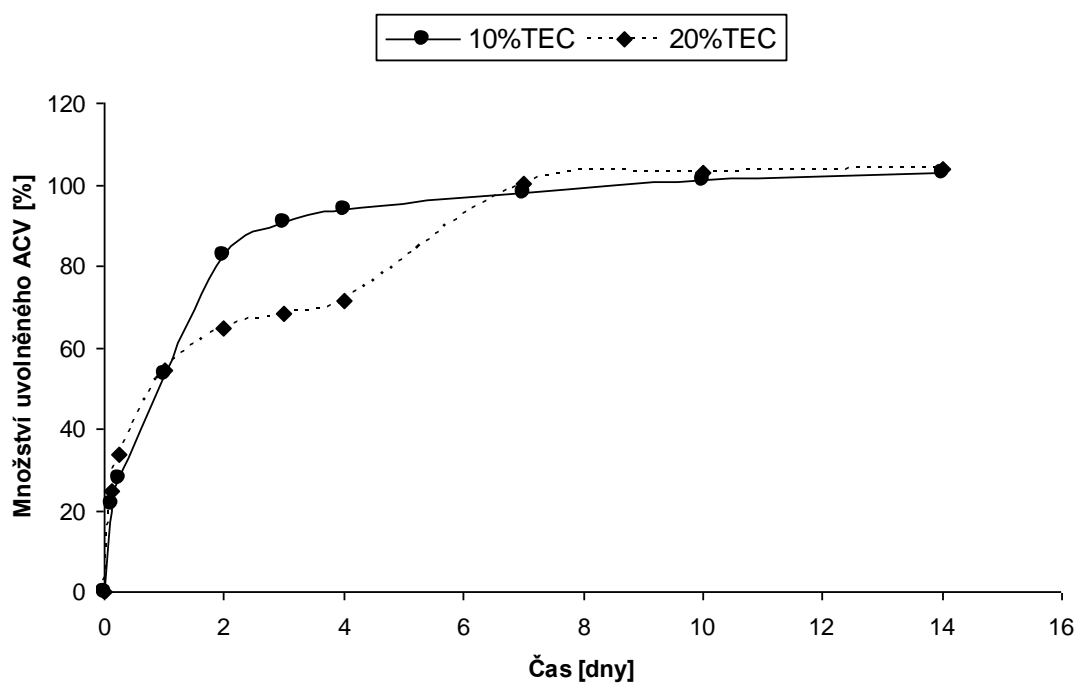
Obr. 17: Lineární fáze liberace acikloviru z oligoesteru **2D** plastifikovaného 10% TEC



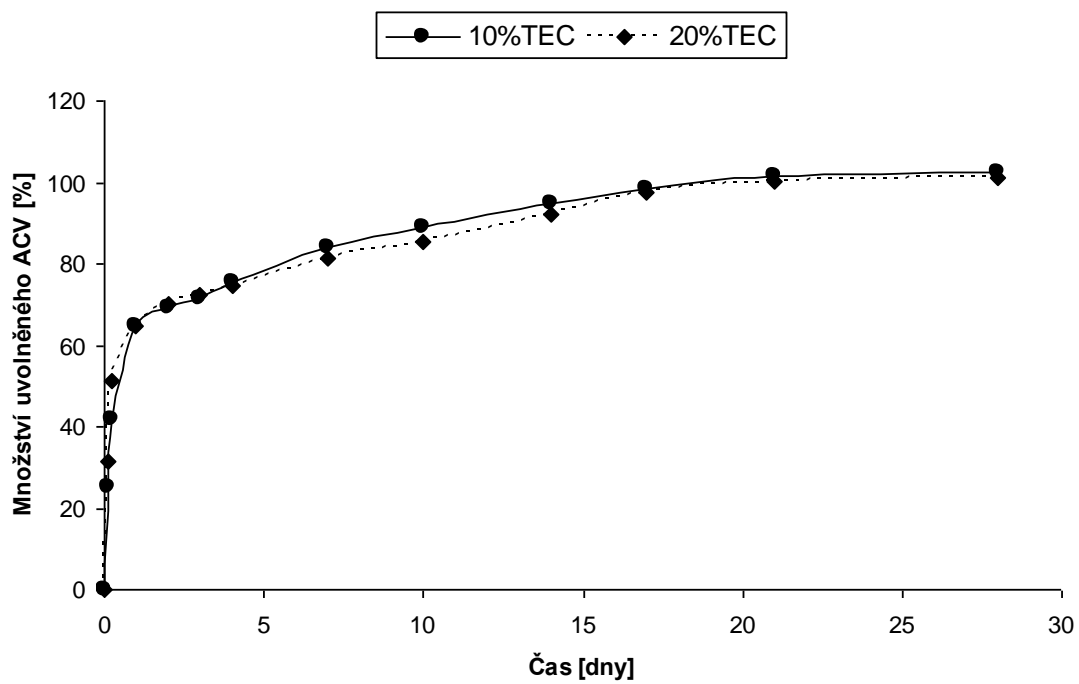
Obr. 18: Porovnání liberace acikloviru z oligoesteru **0,5D** plastifikovaného 10% a 20% TEC⁴⁴



Obr. 19: Porovnání liberace acikloviru z oligoesteru **1D** plastifikovaného 10% a 20% TEC⁴⁴



Obr. 20: Porovnání liberace acikloviru z oligoesteru **2D** plastifikovaného 10% a 20% TEC⁴⁴



7. Diskuse

7.1. Dynamická viskozita

Byla měřena dynamická viskozita oligoesterů 0,5D, 1D, 2D, 3D, 5D a 8D plastifikovaných 10% triethylcitrátu a lineárního PLGA plastifikovaného 10% triethylcitrátu na digitálním viskozimetru Brookfield - typ DV-E s adaptérem pro malé množství vzorků při teplotě 50°C za použití vřetena č. 14. Vzorek 3D byl za těchto podmínek měřitelný pouze při rychlosti otáčení vřetena 0,3 ot/min. Ostatní vzorky byly měřeny při více hodnotách RPM. Jejich dynamická viskozita se rychlostí otáčení neměnila, proto mohla být vypočítána průměrná hodnota. Jedná se tedy o newtonské systémy (tab. 12).

Výrazně nejvyšší dynamická viskozita, kolem 2500 Pa.s, byla naměřena u oligoesterů 3D a PLGA. Téměř poloviční dynamickou viskozitu měly vzorky 1D a 0,5D. Oligoestery 2D, 5D a 8D měly viskozitu o jeden řád nižší (obr. 8).

Pro zjištění vlivu koncentrace plastifikátoru na dynamickou viskozitu byly použity výsledky diplomové práce Ireny Jirákové: Vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných 20 % triethylcitrátu.⁴⁴ Byly tak porovnány oligoestery s 10% a 20% TEC. Z výsledků vyplývá, že zvýšení koncentrace triethylcitrátu z 10% na 20% vede k výraznému snížení dynamické viskozity (obr. 9). Rovněž rozdíly v hodnotách dynamické viskozity jednotlivých oligoesterů nebyly při použití 20% triethylcitrátu v tak velkém rozsahu. Rozsah hodnot viskozity při 10 % plastifikaci byl od 76 Pa.s u oligoesteru 8D po 2896 Pa.s u oligoesteru 3D. Při použití 20% triethylcitrátu pouze v rozsahu 15 Pa.s až 162 Pa.s.

Jednotlivé oligoesterové nosiče se liší molární hmotností a stupněm větvení. U testovaných oligoesterů přibližně platí, že s rostoucí molární hmotností (M_w) roste stupeň větvení (tab. 5). Nejvyšší stupeň větvení byl zjištěn u oligoesterů 2D a 1D, které mají nejvyšší M_w .⁴⁵ Dynamická viskozita oligoesterů plastifikovaných 10% triethylcitrátu stoupala s narůstající molární hmotností, ale pouze do určité hodnoty molární hmotnosti, poté viskozita značně poklesla (obr. 10). Rozdíly ve stupni větvení testovaných oligoesterů se adekvátně neprojevíly v naměřených hodnotách dynamické viskozity (obr. 11). Nevětvený PLGA měl druhou nejvyšší hodnotu dynamické viskozity a oligoester 5D se srovnatelným stupněm větvení naopak druhou nejnižší hodnotu viskozity.

7.2. Adhezivní síla

Byla změřena adhezivní síla oligoesterů 0,5D, 1D, 2D, 5D a 8D plastifikovaných 10% triethylcitrátu. U oligoesterů 3D a PLGA s 10% triethylcitrátu nebylo možné změřit adhezivní sílu. Pokud jsou tyto oligoestery plastifikovány pouze 10% triethylcitrátu, mají při laboratorní teplotě velmi vysokou viskozitu (viz. tab. 12). Nelze je nanést na horní kontaktní plochu zkušebního stroje. Řešením nebylo ani snížení viskozity vzorků zahřátím v horkovzdušné sušárně. Vzorek poté sice bylo možné aplikovat na kontaktní plochu stroje, ale velmi brzy ztuhl a vytvořil sklovitý povrch, který nepřilnul k podkladu.

Adheze je mezifázový jev ovlivněný povrchovou energií a rozprostíráním. Teorie smáčení vysvětluje adhezi rozprostřením (smáčením) a vytvořením úzkého kontaktu mezi adhezivem a substrátem.¹ K adhezi vzorků 3D a PLGA plastifikovaných 10% triethylcitrátu nedochází z důvodu vysoké hodnoty kontaktního úhlu, a tedy špatného rozprostření po modelovém substrátu. V souladu s teorií smáčení byla nejvyšší adhezivní síla naměřena u oligoesterů 5D a 8D (viz. obr. 4), které mají nejnižší viskozitu (viz. obr. 8).

Pro porovnání vlivu koncentrace plastifikátoru na velikost adhezivní síly byly použity výsledky souběžně realizované diplomové práce Ireny Jirákové: Vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných 20 % triethylcitrátu.⁴⁴ V její práci byla měřena adhezivita a viskozita stejných oligoesterů, ale plastifikovaných vyšší, 20% koncentrací triethylcitrátu. Zvýšením koncentrace plastifikátoru se řádově snížila viskozita soustav (viz. obr 9). Oligoestery 3D a PLGA mají při 10% plastifikaci triethylcitrátem dynamickou viskozitu přibližně 2500 Pa.s a neměřitelnou adhezivní sílu. Při použití 20% triethylcitrátu klesla viskozita na hodnoty kolem 150 Pa.s a byla zjištěna vysoká adhezivní síla.

Při použití 10 % triethylcitrátu je rozdíl v adhezivitě jednotlivých oligoesterů podstatně výraznější než při použití 20 % koncentrace triethylcitrátu (obr. 5). Z toho vyplývá, že koncentrace plastifikátoru významně ovlivní dynamickou viskozitu, a to se promítne do hodnot adhezivní síly.

Vliv molární hmotnosti oligoesteru na adhezivní vlastnosti není jednoznačný. Vyšší adhezivní síla byla zjištěna u oligoesterů s nejnižšími hodnotami M_w (~ 2000 g/mol). Se vzrůstem molární hmotnosti adhezivní síla výrazně klesá. Mírný vzestup adhezivity byl zaznamenán až u oligoesteru 2D s nejvyšší $M_w = 6600$ g/mol (obr. 6). Obdobně lze hodnotit vliv stupně větvení na adhezivní sílu. Nejvyšší adhezivní

síla byla zjištěna u oligoesteru 5D, který má nejnižší stupeň větvení. S narůstajícím stupněm větvení adhezivní síla výrazně klesá.

7.3. Liberace acikloviru

Byl proveden statický disoluční test acikloviru inkorporovaného do oligoesterů 0,5D, 1D a 2 D plastifikovaných 10% triethylcitrátu. Aciklovir se nejrychleji uvolnil z oligoesteru 0,5D, a to již za 2 dny. Na liberační křivce (obr. 12) je patrný vysoký burst efekt. Za 6 hodin od počátku liberace se uvolnilo 51% léčiva.

Liberace acikloviru z oligoesteru 1D probíhala po dobu 10 dnů. Za 3 hodiny od začátku liberace se uvolnilo přibližně 20% acikloviru. V časovém intervalu 3 hodiny až 2 dny se aciklovir uvolňoval kinetikou 0. řádu (obr. 16). Celkově se uvolnilo 83% léčiva. Zbytek inkorporovaného acikloviru se uvolnil během následujících 8 dnů (obr. 13).

Nejpomaleji se uvolňoval aciklovir z oligoesteru 2D. Celková doba liberace byla 21 dnů. Již během 24 hodin se uvolnilo 65% léčiva. Následovala lineární fáze liberace v délce šesti dnů, během kterých se uvolnilo 84% acikloviru. Zbýlých 16% léčiva se uvolnilo konstantní rychlostí v následujících 14 dnech (obr. 17).

Liberace acikloviru z oligoesterů 0,5D, 1D a 2D byla ovlivněna jejich molární hmotností a stupněm větvení. Oligoester 0,5D má z testovaných nosičů nejnižší molekulovou hmotnost ($M_w = 4000 \text{ g/mol}$) a nejnižší stupeň větvení. Inkorporovaný aciklovir se uvolnil za 2 dny. S rostoucí M_w a stupněm větvení se doba liberace prodlužovala.

Všechny matrice v disolučním médiu (fosfát citrátový pufr pH 7,0) výrazně zbobtnaly a došlo k jejich fragmentaci.

Výsledky liberace acikloviru z oligoesterů 0,5D, 1D a 2D s 10% triethylcitrátu byly porovnány s liberací acikloviru z oligoesterů s 20% TEC testovanými v diplomové práci Ireny Jirákové: Vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných 20 % triethylcitrátu.⁴⁴ Liberace acikloviru probíhala téměř identicky, zvýšení koncentrace triethylcitrátu z 10% na 20% nemělo na liberaci acikloviru významný vliv (obr. 18-20).

8. Závěr

Z výsledků experimentální části diplomové práce lze učinit následující závěry:

1. Oligoestery větvené dipentaerythritolem v množství 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 % a 8% v reakční směsi, které byly plastifikovány 10% triethylcitrátu, jsou newtonské systémy. Dynamická viskozita je při takto nízké plastifikaci v širokém rozmezí hodnot, a to 76 Pa.s u oligoesteru 8D po 2900 Pa.s u oligoesteru 3D.
2. Významnějším faktorem ovlivňujícím dynamickou viskozitu byla molární hmotnost M_w než stupeň větvení. Dynamická viskozita oligoesterů plastifikovaných 10% triethylcitrátu s rostoucí molární hmotností stoupala, ale ne v celém rozsahu M_w testovaných oligoesterů.
3. V souladu s teorií smáčení byla nejvyšší adhezivní síla naměřena u oligoesterů 5D a 8D, které mají nejnižší viskozitu. K adhezi vzorků 3D a PLGA plastifikovaných 10% triethylcitrátu nedochází z důvodu špatného rozprostření po modelovém substrátu.
4. Liberace acikloviru z oligoesterů 05D, 1D a 2D byla ovlivněna molární hmotností a stupněm větvení. V uvedeném pořadí oligoesterů roste molární hmotnost a stupeň větvení a prodlužuje se doba liberace acikloviru.

Literatura

- 1** Smart J.D.: The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, *Adv. Drug Del. Rev.*, 57, 2005, 1556-1568.
- 2** Junginger H.E.: Bioadhesive polymer systems for peptide delivery, *Acta Pharm. Technol.*, 36, 1990, 110-126.
- 3** Žabka M., Müller R.H., Hildebrand G. E.: *Moderní lékové formy ve farmaceutické technologii*, SAP-Slovak Academic Press, s.r.o., Bratislava, 2001, 35-46.
- 4** Woodley J.: Bioadhesion: New Possibilities for Drug Administration?, *Clin. Pharmacokinet.*, 40(2), 2001, 77-84.
- 5** Smart J.D., Kellaway I.W., Worthington H.E.: An in vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36(5), 1984, 295-299.
- 6** Haas J., Lehr C.M.: Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2(3), 2002, 287-298.
- 7** Ishida M., Nambu N., Nagai T.: Ointmenttype oral mucosal dosage form of Carbopol containing prednisolone for treatment of aphtha, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1983, 1010-1014.
- 8** Nagai T., Machida Y.: Mucosal adhesive dosage forms, *Pharm. Int.*, 6, 1985, 196-200.
- 9** Woodley J.F., Naisbett B.: The potential of lectins for delaying the intestinal transit of drugs, *Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 15, 1988, 125– 126.
- 10** Lee J.W., Park J.H., Robinson J.R.: Bioadhesive-Based Dosage Forms: The Next Generation, *J. Pharm. Sci.*, 89(7), 2000, 850-866.
- 11** Varcholová D.: Současné možnosti v substituční terapii syndromu suchého oka, *Remedia*, 5, 2006, 503-508.
- 12** <http://www.lekarna.cz/leky-volne-prodejne-ryma-nosni-kapky>, 15.3.2008
- 13** <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC58770.doc>, 15.3.2008
- 14** <http://www.gelclair.cz/>, 10.12.2008
- 15** Lueßen H.L., Lehr C.M., Rentel C.O., Noach A.B.J., de Boer A.G., Verhoef J.C., Junginger H.E.: Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs, *J. Control. Rel.*, 29, 1994, 329-338.
- 16** Gu J.M., Robinson J.R., Leung S.H.S.: Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure-property relationships, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 5, 1988, 21-67.

-
- 17** Bernkop-Schnürch A., Schwarz V., Steininger S.: Polymers with thiol groups: a new generation of mucoadhesive polymers?, *Pharm. Res.*, 16, 1999, 876-881.
- 18** Marschütz M.K., Caliceti P., Bernkop-Schnürch A.: Design and in vivo evaluation of an oral delivery system for insulin, *Pharm. Res.*, 17(12), 2000, 1468-1474.
- 19** Peppas N.A., Buri P.A.: Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues, *J. Control. Rel.*, 2, 1985, 257-275.
- 20** Bies C., Lehr C. M., Woodley J. F.: Lectin-mediated drug targeting: history and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 2004, 425–435.
- 21** Russell-Jones G. J.: The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46, 2001, 59– 73.
- 22** Haltner E., Easson J., Lehr C. M.: Lectins and bacterial invasion factors for controlling endo- and transcytosis of bioadhesive drug carrier systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 44, 1997, 3– 13.
- 23** Gabor F., Bogner E., Weissenboeck A., Wirth M.: The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 2004, 459–480.
- 24** Bridges J.F., Woodley J. F., Duncan R., Kopecek J.: Soluble N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers as a potential oral, controlled-release, drug delivery system. I. Bioadhesion to the rat intestine in vitro, *Int. J. Pharm.*, 44, 1988, 213–223.
- 25** Yang X., Robinson J.R.: Bioadhesion in mucosal drug delivery, in *Biorelated polymers and gels*, Okano T.(ed.), Academic Press, USA, 1998, 135-192.
- 26** Ponchel G., Irache J.M.: Specific and non-specific bioadhesive. particulate system for oral delivery to the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Del. Rev.*, 34, 1998, 191-219.
- 27** Lis H., Sharon N.: Lectins as molecules and as tools, *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 1986, 35-67.
- 28** Ashwell G., Morrell A.G.: The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins, *Adv. Enzymol.*, 41, 1974, 99-128.
- 29** Bardocz S., Grant G., Ewen S.W.B., Duguid T.J., Brown D.S., Englyst K., Pusztai A.: Reversible effect of phytohaemagglutinin on the growth and metabolism of rat gastrointestinal tract, *Gut*, 37, 1995, 353– 360.

-
- 30** Pusztai A., Ewen S.W.B., Grant G., Brown D.S., Stewart J.C., Peumans W.J., van Damme E.J., Bardocz S.: Antinutritive effects of wheat germ agglutinin and other *N*-acetylglucosamine-specific lectins, *Br. J. Nutr.*, 70, 1993, 313–321.
- 31** Clark M.A., Jepson M.A., Simmons N.L., Hirst B.H.: Differential surface characteristics of M cells from mouse intestinal Peyer's and caecal patches, *Histochem. J.*, 26, 1994, 271–280.
- 32** Chen H., Torchilin V., Langer R.: Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers, *Pharm. Res.*, 13, 1996, 1378–1383.
- 33** Pusztai A., Ewen S.W.B., Grant G., Peumans W.J., van Damme E.J., Rubio L., Bardocz S.: Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestine passage and their effectiveness as growth factors, *Digestion*, 46, 1990, 308–316.
- 34** Hajtó T., Hostanska K., Berki T., Pálincás L., Boldizsár F., Németh P.: Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): Overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications, *Evidence-based Compl. and Alt. Med.*, 2, 2005, 59-67.
- 35** Nachbar M.S., Oppenheim D. J.: Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed food, *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 1980, 2338.
- 36** Nasibett B., Woodley J.: The potential use of tomato lectin for oral drug delivery. 4. Immunological consequences, *Int. J. Pharm.*, 120, 1995, 247–254.
- 37** Woodley J.F.: Lectins for gastrointestinal targeting—15 years on, *J. Drug Targeting*, 7, 2000, 325– 333.
- 38** Tchernychev B., Wilchek M.: Natural human antibodies to dietary lectins, *FEBS Lett.*, 397, 1996, 139– 142.
- 39** Jennings J.S.R., Howdle P.D.: New developments in celiac disease, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 19, 2003, 118– 129.
- 40** Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny*, II. díl, Karolinum, Praha 2005, 345;391-392.
- 41** Boyd W. C., Shapleigh E.: Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins), *Science*, 1954, 419.
- 42** Russell-Jones G. J., Veitch H., Arthur L.: Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells, *Int. J. Pharm.*, 190, 1999, 165–174.

43 Yin YS., Chen DW., Qiao MX., Lu Z., Hu HY.: Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin, *J. Control Rel.*, 116, 2006, 337-345.

44 Jiráková I.: Vlastnosti větvených oligoesterů plastifikovaných 20% triethylcitrátu, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009.

45 Podzimek Š.: Charakterizace větvených oligoesterů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem, *Synpo Pardubice*, 2006, 3.