

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

3D tisk enterických tobolek a jejich hodnocení

Diplomová práce

2023

Bc. Lenka Navrátilová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

3D printing of enteric capsules and their evaluation

Diploma thesis

2023

Bc. Lenka Navrátilová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Lenka Navrátilová
Osobní číslo:	C21415
Studijní program:	N0531A130028 Analytická chemie
Téma práce:	3D tisk enterických tobolek a jejich hodnocení
Téma práce anglicky:	3D printing of enteric capsules and their evaluation
Zadávající katedra:	Katedra analytické chemie

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma "Možnosti acidoresistentní úpravy léků". Zaměřte se zejména na používané polymerní materiály, jejich vlastnosti a případné použití vybraných polymerů pro FDM 3D tisk pevných lékových forem.
2. Charakterizujte předložené vzorky polymerních materiálů, filament a 3D tištěných tobolek.
3. Provedte disoluční test vybraných tobolek připravených metodou 3D tisku.
4. Na základě získaných dat zhodnoťte vlastnosti studovaných polymerních materiálů, filament a disoluční chování 3D tištěných tobolek.
5. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5.5. 2023

Lenka Navrátilová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda velmi poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Martinu Bartošovi, CSc. a konzultantce doc. Ing. Aleně Komersové, Ph.D. za jejich odborný dohled, ochotu, trpělivost a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu a pomoc při studiu.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá možnostmi acidorezistentní úpravy léků. Je zaměřena na použití různých polymerních materiálů pro přípravu enterosolventních tobolek pomocí FDM 3D tisku. Cílem práce bylo prostudovat vliv použitých polymerních materiálů na proces 3D tisku a následně sledovat profil uvolňování léčiva z připravených tobolek.

Pomocí optického mikroskopu byly studovány materiály použité pro přípravu tobolek (prášek, vlákna) a samotné tobolky. Disoluční studie připravených tobolek byla provedena s modelovým léčivem v médiích simulujících průchod tobolky gastrointestinálním traktem – prostředí žaludku pH 1,2 a prostředí tlustého střeva pH 6,8. Množství uvolněného modelového léčiva bylo stanoveno pomocí UV/VIS spektroskopie. Byly porovnávány tobolky na bázi Affinisolu™ s přísávkem alginátu sodného nebo citrusového pektinu. Na základě získaných disolučních profilů byl vyhodnocen vliv různých přírodních materiálů na mechanismus a rychlost uvolňování modelového léčiva z připravených tobolek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enterosolventní potahování, acidorezistentní lékové formy, cílení do tlustého střeva, 3D tisk

TITLE

3D printing of enteric capsules and their evaluation

ANNOTATION

This thesis deals with the possibilities of acid-resistant drug treatment. It focuses on the use of different polymeric materials for the preparation of enterosolvent capsules using FDM 3D printing. The aim of the thesis was to study the effect of the polymeric materials used on the 3D printing process and subsequently to observe the drug release profile of the prepared capsules.

The materials used for capsule preparation (powder, filaments) and the capsules themselves were studied using an optical microscope.

The materials used for capsule preparation (powder, filaments) and the capsules themselves were studied using an optical microscope. The dissolution study of the prepared capsules was performed with the model drug in media simulating the passage of the capsule through the gastrointestinal tract – gastric environment pH 1,2 and colonic environment pH 6,8. The amount of released model drug was determined by UV/VIS spectroscopy. Capsules based on Affinisol™ with the addition of sodium alginate or citrus pectin were compared. Based on the obtained dissolution profiles, the effect of different natural materials on the mechanism and rate of release of the model drug from the prepared capsules was evaluated.

KEYWORDS

Enterosolvent coating, acid-resistant dosage forms, colon targeting, 3D printing

OBSAH

ÚVOD	16
1. Teoretická část	17
1.1. GIT	17
1.2. Možnosti cílení léčiva do tlustého střeva	18
1.2.1. Lékové systémy pro cílení do tlustého střeva.....	18
1.3. Acidorezistentní lékové formy	22
1.3.1. Polymery používané pro enterosolventní potahy.....	22
1.3.2. Možnosti zařízení pro potahování.....	26
1.4. 3D tisk enterosolventních lékových forem	27
1.4.1. Tryskání pojiva (Binder jetting)	27
1.4.2. Selektivní laserové sintrování – SLS	28
1.4.3. „Fused deposition modeling“ – FDM	28
1.4.4. Extruze polotuhých materiálů – SSE	28
1.4.5. Stereolitografie – SLA	28
1.6. Optická mikroskopie	31
1.6.1. Konstrukce optického mikroskopu	31
1.7. Disoluční zkoušky	33
2. Experimentální část.....	34
2.1. Optický mikroskop	34
2.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky.....	34
2.1.2. Affinisol.....	35
2.1.3. Alginát.....	35
2.1.4. Chitosan.....	38
2.1.5. Citrusový pektin.....	41
2.1.6. Jablečný pektin	44
2.2. Disoluční testy	47

2.2.1.	Laboratorní přístroje a pomůcky.....	47
2.2.2.	Použité chemikálie	47
2.2.3.	Příprava a složení enterosolventních tobolek	48
2.2.4.	Příprava disolučních médií.....	49
2.2.4.1.	Disoluční médium o pH 1,2.....	49
2.2.4.2.	Disoluční médium o pH 6,8.....	50
2.2.5.	Disoluční test	50
2.2.6.	UV/VIS spektrometrie.....	51
2.2.7.	Kalibrační křivky	51
2.2.7.1.	Kalibrační přímka pro kofein v pH 1,2	51
2.2.7.2.	Kalibrační přímka pro kofein v pH 6,8	52
2.2.8.	Výsledky.....	53
2.2.8.1.	Tobolky s přídavkem alginátu sodného.....	53
2.2.8.2.	Tobolky s přídavkem citrusového pektinu	54
3.	Závěr.....	56

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: CTDC	19
Obrázek 2: Systém OROS-CT, převzato z [5] a upraveno	21
Obrázek 3: Struktura chitosanu, převzato z [16]	23
Obrázek 4: Struktura pektinu, převzato z [18]	24
Obrázek 5: Struktura alginátu sodného, převzato z [20].....	25
Obrázek 6: Konstrukce optického mikroskopu LEICA S8APO	32
Obrázek 7: Optický mikroskop LEICA S8APO s příslušenstvím.....	34
Obrázek 8: Affinisol (prášek), vlevo zvětšení 1, vpravo zvětšení 2	35
Obrázek 9: Alginát (prášek), vlevo zvětšení 2, vpravo zvětšení 8	35
Obrázek 10: Vlákno obsahující alginát.....	36
Obrázek 11: Tobolka obsahující alginát	36
Obrázek 12: Tobolka obsahující alginát, vlevo pohled shora a vpravo zdola.....	37
Obrázek 13: Vrstva tobolky obsahující alginát	37
Obrázek 14: Vrstva z tobolky obsahující alginát, vlevo a uprostřed zvětšení 2, vpravo zvětšení 2,5	38
Obrázek 15: Chitosan (prášek), vlevo zvětšení 1, vpravo zvětšení 2	38
Obrázek 16: Vlákno obsahující chitosan, osvětlení shora (vlevo, zvětšení 1) a zdola (uprostřed a vpravo zvětšení 1 a 2).....	39
Obrázek 17: Tobolka obsahující chitosan, boční pohled	39
Obrázek 18: Tobolka obsahující chitosan, vlevo pohled shora, vpravo zdola	39
Obrázek 19: Vrstva z tobolky obsahující chitosan	40
Obrázek 20: Vrstva z tobolky obsahující chitosan, zvětšení 2	40
Obrázek 21: citrusový pektin (prášek), vlevo zvětšení1, vpravo zvětšení 2	41
Obrázek 22: Vlákno obsahující citrusový pektin, osvětlení shora (vlevo, zvětšení 1) a zdola (uprostřed a vpravo, zvětšení 1 a 2	41
Obrázek 23: Citrusový pektin (tobolka).....	42
Obrázek 24:Tobolka obsahující citrusový pektin, vlevo pohled shora, vpravo zdola ..	42
Obrázek 25: Vrstva z tobolky obsahující citrusový pektin	43
Obrázek 26: Vrstva z tobolky obsahující citrusový pektin, vlevo a uprostřed zvětšení 2, vpravo zvětšení 2,5	43
Obrázek 27: Jablečný pektin (prášek), vlevo zvětšení 1, vpravo zvětšení 2	44

Obrázek 28: Vlákno obsahující jablečný pektin, osvětlení shora (vlevo, zvětšení 1) a zdola (uprostřed a vpravo, zvětšení 1 a 2).....	44
Obrázek 29: Tobolka obsahující jablečný pektin	45
Obrázek 30: Tobolka obsahující jablečný pektin, vlevo pohled shora, vpravo zdola ..	45
Obrázek 31: Vrstva z tobolek obsahující jablečný pektin	46
Obrázek 32: Vrstva z tobolek obsahující jablečný pektin, zvětšení 2,5	46
Obrázek 33: Tobolky s přídavkem citrusového pektinu (5 %).....	48
Obrázek 34: Homogenizátor RETSCH MM200	49
Obrázek 35: Disoluční aparatura SOTAX AT7 Smart	51
Obrázek 36: Kalibrační přímka pro kofein v médiu o pH 1,2 - závislost absorbance na koncentraci kofeinu.....	52
Obrázek 37: Kalibrační přímka pro kofein v médiu o pH 6,8 - závislost absorbance na koncentraci kofeinu.....	53
Obrázek 38: Disoluční profily tobolek s přídavkem alginátu sodného.....	54
Obrázek 39: Disoluční profily tobolek s přídavkem citrusového pektinu	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení tobolek připravených metodou 3D tisku	48
--	----

SEZNAM ZKRATEK

GIT	gastrointestinální trakt
LF	léková forma
SLS	selective laser sintering
FDM	fused deposition modeling
SSE	semi-solid extrusion
SLA	stereolitografie
CTDC	colon targeted delivery capsules
PCDC	pressure controlled drug capsules
OROS	osmotic release oral system
3DP	three dimensional printing
CAD	computer-aided drafting
AM	aditivní výroba
RP	rychlé prototypování
SFF	technologie pevných forem
SLS	laserové sintrování
FDM	fused deposition modeling
SSE	extruze polotuhých materiálů
SLA	stereolitografie
ODT	orodispergovatelná tableta
FMT	fekální mikrobiální terapie
TSM	transplantace střevního mikrobiomu
CDI	infekce <i>Clostridium difficile</i>
IBD	idiopatické střevní záněty

HME hot melt extrusion

ÚVOD

U léčby některých onemocnění je velmi žádoucí absorpce léčiva v distální části trávicího traktu a zajištění stability léčiva v kyselém prostředí žaludku. Systémů pro cílení léčiv do tlustého střeva se využívá například při léčbě zánětlivých střevních onemocnění, jako je ulcerativní kolitida nebo Crohnova choroba, také při léčbě kolorektálního karcinomu nebo u nemocí závislých na cirkadiálních rytmech.

Stabilita léčiva v žaludečním pH bývá zajištěna pomocí acidorezistentního (enterosolventního) obalu, ten poté zajistí uvolnění léčiva v distální části gastrointestinálního traktu. Jako materiály pro enterosolventní potahování se používá celá řada polymerů, od syntetických přes polosyntetické až po polymery přírodní.

Výhodou přírodních polymerů je zejména jejich nízká toxicita a u některých také biodegradabilita. Používají se zejména polysacharidy chitosan, pektin, chondroitin sulfát, guarová guma, amylosa a alginát.

Tato diplomová práce se zabývá možnostmi acidorezistentní úpravy léků. Součástí práce byla charakterizace vzorků polymerních materiálů, filament a 3D tištěných tobolek pomocí optického mikroskopu. Byly provedeny disoluční testy tobolek z různých polymerních materiálů, které byly porovnány.

1. Teoretická část

1.1. GIT

Gastrointestinální trakt, nebo také trávicí trakt je důležitou součástí lidského těla. Slouží k příjmu a rozmělnění potravy, zpracování a vstřebání živin a transportu tráveniny. Trávicí soustava je tvořena trávicí trubicí a přídatnými žlázami. Součástí trávicí trubice je dutina ústní (*cavitas oris*), hltan (*pharynx*), jícen (*oesophagus*), žaludek (*gaster*), tenké střevo (*intestinum tenue*) a tlusté střevo (*intestinum crassum*). Stěna trávicí trubice je tvořena čtyřmi základními vrstvami, nejnvnitřnější vrstvou je sliznice, dále podslizniční vazivo, svalová vrstva a vazivový obal. Slizniční vrstva produkuje kyselinu chlorovodíkovou, která má podstatnou úlohu v GI traktu, podílí se na zpracování potravy a způsobuje nízké pH v žaludku.^{1,2}

Ústní dutinou je přijímána a rozmělnována potrava, která dále putuje hltanem, který je dlouhý 12-15 cm, je ve tvaru nálevky a uplatňuje se při polykání. Navazuje jícen, který spojuje hltan a žaludek, jeho délka se pohybuje kolem 23-28 cm, liší se v závislosti na velikosti hrudníku. Žaludek je plochý svalový vak, uložený v dutině břišní. Má proměnlivý tvar, nejčastější je však tvar písmene J, tzv. žaludek hákovitý.^{1,2} Žaludek je orgánem, ve kterém probíhá mechanické rozmělnění potravy a promíchání s žaludeční šťávou obsahující enzymy a kyselinu chlorovodíkovou. Hodnota pH v žaludku se pohybuje kolem 1,2-5.⁴

Poté je potrava přesouvána peristaltickými vlnami do tenkého střeva, to je nejdelším úsekem trávicí trubice, je dlouhé zhruba 3-5 m a široké 3-4 cm. Zde dochází k hlavní části trávení potravy a vstřebávání jednoduchých složek z rozštěpené potravy. Tenké střevo zahrnuje tři úseky: dvanáctník (*duodenum*), lačnick (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*). Na sliznici tenkého střeva jsou mikroskopické výběžky – klky, je pokryta jednovrstevným cylindrickým epitelem s resorpční schopností a složena v kruhovitě řasy. Plocha, na které dochází ke vstřebávání živin je právě díky klkům a řasám několikanásobně větší.^{1,2} V tenkém střevě se pH postupně zvyšuje až k hodnotě 7,5.⁴

Poslední částí trávicí trubice je tlusté střevo, které je dlouhé asi 1,5 m a je složeno z těchto úseků: slepé střevo (*caecum*), tračnick vzestupný (*colon ascendens*), tračnick příčný (*colon transversum*), tračnick sestupný (*colon descendens*), esovitá klička (*colon sigmoideum*) a konečnick (*rectum*). Mezi hlavní funkce tlustého střeva patří vstřebávání vody a elektrolytů a zahuštění obsahu. Jsou zde přítomny bakterie, které se podílejí na konečném zpracování střevního obsahu.^{1,2} V tlustém střevě se pH pohybuje kolem 5,5-8.⁴

1.2. Možnosti cílení léčiva do tlustého střeva

Při léčbě některých onemocnění mají velký význam systémy, které umožňují vstřebání léčiva v tlustém střevě. Využívá se toho například při léčbě zánětlivých střevních onemocnění, střevních chorob infekčního původu (Crohnova choroba, ulcerativní kolitida), některých nádorů, nebo také u onemocnění závislých na cirkadiálních rytmech (angina pectoris, astma).^{4,5}

1.2.1. Lékové systémy pro cílení do tlustého střeva

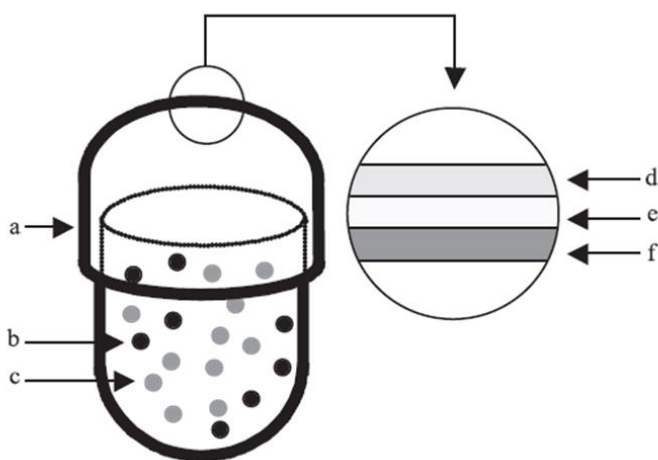
Při směřování léčiva do tlustého střeva se využívá jeho charakteristických a specifických vlastností. Využívá se odlišného pH v různých částech GIT, dlouhého času průchodu trávicím traktem, tlakových vln v tlustém střevě a lokální bakteriální mikroflóry. Používané lékové systémy využívají jednotlivých faktorů nebo i jejich kombinace.³⁻⁶ Nejvíce preferovaným způsobem podání léků pro cílení do tlustého střeva je perorální léková forma, mohou být však použity i jiné lékové formy. Nejkratší cestou pro cílení léčiva do tlustého střeva je podání per rectum, u tohoto způsobu je ale obtížné dosáhnout proximální části tlustého střeva. Liší se také rozsah distribuce léčiva u různých rektálních LF v závislosti na jejich schopnosti šíření a retenčním času. Kromě toho může být podání per rectum pro pacienty nepříjemné a může docházet k nízké complianci (spolupráci) pacienta. Selektivním podáváním léků do tlustého střeva je možné snížit potřebnou dávku léčiva a také redukovat systémové nežádoucí účinky, které jsou spojené s vysokými dávkami podávaných léčiv. U perorálních LF s cílením do tlustého střeva je nezbytné chránit léčivo před uvolňováním v žaludku a tenkém střevě.⁵

Protože se tlusté střevo nachází v distální části GIT, může být vývoj těchto systémů poměrně složitý, jelikož musí perorální LF projít celou trávicí trubicí, aby se do cílového místa dostala. Dalšími faktory, které mohou ovlivňovat spolehlivé a účinné doručení léčiv do tlustého střeva je složitá fyziologie GIT, ta se vyznačuje širokým rozsahem hodnot pH, objemů tekutin a doby průchodu. Musí se také brát ohled na přítomnost potravy a metabolických enzymů. Rozpustnost léčiv může být vzhledem k vyšší viskozitě a neutrálnímu pH v tlustém střevě faktorem limitujícím rychlost absorpce. Problémem může být také udržení stability léčiva v tlustém střevě, na kterou mohou mít negativní vliv nespecifické interakce léčiva s obsahem tlustého střeva (střevní sekrety, hlen, zbytky stravy atd.)⁷

a) Tobolky pro přívod léčiva do kolonu (CTDC – Colon Targeted Delivery Capsules)

Samotné želatinové nebo polysacharidové tobolky se rozpouští ve vodném prostředí poměrně rychle, proto se pro cílené uvolňování léčiva do tlustého střeva začaly používat až s rozvojem enterosolventních obalů. Tobolky s uvolňováním v tlustém střevě se označují jako CTDC (Colon Targeted Delivery Capsules).⁸

Patří sem systémy, které uvolňují léčivo v závislosti na pH i době průchodu GIT. Povrch tobolek CTDC je tvořen třemi vrstvami a uvnitř tvrdé želatinové tobolky je směs účinné látky a organické kyseliny (např. kyselina jantarová). Vnější vrstva je acidorezistentní, střední vrstva která tvoří bariéru mezi vnější a vnitřní vrstvou, je hydrofilní a vnitřní vrstva je rozpustná v kyselém prostředí. Acidorezistentní vrstva zabraňuje rozpuštění tobolky v žaludku, po vstupu do tenkého střeva se rozpouští společně se střední vrstvou. Vnitřní polymerní vrstva zůstává neporušena, postupně ale bobtná pronikáním tekutiny do tobolky. Po nějaké době se vnitřní vrstva rozpouští, to je způsobeno snížením pH interakcí organické kyseliny a vody. Uvolňování léčiva nejvíce ovlivňuje tloušťka vnitřní vrstvy.⁶



Obrázek 1: CTDC – a) želatinová tobolka, b) léčivo, c) organická kyselina, d) acidorezistentní vrstva, e) hydrofilní vrstva, f) vrstva rozpustná v kyselém prostředí, převzato z [6]

b) Systém využívající změny tlaku v tlustém střevě (PCDC – Pressure Controlled Drug Capsules)

Je zde využíváno zvýšení tlaku v tlustém střevě oproti tenkému střevu, v důsledku peristaltických vln. Takaya a spol. vyvinuli tobolky z ethylcelulosity, která je ve vodě nerozpustná. Tento systém je založen na odolnosti tobolky vůči tlaku v žaludku a tenkém střevě, toho je dosaženo díky dostatečnému objemu přítomné tekutiny. V tlustém střevě poté dochází

k rozpadu a uvolnění léčiva z polymerní kapsle, způsobenému zvýšením tlaku. Nejdůležitějším faktorem pro rozpad tobolky je tloušťka ethylcelulosové membrány, dále záleží také na velikosti a hustotě tobolky.⁴⁻⁷

c) Systémy založené na bakteriální mikroflóře tlustého střeva

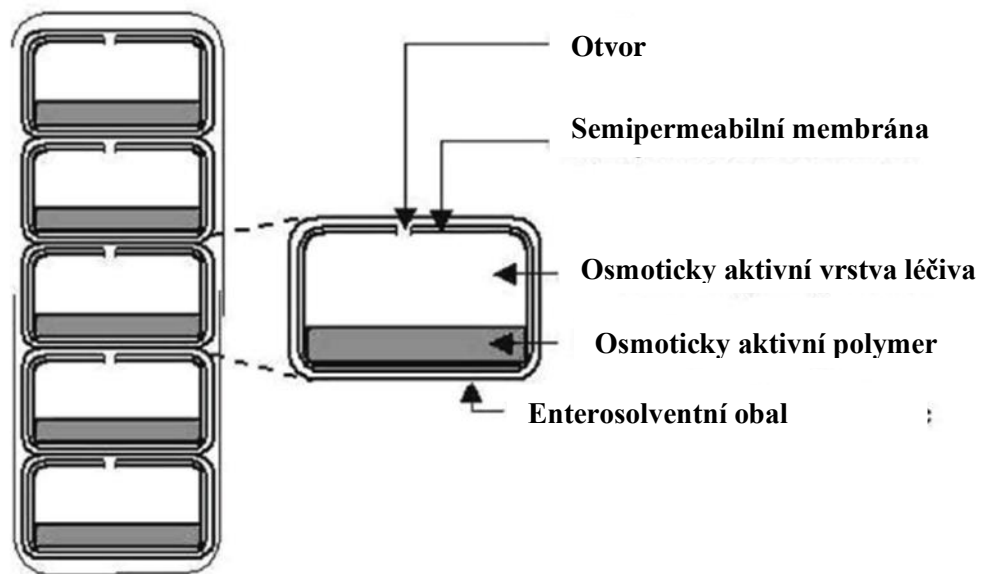
Celý trávicí trakt je osídlen 10^{12} - 10^{14} bakterií a celkem zahrnuje asi 400-500 mikrobiálních druhů. Největší množství bakterií je však lokalizováno v oblasti tlustého střeva. Bakteriální mikroflóra tlustého střeva je tvořena především anaerobními nebo fakultativně anaerobními bakteriemi, mezi nejčastěji vyskytující se rody patří *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Eubacterium* atd. Mikroflóra tlustého střeva pokrývá své energetické potřeby prostřednictvím fermentativní přeměny cukrů nestrávených v tenkém střevě, jedná se například o disacharidy, trisacharidy, polysacharidy atd. Střevní mikroflóra produkuje velké množství enzymů, které se na fermentaci podílejí (glukoronidasa, xylosidasa, nitroreduktasa, azoreduktasa apod.).^{5,6,9}

Enzymové aktivity v tlustém střevě lze využít k uvolnění léčiva, a to více způsoby. Prvním způsobem je degradace polymerních obalů a matricových LF, druhým biotransformace proléčiva. Posledním systémem je CODES, ten využívá kombinace mikrobiální degradace polysacharidů v tlustém střevě a pH senzitivních polymerů.⁴⁻⁶

d) Osmoticky řízené systémy (OROS – Osmotic Release Oral System)

Dalším systémem pro cílení léčiva do tlustého střeva je OROS-CT. Tento systém může být tvořen jednou osmotickou jednotkou nebo více (5-6) menšími jednotkami, které jsou zapouzdřeny v tvrdé želatinové tobolce. Každá jednotka je tvořena dvěma vrstvami, první vrstvou je léčivo s osmoticky aktivní látkou a druhou je vrstva osmoticky aktivního polymeru. Tyto dvě vrstvy jsou obklopeny semipermeabilní membránou s otvorem, který je umístěn u vrstvy s léčivem. Celá jednotka je ještě pokryta enterosolventním potahem.^{4,5}

V žaludku se rozpouští želatinová tobolka, jednotky systému OROS-CT jsou díky enterosolventnímu potahu chráněny před absorpcí vody v kyselém prostředí žaludku. V tenkém střevě se potah rozpouští a do jednotky se dostává voda, která způsobuje nabobtnání osmoticky aktivního polymeru a vytlačení roztoku léčiva otvorem. Jednotky OROS-CT jsou navrženy tak, aby uvolňovaly léčivo 3-4 hodiny po opuštění žaludku, aby se zabránilo uvolnění léčiva v tenkém střevě.^{4,5}



Obrázek 2: Systém OROS-CT, převzato z [5] a upraveno

1.3. Acidorezistentní lékové formy

Acidorezistentní lékové formy, známé také jako enterosolventní, jsou lékové formy, které jsou potaženy enterosolventním obalem. Tento obal způsobuje modifikované uvolňování léčivé látky, kdy je nutné zaručit stabilitu léčiva v prostředí žaludku a uvolnit léčivou látku v distální části trávicího traktu.

Enterosolventní potah je možné použít u perorálních lékových forem a je obvykle tvořen syntetickými polymery nebo také přírodními látkami. Potahování tablet enterosolventním obalem se provádí za účelem ochrany proti podmínkám prostředí, zejména pH, ochrany žaludeční sliznice, uvolnění léčiva v určitém místě nebo čase a také změny vůně a chuti léčiva. Enterosolventní potahování je používáno u mnoha perorálních lékových forem, zejména u tobolek, tablet, pelet, granulí, mikrokapslí, mikročástic a nanočástic.

Potah zabraňuje uvolnění léčiva v žaludku, ale zajišťuje rozpuštění v tenkém střevě, k tomu dochází použitím polymeru, který není rozpustný při kyselém pH žaludku, ale je rozpustný při pH tenkého střeva. Mezi běžně používané polymery patří například ftalát acetátu celulosy, kopolymery kyseliny methakrylové a hydroxypropylmethylcelulosa ftalát. Mezi technologické postupy, které lze pro tyto typy potahů použít patří potahování filmem a potahování cukrem. Množství použitého polymeru je obvykle dvojnásobné až trojnásobné než u běžného potahu. Pro výrobu enterosolventního potahu jsou důležité obzvláště dva parametry, a to druh použitého polymeru a hmotnost.

Nevýhodou enterosolventních potahů může být v některých případech snížení biologické dostupnosti, například kvůli neúplnému nebo opožděnému rozpadu enterosolventního potahu v důsledku variability střevního pH nebo problémů souvisejících s nízkou rozpustností léčiva.^{10,11}

1.3.1. Polymery používané pro enterosolventní potahy

Existuje velké množství polymerů používaných pro potahování. Obvykle obsahují karboxylové skupiny a jejich rozpustnost závisí na jejich množství. Tyto polymery se mohou dělit podle jejich chemického složení na polymethakryláty, deriváty celulosy, polyvinylóvé deriváty a jiné materiály (amylosový škrob, deriváty škrobu, estery kyseliny aleuritové, dextriny).¹⁰

Často využívanými materiály pro enterosolventní potahy jsou polosyntetické a syntetické materiály (např. deriváty hypromelosy a polymethakryláty). Vyznačují se dobrými

ochrannými a filmotvornými vlastnostmi a umožňují přizpůsobení profilu uvolňování léčiva a cílení do střev. Nevýhodou těchto potahových materiálů je špatné biologické odbourávání a z toho vyplývající limity denního příjmu. Alternativou jsou přirozeně se vyskytující enterosolventní polymery, které jsou rezistentní v žaludečním prostředí. Tyto polymery jsou na rozdíl od těch syntetických biologicky odbouratelné, nemají denní limity příjmu, poměrně hojně se vyskytují a jsou cenově dostupné.¹²

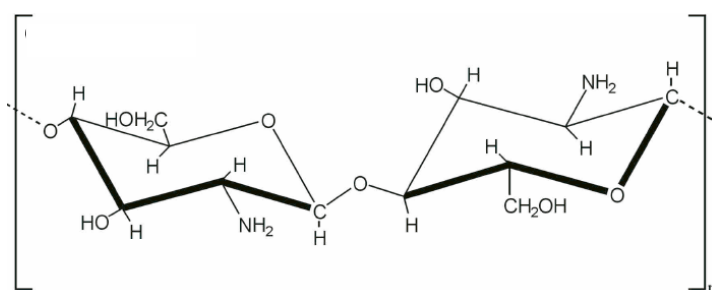
Některé přírodní polysacharidy jsou vhodné pro cílení do tlustého střeva díky stabilitě v žaludku a v tenkém střevě. V tlustém střevě dochází k jejich degradaci pomocí zde přítomných bakterií, které vylučují enzymy (D-galaktosidasa, amylasa, pektinasa, D-glukosidasa, dextranasa a D-xylosidasa) schopné způsobit hydrolytické štěpení glykosidických vazeb. Z této skupiny polymerů se pro enterosolventní potahování používají chitosan, pektin, chondroitin sulfát, guarová guma, amylosa a alginát.^{13,17}

Chitosan

Chitosan je polysacharid vznikající chemickou reakcí z chitinu, a to pomocí alkalické deacetylace, nebo enzymaticky díky enzymu N-acetylasa. Skládá se z β -vázaného D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu. Vyskytuje se ve čtyřech krystalických formách, pouze jedna z nich je nehydratovaná a ostatní tři jsou hydratované. Zahřátím hydratované formy na 200 °C vzniká forma nehydratovaná. Nehydratované krystaly jsou v kyselinách nerozpustné. Struktura chitosanu je na Obrázku 3.^{14,15,17}

Rozpustnost chitosanu je ovlivněna mnoha faktory – iontová síla prostředí, míra protonace, molekulová hmotnost a zejména hodnota pH. Chitosan je rozpustný v kyselém prostředí (pH nižší než 6), při pH 7 je rozpustný pouze z 50 %.¹⁵

Chitosan je hojně využíván ve farmaceutickém průmyslu díky své stabilitě, hydrofilitě, biodegradovatelnosti, nízké toxicitě a pro mukoadhezivní a antibakteriální vlastnosti. Je možné jej použít pro transport léčiv, umožňují řízené uvolňování léčiva a jeho cílení.^{14,15,17}



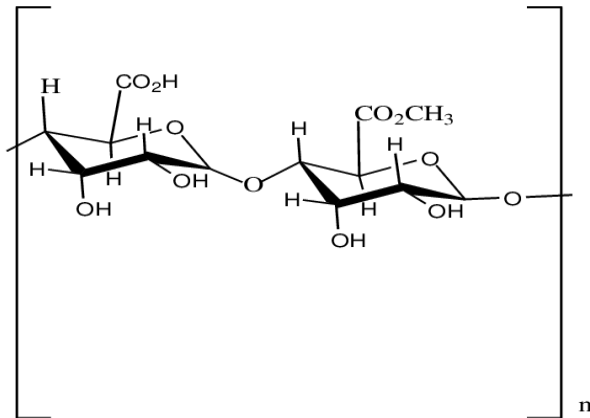
Obrázek 3: Struktura chitosanu, převzato z [16]

Chitosan je používán v perorálních léčivých formách, a to zejména díky jeho mukoadhezivním vlastnostem a schopnosti zvyšovat absorpci. Mimo jiné je vhodným polysacharidem pro cílení léčiv do tlustého střeva.¹⁷

Pektin

Pektin je neškrobový polymer s dlouhým řetězcem a vysokou molekulovou hmotností. Přírodně se vyskytuje v buněčných stěnách rostlin a komerčně je získáván ze slupek citrusových plodů, nebo z jablečných výlisků. Pektin se využívá v potravinářství a ve farmaceutickém průmyslu. Ve farmacii nachází uplatnění jako zahušťovadlo, nebo pomocná látka. Je biodegradabilní, má vynikající želírující vlastnosti a je stabilní v kyselém prostředí žaludku. Uvolňování léčiva z LF potažených pektinem je ovlivněno tloušťkou povlaku a obsahem pektinu.¹⁷

Pektin je tvořen jednotkami kyseliny galakturonové spojenými 1,4-glykosidickými vazbami, k tomuto základu jsou připojeny neutrální cukry zahrnující galaktosu, arabinosu a ramnosu.¹⁷ Struktura pektinu je znázorněna na Obrázku 4.



Obrázek 4: Struktura pektinu, převzato z [18]

Pektiny jsou vhodným polymerem pro cílení do tlustého střeva, protože zůstávají v horní části GIT neporušeny a jsou poté degradovány mikroflórou tlustého střeva. Řada studií [17] využila pektin jako nosič k cílení chemoterapeutických látek pro léčbu kolorektálního karcinomu. Mimo jejich specifickou schopnost cílení léčiva do tlustého střeva mají i další výhody. Perorálně podávaný modifikovaný citrusový pektin inhibuje růst, angiogenezi a metastazování nádorů. To je nejspíše způsobeno jeho efektem na funkci galektinu-3.²²

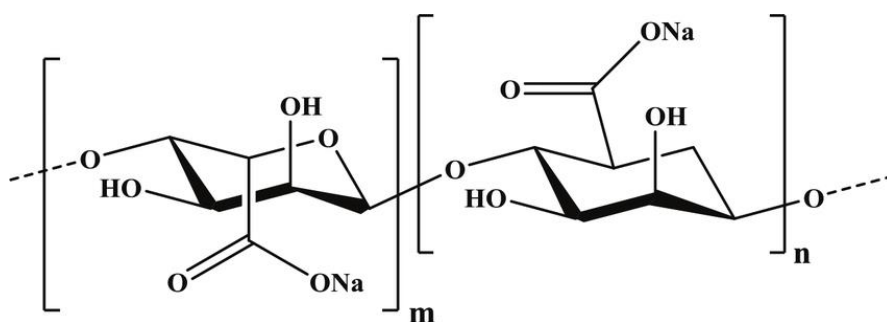
Wang a spol. ve studii [22] z roku 2007 testovali konjugaci kyseliny 5-FU-1-octové s pektinem. 5-fluoruracil (5-FU) je používán k léčbě kolorektálního karcinomu. Ke kovalentnímu navázání byl ve studii použit acetylový spacer. Při testech na potkanech nebyla kyselina 5-FU-1-octová zjištěna v obsahu žaludku ani v tenkém střevě, naopak byla zjištěna její velká koncentrace v obsahu céka a tlustého střeva potkanů.²²

V další studii [23] z roku 2008 byl studován profil uvolňování 5-FU z pelet potažených pektin/ethylcelulosovou fólií. Byly provedeny studie in-vitro, při kterých bylo zjištěno, že rychlost uvolňování léčiva závisí na tloušťce povlaku a na obsahu pektinu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při poměru pektinu a ethylcelulosy 1:2. Při studii in-vivo byl 5-FU detekovatelný v plazmě potkanů 7 hodin po perorálním podání, zatímco u potkanů, kterým byly podávány pelety bez potažení, byl detekovatelný již po 15 minutách. U potahovaných pelet bylo in-vivo prokázáno zpoždění T_{max} a snížení C_{max} .²³

Algináty

Algináty jsou lineární nerozvětvené polymery, které jsou získávány extrakcí z hnědých mořských řas. Jsou složeny z jednotek kyseliny β -D-manurové a α -glukuronové kyseliny, ty jsou spojeny β (1-4) glykosidickou vazbou. Struktura alginátu je znázorněna na Obrázku 5.^{17,19}

Algináty se používají zejména v kosmetice pro výrobu krémů a obličejových masek a také ve farmacii, kde je využíván nejčastěji alginát sodný a vápenatý.¹⁹



Obrázek 5: Struktura alginátu sodného, převzato z [20]

Výhodami alginátů je jejich nízká toxicita, biokompatibilita, a také se významně podílí na blokaci absorpce některých radioizotopů ve střevech (např. radium a stroncium). Jako aniontový polysacharid je schopen tvořit stabilní gel s vícevalentními kationty, čehož je využíváno zejména u podávání léčiv. Má také mukoadhezivní vlastnosti a je citlivý na pH, je proto vhodným polysacharidem pro cílení léčiva do tlustého střeva.^{17,19}

1.3.2. Možnosti zařízení pro potahování

Je známo mnoho způsobů, jak lze lékové formy potahovat. Mezi nejčastěji používaná zařízení se řadí potahovací pánve, fluidní lože, hot melt extruze, elektrostatické potahování a 3D tisk.

Potahování pomocí potahovací pánve, tzv. dražování je klasickou metodou. Probíhá odpařováním rozpouštědla a je používané pro potahování filmem a cukrem. Potahovací roztok se nastříká na tablety a rozpouštědlo (organické nebo vodné) je odstraněno sušícím systémem.^{10,51}

Principem fluidního lože je rozprašování roztoku nebo disperze na LF. Díky sloupci horkého vzduchu vzniká fluidní vrstva. Rozpouštědlo se odpařuje a rozpuštěný nebo dispergovaný polymer tvoří vrstvu povlaku. Toto zařízení je používáno zejména pro potahování částicových lékových forem jako jsou pelety.^{10,52}

Hot melt extruze je potahováním za tepla bez použití rozpouštědel. Tradiční polymery jsou zde nahrazeny povlakovými materiály, které mají nízkou teplotu tání. Teplota je poté udržována při 40-60 °C. Výhodami této metody jsou rychlost procesu, cena, malé riziko mikrobiálního růstu a malé riziko rozpuštění léčiva během procesu potahování. Jako pomocné látky se zde používají látky na bázi lipidů (termoplastické pryskyřice, estery mastných kyselin s dlouhým řetězcem nebo syntetické produkty).^{10,53}

Dalším procesem potahování bez použití rozpouštědel je elektrostatické potahování, kdy je materiál je nanášen na vodivý povrch. Mezi částicemi z potahovacího materiálu a ostatními částicemi, které mají být potaženy dochází k přitahování opačných nábojů, tím dochází ke vzniku filmu.^{10,54}

1.4. 3D tisk enterosolventních lékových forem

Inovativní metodou pro potahování lékových forem je 3D tisk (3DP – Three Dimensional Printing). Jedná se o výrobní proces 3D objektů postupným skládáním po vrstvách z digitální předlohy navržené v softwaru CAD. Tento proces bývá také označován jako aditivní výroba (AM), rychlé prototypování (RP) a technologie pevných forem (SFF). Používanými materiály jsou kov, plast, keramika, nylon, kapaliny, prášky nebo i živé buňky.

3D tisk má řadu použití například ve stavebnictví, architektuře, potravinářství, automobilovém, strojírenském, vojenském a leteckém průmyslu. Stále častěji nachází své využití v oblasti medicíny, například ve farmaceutickém průmyslu, tkáňovém inženýrství, nebo se také používá pro výrobu implantátů a orgánů pro transplantaci. 3D tisk se používá pro výrobu lékových forem, které jsou specifické pro daného pacienta. Ve farmacii se uplatňuje především při výrobě pevných perorálních LF.

Jeho výhodami jsou flexibilita, mnohostranné využití, přesnost a rychlost. Výhodami pro použití ve farmacii je možnost zvolit vhodnou dávku léčiva, tvar, velikost a typ uvolňování.

Existuje několik variant 3D tisku, každá z nich má své výhody i nevýhody. Rozhodujícími faktory pro výběr typu 3D tiskárny jsou použité materiály a způsob spojování vrstev. Nejčastěji používanými technologiemi 3D tiskáren jsou tryskání pojiva, selektivní laserové sintrování (SLS), Fused deposition modeling (FDM), Extruze polotuhých materiálů (SSE) a Stereolitografie (SLA).²⁴⁻²⁸

1.4.1. Tryskání pojiva (Binder jetting)

Nejrozšířenější metodou 3D tisku používanou ve farmacii je tryskání pojiva, která je také označována jako práškový tisk. Tato technologie je využívána k tvorbě léčivého přípravku Spritam®, což je antikonvulzivum uváděné na trh jako orodispergovatelná tableta (ODT) a vyráběné technologií ZipDose® od firmy Aprecia.

Principem této technologie je nanášení tekutého pojiva na tenkou vrstvu prášku. Nejdříve je na pracovní plochu tiskárny rovnoměrně nanesena vrstva prášku, a to pomocí pohyblivé stěrky. Následně dochází k nástřiku pojiva inkoustovou hlavou na vrstvu prášku. Při kontaktu prášku s pojivem přilnou částice k sobě a vzniká kompaktní vrstva. První vrstva je po natisknutí překryta další a takto se celý proces cyklicky opakuje až do vzniku výsledného objektu. Na závěr se musí výrobek vyjmout z okolního nespojeného materiálu. Nevýhodou této technologie je neschopnost tisknout duté objekty.^{24,29,30}

1.4.2. Selektivní laserové sintrování – SLS

Stejně jako u technologie tryskání pojiva, se i u SLS používá jako podklad pro tisk nových objektů práškový materiál. Ke spojování se zde nepoužívá pojivo ale laser, který svými paprsky nakreslí do prášku tvar objektu a tím jsou slinuty částice prášku dohromady. Změnou energie laserového paprsku a rychlostí jeho pohybu je možné dosáhnout různého stupně slinutí.

Laserové sintrování je možné použít k výrobě kovových, plastových a keramických objektů. Výhodami SLS jsou absence rozpouštědel a rychlejší výroba oproti technologii tryskání pojiva. Detailnost metody je dána přesností laseru a jemností prášku, lze tedy tímto typem 3D tiskárny vyrábět obzvláště jemné struktury.^{24,31}

1.4.3. „Fused deposition modeling“ – FDM

Principem technologie FDM je extruzní depozice termoplastických materiálů. K nástřiku materiálu je používána tisková hlava podobná inkoustové tiskárně. Extrudované polymerní vlákno je roztaveno nebo změkčeno v tiskárně a nanášeno na pracovní desku, jejíž teplota je nižší než teplota tiskové hlavy, tím dochází k tuhnutí nanášeného polymeru. Následně jsou postupně nanášeny další vrstvy vlákna, dokud nevznikne požadovaný objekt.

Parametry, které je potřeba u FDM technologie kontrolovat jsou hustota výplně, rychlost tiskárny, výška vrstvy, teplota trysky a pracovní desky. Výhodou této technologie oproti ostatním je flexibilita, rychlost, nízké pořizovací a provozní náklady.^{24,25,26,27,32}

1.4.4. Extruze polotuhých materiálů – SSE

Principem SSE je, jak již název napovídá, extruze polotuhých materiálů. Podobně jako u FDM dochází k nanášení jednotlivých vrstev extrudovaného materiálu, ten je extruzním nástavcem protlačován pomocí stlačeného vzduchu nebo pístu.²⁴

1.4.5. Stereolitografie – SLA

Stereolitografie je technologie principiálně podobná SLS, rozdílem je použitý tiskový materiál. SLA využívá tekuté fotopolymerizační materiály, které po ozáření laserem o určité vlnové délce tuhnou. Laserový paprsek kreslí požadovaný tvar na základní platformu, která je ponořena ve fotopolymeru. Po dokončení vrstvy je platforma zvednuta o určitou výšku vrstvy. Takto se pokračuje až do vzniku výsledného objektu. V některých případech ještě dochází k dotvrzení pomocí UV záření.²⁴

1.5. Fekální transplantace

Fekální transplantace je lékařský úkon, kdy dochází k přenosu fekálního materiálu ve formě suspenze od zdravého jedince do GIT nemocného pacienta, cílem tohoto úkonu je léčba nemoci spojené se změnami střevního mikrobiomu. Může být dále označována jako fekální mikrobiální terapie (FMT), fekální bakterioterapie, anebo jako transplantace střevního mikrobiomu (TSM). Tato metoda má stále častější využití, zejména pak u pacientů trpících kolitidou, způsobenou bakterií *Clostridium difficile* (CDI). Je známa spousta randomizovaných studií, metaanalýz a důkazů, že je proti této infekci léčba pomocí FMT vysoce účinná.³³⁻³⁸

Historicky sahá metoda přenosu fekálního materiálu až do 4. století, kdy byly v Číně takto léčeny těžké poruchy zažívání. Dále byla používána v oblasti severní Afriky, kde byla léčena úplavice pomocí fekálií velbloudů. První transplantace lidské fekální mikrobioty byla v západní literatuře zaznamenána v roce 1958, kdy americký chirurg Ben Eiseman takto léčil pseudomembranózní kolitidu u čtyř těžce nemocných pacientů.³⁹

Střevní mikrobiom je u dospělého člověka poměrně stabilní, měnit se může dlouhodobými změnami stravy, životního stylu, cestováním, nemocemi a chirurgickými zákroky. Velkým rizikovým faktorem pro změnu střevního mikrobiomu je užívání systémových antibiotik. Ty mají za důsledek snížení druhové rozmanitosti, antimikrobiálních peptidů produkovaných komenzálními bakteriemi a díky snížení kompetitivní inhibice patogenů také ztrátu odolnosti vůči kolonizaci. Porušení střevní mikrobioty je označováno jako dysbióza, to může mít za následek různá onemocnění, jako jsou infekce *Clostridium difficile*, idiopatické střevní záněty (IBD), autoimunitní onemocnění, syndrom dráždivého tračníku, metabolické poruchy, alergie a kardiovaskulární onemocnění.³³⁻³⁸

Největší využití má FMT stále zatím u léčby infekce *Clostridium difficile*. První volbou u léčby tohoto onemocnění je perorální léčivo Metronidazol, u závažnější infekce je často používán také Vankomycin. Pokud dochází u pacientů, kteří absolvovali antibiotickou léčbu k opakování infekce dvakrát nebo třikrát, je u nich potom malá šance na znovu účinnou léčbu antibiotiky. Větší šanci na vyléčení potom poskytuje fekální transplantace. Jednorázová léčba vyléčí 80-90 % pacientů trpících CDI, zatímco léčba Vankomycinem poskytuje 26-30 % míru vyléčení. Při opakování léčby FMT se zvyšuje míra vyléčení na 95 %. Fekální transplantace je také méně nákladná a zlepšuje kvalitu života oproti léčbě Vankomycinem.³³⁻³⁸

Existuje více způsobů, jak lze tuto metodu aplikovat, je možné podání suspenze do horní nebo dolní části GIT. Dolní gastrointestinální cestou je FMT prováděna kolonoskopicky do

vzestupného tračníku anebo retenčním klystýrem. Podání horní gastrointestinální cestou je možné nasoduodenálně. Jsou také prováděny studie pro léčbu FMT perorální lékovou formou pomocí enterosolventních tobolek. Tato forma podávání by byla dostupnější pro léčbu FMT a také zřejmě žádanější pro complianci pacienta. Tobolky kombinují výhody antibiotik (pohodlné podání) a fekální transplantace (cena a vysoká účinnost). Nevýhodou této formy podání může být polykání velkého množství tobolek.^{33,38}

1.6. Optická mikroskopie

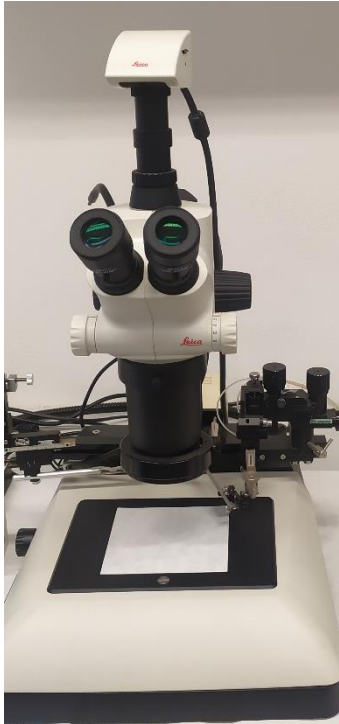
Optická mikroskopie patří mezi mikroskopické metody, které umožňují pozorovat okem nerozlišitelné věci. Úkolem mikroskopu je vytvoření zvětšeného obrazu vzorku (zvětšení), oddělení jednotlivých detailů (rozlišení) a vykreslení detailů tak, aby byly rozlišitelné okem, kamerou nebo jiným zobrazovacím zařízením (kontrast). Počátky současné mikroskopie sahají do počátku 16. století, kdy byl Holanďany Hansem a Zachariase Janssenovými sestaven první složený mikroskop s dvěma konvexními čočkami. Tento mikroskop se skládal ze dvou konvexních čoček uspořádaných za sebou – blíže k objektu bylo předmětové sklo (objektiv) a blíže k oku pozorovatele byl umístěn okulár, součástí mikroskopu byly i prostředky pro nastavení polohy vzorku a čoček mikroskopu.⁴⁰⁻⁴³

1.6.1. Konstrukce optického mikroskopu

Optické mikroskopy se skládají ze dvou hlavních částí – optických prvků, objektivu, který se nachází blíže pozorovaného objektu a okuláru, který se nachází blízko oka pozorovatele.

Nejzásadnější funkci optického mikroskopu zastává právě objektiv. Shromažďuje světlo procházející vzorkem a promítá do těla mikroskopu skutečný, zvětšený a převrácený obraz vzorku. Také se zde umísťuje například clona pro mikroskopii v temném poli a další speciální zařízení. Dalším důležitým zařízením je okulár, díky němu je možné pozorovat zaostřený, zvětšený, skutečný obraz. Jeho funkcí je také další zvětšení. Jeho součástí je i pevná clona. Zařízení, jehož funkcí je koncentrování přicházejícího světla do svazku rovnoběžných paprsků na vzorek se nazývá kondenzor a kondenzorová clona upravuje úhel těchto paprsků.

V optické mikroskopii je využíváno elektromagnetické záření s vlnovými délkami okolo 180-1300 nm. Kvalita použitých optických soustav má zásadní vliv na výsledný obraz. Klasický mikroskop je zobrazen na obrázku 6.



Obrázek 6: Konstrukce optického mikroskopu LEICA S8APO

Pozorovaný předmět je umístěn blízko před předmětovým ohniskem. Vznikne skutečný, převrácený a zvětšený obraz předmětu, který pozorujeme okulárem. Ohnisková vzdálenost objektivu je řádově v mm a ohnisková vzdálenost okuláru řádově v cm. Mechanická konstrukce mikroskopu se odvíjí od typu vzorku, který chceme pozorovat a jeho osvětlení. Osvětlení vzorku je možné nastavit na průchod vzorkem nebo na odraz. Používá se difúzní světlo, Köhlerův osvětlovač nebo vertikální iluminátor. Použité osvětlení vzorku má zásadní vliv na jeho kvalitu zobrazení různých detailů a na celkový kontrast.⁴⁰⁻⁴⁴

Osvětlení optického mikroskopu je většinou zajištěno vestavěnou lampou. Na základě použitého osvětlení existuje několik metod optické mikroskopie:⁴⁰⁻⁴⁴

- Metoda světlého pole
- Metoda tmavého pole
- Metoda šikmého osvětlení
- Metoda fázového kontrastu
- Metoda interferenčního kontrastu
- Infračervená mikroskopie
- Polarizační mikroskopie
- Fluorizační mikroskopie a další.

1.7. Disoluční zkoušky

Součástí všech fází vývoje nových perorálních lékových forem jsou disoluční zkoušky, které slouží k testování uvolňování a stability léčiva. Při zkoušce dochází k uvolňování účinné látky z lékové formy a rozpouštění do okolní kapaliny (média). Výsledkem tohoto testování je disoluční profil léčiva, z něj je možné vyhodnotit mechanismus a rychlost uvolňování. Běžně se tyto zkoušky používají pro kontrolu kvality léčivých přípravků, ale slouží také k vyhodnocení bioekvivalence generických léčiv a k predikci biologické dostupnosti léčivé látky (*in vivo*). Při vývoji nových léčiv se prostřednictvím disoluční zkoušky odhaduje jeho chování v organismu a vliv kritických výrobních proměnných.

Provedení disoluční zkoušky je definováno Českým lékopisem [45]. Při jejím provedení je nutné vždy uvést použitý disoluční přístroj, zvolenou metodu, dobu trvání disoluční zkoušky, složení, objem a teplotu disolučního média, rychlost otáčení pádel nebo košíčků (rpm) popřípadě průtok disoluční kapaliny. Při testování jsou používána disoluční média, což jsou roztoky simulující prostředí jednotlivých částí GIT. Nejčastěji používanými médii jsou 0,1M HCl a acetátové nebo fosfátové tlumivé roztoky s různým pH. Nejpoužívanějšími metodami pro disoluční testování perorálních lékových forem jsou metoda košíčková a pádelková, ale používají se i přístroje s vratným válcem nebo průtokovou celou.⁴⁶⁻⁵⁰

2. Experimentální část

2.1. Optický mikroskop

Na optickém mikroskopu (Obr. 7) byly zkoumány vzorky přírodních polysacharidů (prášek), z nich vyrobená vlákna a tobolky. Bylo použito zvětšení 1 (šířka zorného pole 1 cm), 2 (šířka zorného pole 5 mm), 2,5 (šířka zorného pole 4 mm) a 4 (šířka zorného pole 2,5 mm). Vzhledem k malé hloubce ostrosti byla pro každý vzorek nasnímána série snímků s postupně se měnícím zaostřením od nejbližšího k nejbližšímu bodu a z této série byl programem CombineZM vypočítán výsledný snímek zaostřený v celém požadovaném rozsahu.

Vzorky byly osvětlovány prstencovým bílým světlem umístěným okolo objektivu mikroskopu (osvětlení shora) nebo prstencovým žlutým světlem zdola. K rozptýlení světla při dolním osvětlení byl použit papírový filtr umístěný pod vzorkem.

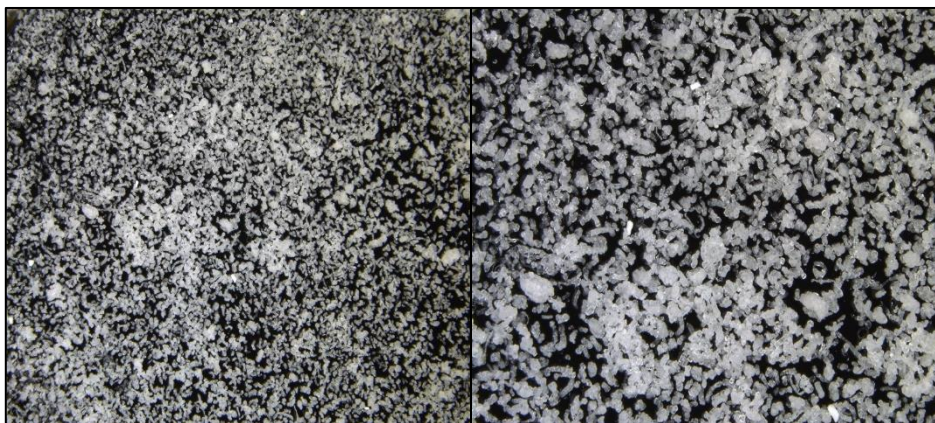


Obrázek 7: Optický mikroskop LEICA S8APO s příslušenstvím

2.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky

- Optický mikroskop LEICA S8APO
- Digitální mikroskopická kamera LEICA MC120 HD
- Zdroj studeného světla LEICA CLS 150 XC
- Program pro zaostření fotografií CombineZM

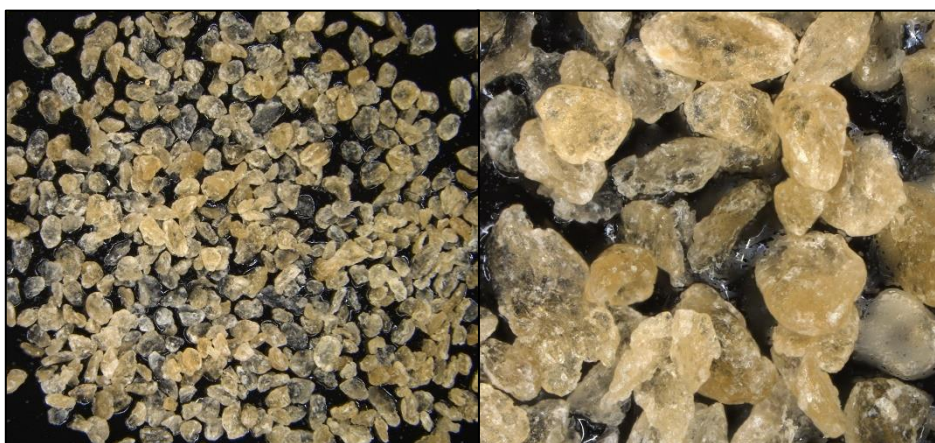
2.1.2. Affinisol



Obrázek 8: AffinisolTM (prášek), vlevo zvětšení 1, vpravo zvětšení 2

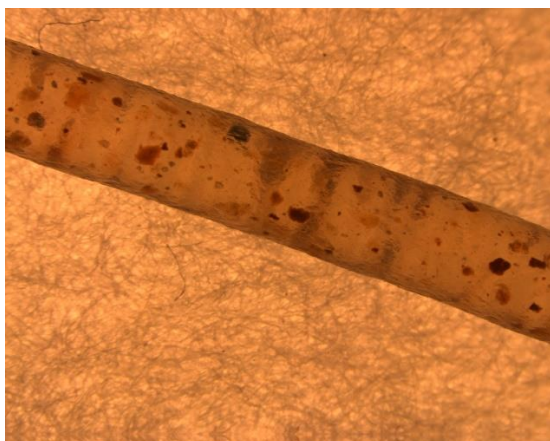
Na obrázku 8 lze pozorovat bílé krystalky AffinisoluTM vyfocené optickým mikroskopem. Vpravo můžeme vidět krystalky dvakrát přiblížené, jsou zde lépe vidět detaily krystalické struktury prášku. Spektrum barev krystalů je od klasické bílé přes bílou s nádechem šedé po sněhově bílou. Tvary krystalů se různí, máme zde válcovité a elipsoidní tvary a některé mohou připomínat zrnka rýže. V pozadí obrázku můžeme vidět černou podkladovou plochu pro kontrast na optickém mikroskopu.

2.1.3. Alginát



Obrázek 9: Alginát (prášek), vlevo zvětšení 2, vpravo zvětšení 8

Na obrázku 9 můžeme pozorovat prášek alginátu v optickém mikroskopu. Jedná se o krystalky okrové, světle béžové někdy až jantarové a bílé barvy. Strukturou připomínají cukr krystal a některé obsahují bílé žilky. Velikost krystalů je kolem 100 μm . V druhé části obrázku 9 napravo můžeme vidět zvětšený výřez z levé části obrázku. Zde lze spatřit nejednotnost v tvarech krystalů, některé jsou oválné a elipsoidní, jiné hranaté, tj. čtvercové a kosočtvercové. Některé mají ostré hrany a vystupují do prostoru a jiné jsou ploché.



Obrázek 10: Vlákno obsahující alginát

Na obrázku 10 vidíme vlákno s přídavkem alginátu sodného zobrazené optickým mikroskopem. Jedná se o válcové vlákno (filament), které bylo vyrobeno metodou hot melt extrusion (HME) z práškového alginátu. Tento filament má na mikroskopu hnědou místy i šedou barvu. Hnědé a načervenalé skvrny různé sytosti a velikosti jsou připečeniny vzniklé při procesu extrudování. Průměr vlákna je 2 mm. Jako podklad pro tento obrázek byl použit filtrační papírek bílé barvy. Pro snímek z optického mikroskopu bylo použito nasvícení žlutým světlem zdola, což může zkreslovat vnímání barvy vlákna, ale na druhou stranu umožňuje pozorovat větší detaily filamentu.

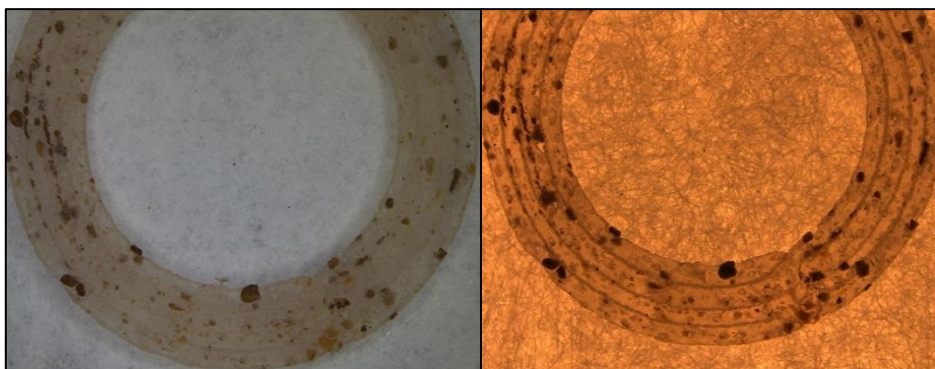


Obrázek 11: Tobolka obsahující alginát

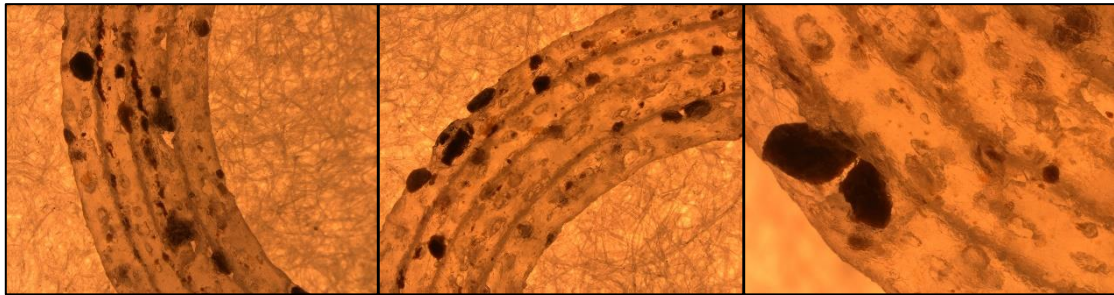


Obrázek 12: Tobolka obsahující alginát, vlevo pohled shora a vpravo zdola

Na obrázku 11 vlevo můžeme vidět jednotlivé vrstvy tvořící stěnu tobolky obsahující alginát. Vrstvy jsou tvořeny jednotlivými vlákny nahnědlé až medové barvy. Drobné skvrny hnědé, žluté a černé barvy jsou již výše zmíněné spáleniny vzniklé při procesu extruze. Obrázek 11 v pravé části ukazuje boční pohled na dno tobolky. Přehledně jdou vidět jednotlivé prstencovité vrstvy vlákna. Na konci se tobolka zužuje a poslední vrstva je nad úrovní uzavření dna tobolky. Tobolka trochu připomíná strukturu slaměného včelího úlu. Průměr tobolky je 1 cm. Jako podklad pro obrázek 11 je opět použit bílý filtrační papír. Na obrázku 12 vlevo vidíme tobolku s přídavkem alginátu na optickém mikroskopu z pohledu shora. Při nasypání prášku do tobolky se tobolka uzavírá víčkem stejného materiálu a tvaru z druhé strany. Na obrázku lze spatřit rozostřené dno tobolky a čtyři paralelní do kruhu stočená vlákna vytvářející prstenec – jednu vrstvu stěny tobolky. I zde jsou zjevně vidět připáleniny. Na obrázku 12 vpravo můžeme vidět dno tobolky, které je rovněž medově hnědé až hnědé barvy a má mřížkovou strukturu. Vlákna vytvářející mřížku svírají úhel 90 stupňů. Detailně viditelné jsou vrstvy tvořené vlákny, zejména poslední vrstva, která převyšuje dno tobolky, a rovněž je vidět i zúžení tobolky u dna, které poněkud připomíná strukturu slaměného včelího úlu. Zde jsou ještě výrazněji vidět připáleniny, zejména ty černé a hnědé na dně tobolky v mřížce.



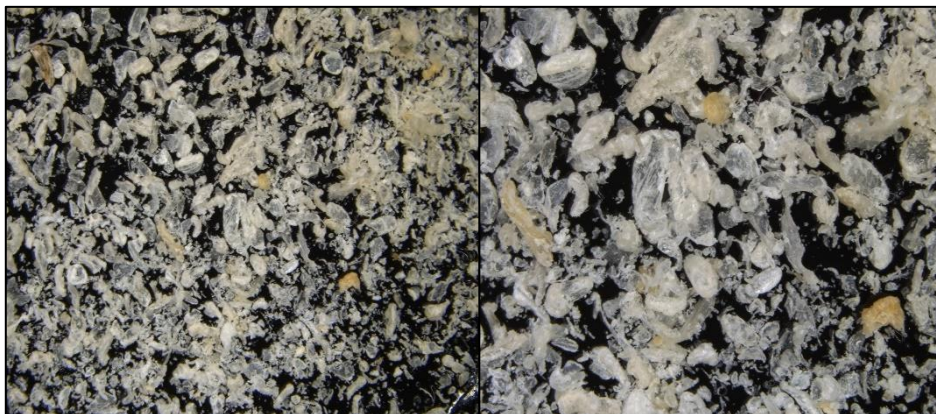
Obrázek 13: Vrstva tobolky obsahující alginát



Obrázek 14: Vrstva z tobolky obsahující alginát, vlevo a uprostřed zvětšení 2, vpravo zvětšení 2,5

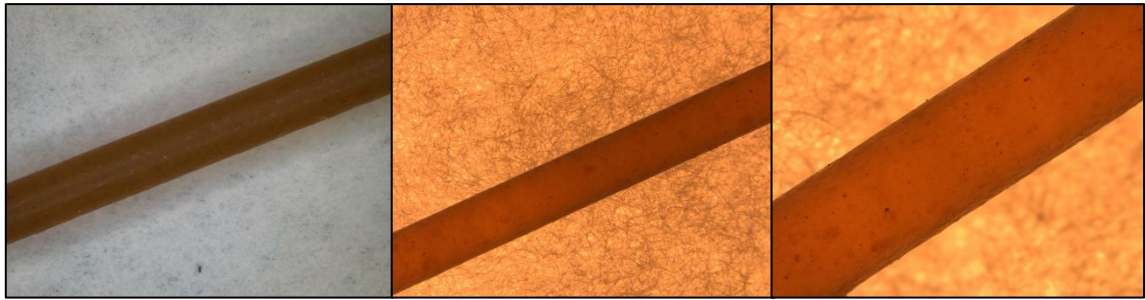
Na obrázku 13 vlevo vidíme jednu odtrženou vrstvu (prstenec) ze stěny tobolky obsahující alginát, která je tvořena čtyřmi těsně vedle sebe umístěnými vlákny uspořádanými do kruhu. Na bílém podkladovém papíře se vlákna jeví jako průhledná s nádechem do žluté či hnědé barvy. Nejvýraznější jsou připáleniny vzniklé při extruzi a 3D tisku. Barva připálenin je žlutá, nahnědlá až téměř černá. Na obrázku 13 vpravo vidíme totožný úkaz, s tím rozdílem že je nasvícen žlutým světlem zdola. Na obrázku 14 pak máme zvětšenou odtrženou vrstvu, která byla natištěna z vlákna obsahujícího alginát. Vidíme zde části čtyř soustředných kruhových vláken vytvořené 3D tiskem. Levá část obrázku 14 je levá střední výseč kruhu tobolky, prostřední je levé horní zakřivení kruhu a pravá část obrázku je levá dolní část kruhu se zaměřením na zrna nejvýraznější spáleniny odtržené vrstvy. Ve vláknech je rovněž vidět velké množství jemných vzduchových bublin.

2.1.4. Chitosan



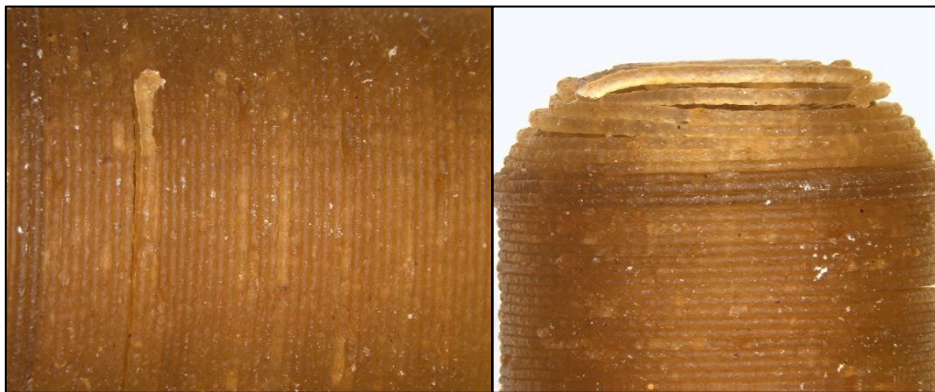
Obrázek 15: Chitosan (prášek), vlevo zvětšení 1, vpravo zvětšení 2

Krystalky chitosanu zachycené na obrázku 15 jsou vesměs průhledné až bílé barvy s lehkým odleskem, je zde vidět pár krystalků světle hnědé až naoranžovělé barvy. Struktura je nejednotná, krystalky chitosanu jsou různých tvarů a velikostí, většina z nich je oválného tvaru, ale jsou zde i krystalky hranaté.

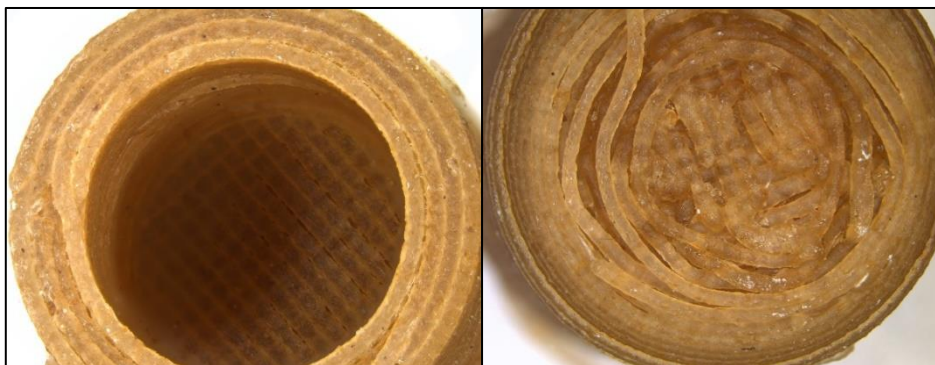


Obrázek 16: Vlákno obsahující chitosan, osvětlení shora (vlevo, zvětšení 1) a zdola (uprostřed a vpravo zvětšení 1 a 2)

Na obrázku 16 vidíme vlákno s přidavkem chitosanu. Jedná se o válcové vlákno (filament), které bylo vyrobeno metodou HME z práškového chitosanu. Tento filament má na mikroskopu světle hnědou barvu. Hnědé, černé a načervenalé skvrny různé sytosti a velikosti jsou připečeniny vzniklé při procesu extrudování. Oproti vláknu alginátu je zde připečenin méně. Snímek vlevo je nasvícen bílým světlem shora a pro zbývající dva snímky bylo použito nasvícení žlutým světlem zdola, což zkresluje barvy vlákna na obrázku.



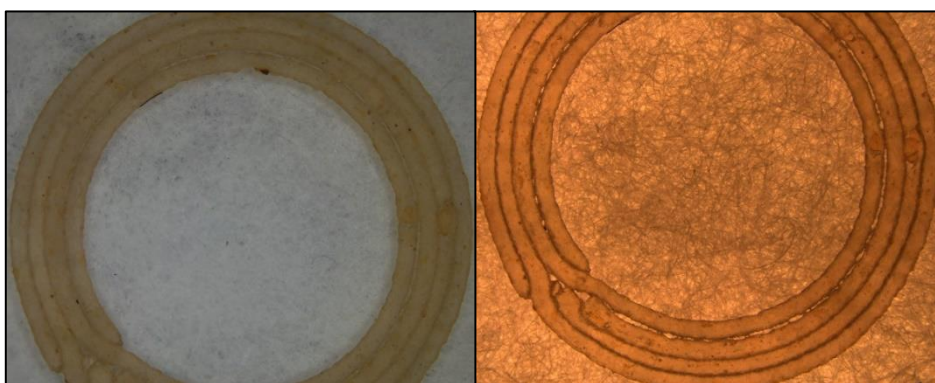
Obrázek 17: Tobolka obsahující chitosan, boční pohled



Obrázek 18: Tobolka obsahující chitosan, vlevo pohled shora, vpravo zdola

Na obrázku 17 vlevo můžeme vidět jednotlivé vrstvy tobolky obsahující chitosan. Vrstvy jsou tvořeny jednotlivými vlákny hnědé až medové barvy. Můžeme opět pozorovat drobné připečeniny hnědé, oranžové a žluté barvy vzniklé při procesu extrudování. Snímek

vpravo zobrazuje boční pohled na dno tobolky. Přehledně jdou vidět jednotlivé válcové vrstvy vlákn. Na obrázku 18 vlevo vidíme tobolku obsahující chitosan při pohledu shora. Na obrázku lze spatřit mřížkované dno tobolky a čtyři paralelní do kruhu stočená vlákna vytvářející prstenec – jednu vrstvu stěny tobolky. I zde jsou připáleniny vidět výrazně méně. Na obrázku 18 vpravo můžeme vidět dno tobolky, které je rovněž medově hnědé až hnědé barvy a má mřížkovou strukturu. Vlákna vytvářející mřížku svírají úhel 90 stupňů. Detailně viditelné jsou vrstvy tvořené vlákny, zejména poslední vrstva, která převyšuje dno tobolky a rovněž je vidět i zúžení tobolky u dna. I zde jsou připáleniny méně výrazné než u tobolky obsahující alginát, nicméně je zde více vidět nedokonalé provedení 3D tisku.



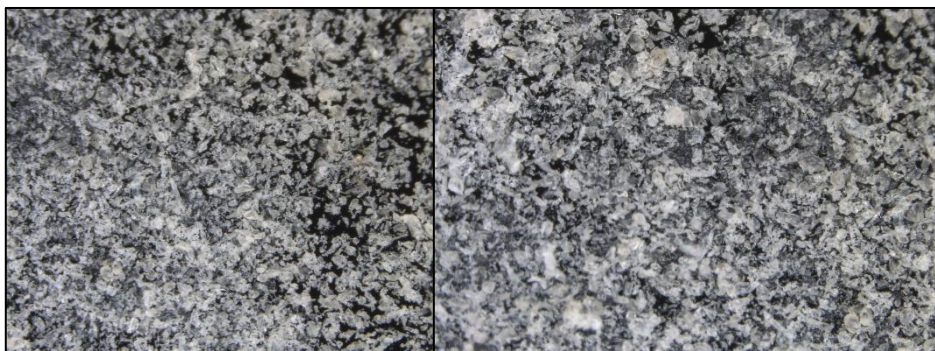
Obrázek 19: Vrstva z tobolky obsahující chitosan



Obrázek 20: Vrstva z tobolky obsahující chitosan, zvětšení 2

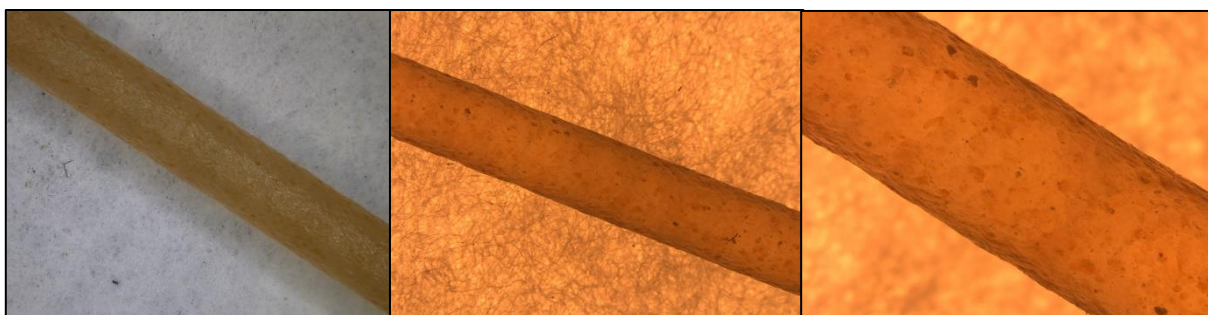
Na obrázku 19 vlevo vidíme jednu odtrženou vrstvu z tobolky obsahující chitosan, která je tvořena čtyřmi vedle sebe ležícími soustřednými vlákny uspořádanými do kruhu. Barva vrstvy je světle hnědá až béžová. Připáleniny černé, hnědé a nažloutlé barvy zde nejsou moc výrazné. Na obrázku 19 je vrstva chitosanu nasvícena žlutým světlem zdola, díky tomu více vynikají detaily. Na obrázku 20 pak vidíme zvětšenou odtrženou vrstvu, která byla natištěná z vlákna obsahujícího chitosan. Vidíme zde části čtyř soustředných kruhových vláken. Levá část obrázku 20 je levá spodní výseč kruhu tobolky, která nám ukazuje nedokonalosti v propojení filamentu, druhá zleva je pravá stredo-horní část odtržené vrstvy kruhu. Obě jsou nasvíceny žlutým světlem zdola. Pravá část obrázku 20 je totožná s levou částí s tím rozdílem, že je nasvícena bílým světlem shora.

2.1.5. Citrusový pektin



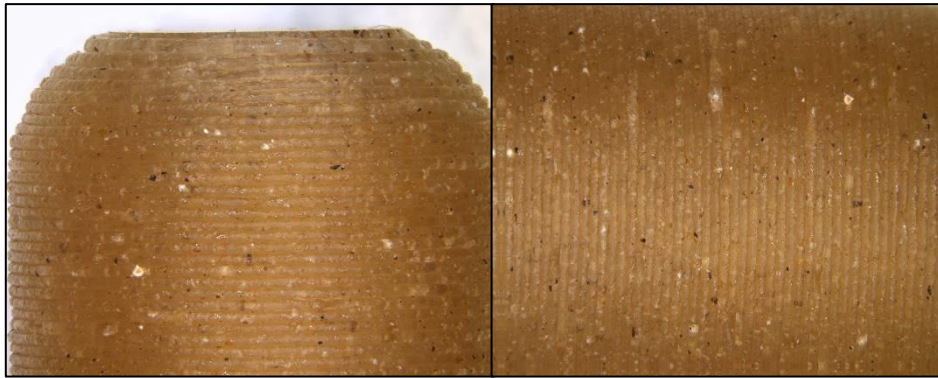
Obrázek 21: citrusový pektin (prášek), vlevo zvětšení 1, vpravo zvětšení 2

Na obrázku 21 vidíme prášek citrusového pektinu na černé podložce. Krystalky jsou průhledné, jejich barva je bílá až nažloutlá. Jejich tvarová různorodost nedovoluje přesně popsat majoritní zastoupení tvarů. Nejvýraznější shluk krystalů je v levé střední části obrázku. Pravá část obrázku je přiblížení a zvětšení levé části.



Obrázek 22: Vlákno obsahující citrusový pektin, osvětlení shora (vlevo, zvětšení 1) a zdola (uprostřed a vpravo, zvětšení 1 a 2)

Obrázek 22 nám ukazuje vlákno s přídavkem citrusového pektinu (filament) vyrobené metodou HME. Jedná se o válcové vlákno béžové až béžovohnědé barvy. Zrna spáleniny pektinu jsou poměrně malá a mají na tomto vlákně téměř výhradně hnědou barvu. Prostřední snímek je totožný jako snímek levý, jen je nasvícen žlutým světlem, které v tomto případě zvýrazňuje detaily vlákna. Pravý snímek je zvětšenina prostředního snímku a ještě lépe zde vynikají detaily vlákna.

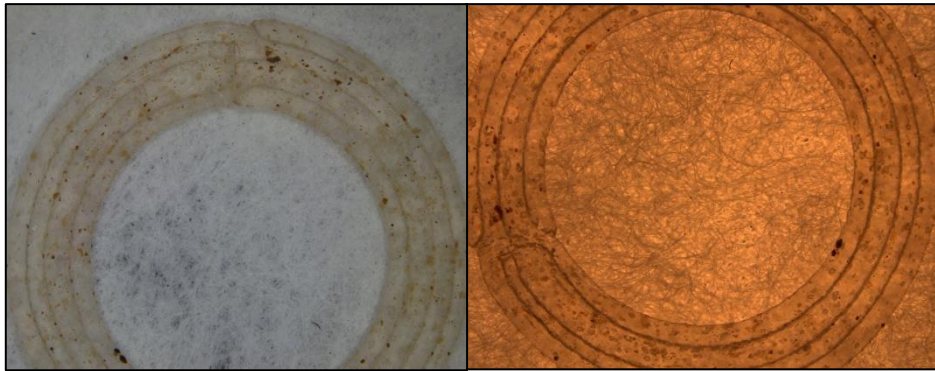


Obrázek 23: Citrusový pektin (tobolka)



Obrázek 24: Tobolka obsahující citrusový pektin, vlevo pohled shora, vpravo zdola

Na obrázku 23 vlevo je zachycena ležící tobolka, která se na konci směrem ke dnu zužuje. Na snímku vpravo vidíme opět jednotlivá vlákna tobolky hnědé, béžovohnědé až medové barvy. I zde je viditelná struktura slaměného včelího úlu, a lze zaznamenat daleko menší nedokonalosti v 3D tisku než v předchozích případech. Levý snímek z obrázku 24 zachycuje tobolku obsahující citrusový pektin při pohledu shora. Na obrázku lze spatřit rozostřené dno tobolky a čtyři paralelní do kruhu stočená vlákna vytvářející prstenec – jednu vrstvu stěny tobolky. Připálenin je zde zhruba stejně, jako u tobolky obsahující alginát. Na pravém snímku obrázku 24 je vidět dno tobolky, které je rovněž medově hnědé až hnědé barvy a má mřížkovou strukturu. Vlákna vytvářející mřížku svírají úhel 90 stupňů. Detailně viditelné jsou vrstvy tvořené vlákny, zejména poslední vrstva, která převyšuje dno tobolky a rovněž je vidět i zúžení tobolky u dna. Připáleniny jsou téměř výhradně černé barvy.



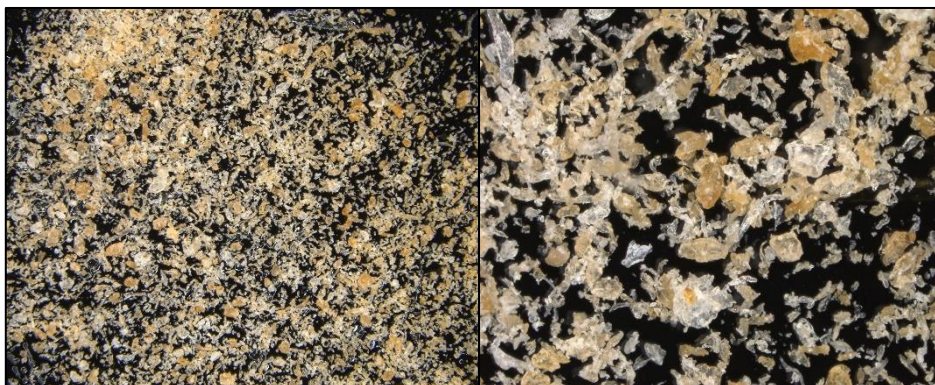
Obrázek 25: Vrstva z tobolky obsahující citrusový pektin



Obrázek 26: Vrstva z tobolky obsahující citrusový pektin, vlevo a uprostřed zvětšení 2, vpravo zvětšení 2,5

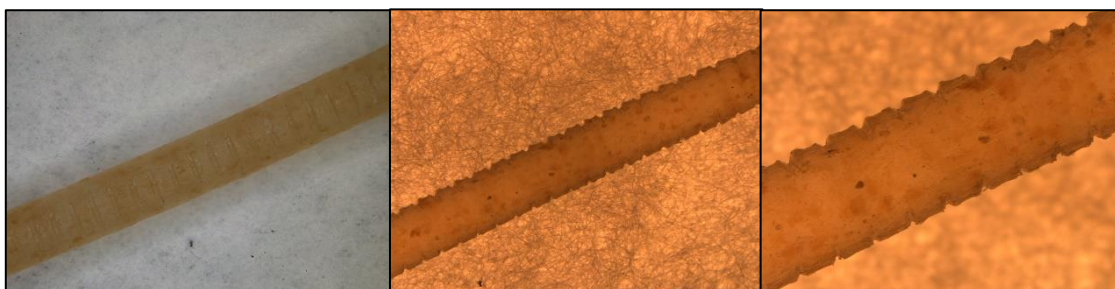
Na obrázku 25 vlevo vidíme jednu odtrženou vrstvu z tobolky obsahující citrusový pektin, která je tvořená ze čtyř vedle sebe jdoucích soustředných vláken uspořádaných do tvaru kruhu. Na bílém podkladovém papíře se vlákna jeví jako průhledná s nádechem do béžové nebo žluté barvy. Připáleniny jsou zde převážně světle hnědé barvy, ale místy jsou i černé a lehce nažloutlé. Na pravém snímku obrázku 25 je vrstva nasvícena žlutým světlem zdola. Díky tomu se nám mění barevné spektrum, ale je zachyceno více detailů. Na obrázku 26 pak máme zvětšenou odtrženou vrstvu, která byla natištěna z vlákna obsahujícího citrusový pektin. Je dobře patrné, že jsou jednotlivé vrstvy tvořeny čtyřmi soustřednými kruhovými vlákny. Levá část obrázku 26 je spodní střední výseč kruhu tobolky nasvícená žlutým světlem zdola, prostřední část je nasvícena bílým světlem shora. Pravá část je nasvícena žlutým světlem zdola a ukazuje nedokonalost napojení vláken při 3D tisku a jejich nestejnou tloušťku. Ve vláknech je rovněž vidět velké množství jemných vzduchových bublin.

2.1.6. Jablečný pektin



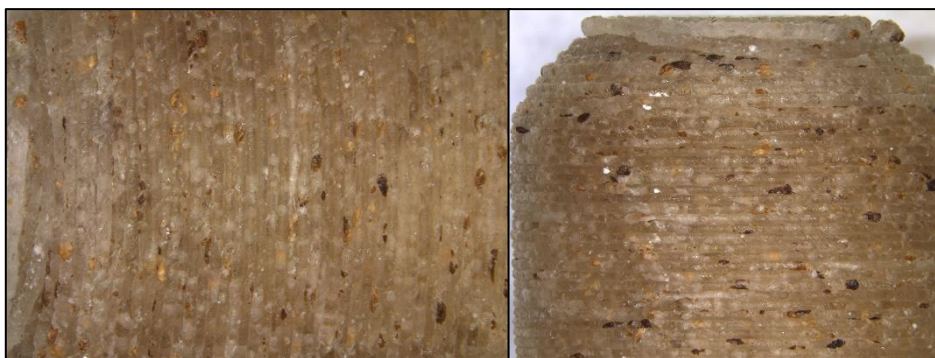
Obrázek 27: Jablečný pektin (prášek), vlevo zvětšení 1, vpravo zvětšení 2

Posledním zkoumaným polymerním materiálem byl jablečný pektin. Na obrázku 27 vidíme prášek jablečného pektinu na černé kontrastní podložce. Krystalky jsou žluté, nažloutlé, bílé a jantarové barvy. Jejich nejčastější tvary jsou hvězdicové, válcové, trojúhelníkové a čtvercové. Krystalky se jeví jako velmi jemné. Nejvýraznější shluk krystalů je v levé horní části obrázku. Pravá část obrázku je přiblížení a zvětšení levé části.



Obrázek 28: Vlákno obsahující jablečný pektin, osvětlení shora (vlevo, zvětšení 1) a zdola (uprostřed a vpravo, zvětšení 1 a 2)

Obrázek 28 nám ukazuje vlákno obsahující jablečný pektin (filament) vyrobené metodou HME. Jedná se o válcové vlákno béžové barvy přes béžovohnědou až ke žluté s drobnými zářezy podél celé délky vlákna v pravidelných rozestupech. Spáleniny v něm rovněž nejsou tak výrazné a mají téměř výhradně světle hnědou barvu. Prostřední část obrázku je pootočená tak, aby zářezy na bocích vlákna byly viditelné z profilu. Prostřední část je nasvícena žlutým světlem a přehledně ukazuje detaily rovnoramenných lichoběžníkových zoubků, které tam vytvořily zářezy. Struktura vlákna na prostřední části obrázku připomíná ruční pilový list. Pravá část obrázku je zvětšenina prostřední části také nasvícená žlutým světlem, lépe zde vynikají detaily vlákna.

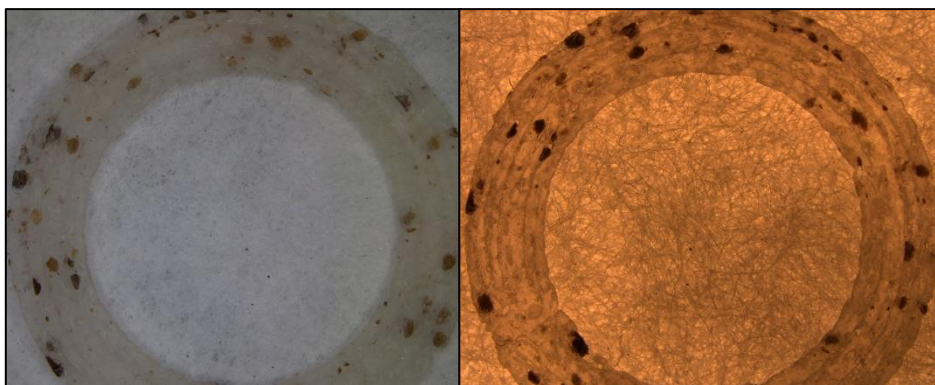


Obrázek 29: Tobolka obsahující jablečný pektin

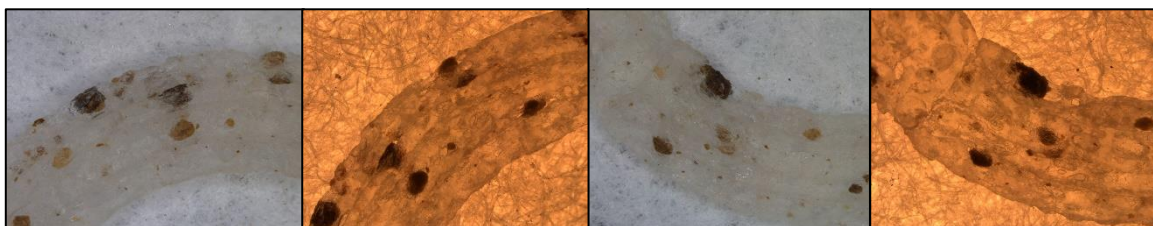


Obrázek 30: Tobolka obsahující jablečný pektin, vlevo pohled shora, vpravo zdola

Na obrázku 29 vlevo vidíme opět jednotlivá vlákna tobolky hnědé, béžovohnědé až medové barvy. Na pravém snímku obrázku 29 je boční pohled na dno tobolky obsahující jablečný pektin, které se na konci směrem ke dnu zužuje. I zde je viditelná struktura slaměného včelího úlu, a lze zaznamenat drobné nedokonalosti v 3D tisku na vrchu tobolky. U této tobolky jsou velmi výrazné spáleniny hnědé, černé a žluté barvy. Levý snímek obrázku 30 zachycuje tobolku jablečného pektinu při pohledu shora. Na obrázku lze spatřit rozostřené dno tobolky a čtyři paralelní do kruhu stočená vlákna vytvářející prstenec – jednu vrstvu stěny tobolky. I zde jsou výrazné připáleniny. Na pravém snímku obrázku 30 je zachycené dno tobolky, které je rovněž medově hnědé až hnědé barvy a má mřížkovou strukturu. Detailně viditelné jsou vrstvy tvořené vlákny, zejména poslední vrstva, která převyšuje dno tobolky a rovněž je vidět i zúžení tobolky u dna které lehce připomíná strukturu slaměného včelího úlu. Připáleniny jsou černé, hnědé a nažloutlé barvy.



Obrázek 31: Vrstva z tobolky obsahující jablečný pektin



Obrázek 32: Vrstva z tobolky obsahující jablečný pektin, zvětšení 2,5

Obrázek 31 zachycuje odtrženou vrstvu filamentu jablečného pektinu, tvořenou ze čtyř vedle sebe jdoucích soustředných vláken uspořádaných do kruhu. Na bílém podkladovém papíře se vlákna jeví jako průhledná s nádechem béžové nebo žluté barvy. Připáleniny černé, hnědé a nažloutlé barvy jsou zde opět velice výrazné. Levý snímek je nasvícen bílým světlem shora a pravý snímek žlutým světlem zdola. Na obrázku 32 pak máme zvětšenou odtrženou vrstvu, která byla natištěna z vlákna obsahujícího jablečný pektin. Vidíme zde části čtyř soustředných kruhových vláken z 3D tiskárny. Všechny snímky na obrázku 32 zachycují nedokonalosti pozorované na vrstvě tobolky, první a třetí snímek jsou nasvícené bílým světlem shora, zatímco druhý a třetí snímek jsou nasvíceny žlutým světlem zespodu.

2.2. Disoluční testy

2.2.1. Laboratorní přístroje a pomůcky

- Analytické váhy – Kern ALT 310-4AM (Kern&Sohn, Balingen, Německo)
- Předvažovací váhy PT 210 (Sartorius, Göttingen, Německo)
- Homogenizátor – Retsch MM20 (Retsch, Haan, Německo)
- Disoluční aparatura – SOTAX AT7 Smart (SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o., Allschwil, Švýcarsko)
- UV/VIS spektrofotometr – Agilent 8453 (Agilent Technologies Waldbronn, Německo)
- Kyveta 5 mm
- Běžné laboratorní sklo

2.2.2. Použité chemikálie

- Destilovaná a redestilovaná voda
- HCl (p.a. čistota, Penta s.r.o., Praha, Česká republika)
- NaCl (p.a. čistota, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- KH_2PO_4 (LachNer s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- NaOH (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)
- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (96 % v/v, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Kofein (powder, *ReagentPlus*[®], Sigma Aldrich)
- Laktóza

2.2.3. Příprava a složení enterosolventních tobolek

Byly studovány celkem 4 typy tobolek na bázi AffinisolTM s přidavkem polysacharidu. Tobolky byly připraveny metodou FDM 3D tisku na Katedře fyzikální chemie. Složení tobolek je uvedeno v Tabulce 1. Od každého typu byly připraveny 4 tobolky, 3 s účinnou látkou a 1 slepý vzorek (blank sample).

Tabulka 1: Složení tobolek připravených metodou 3D tisku

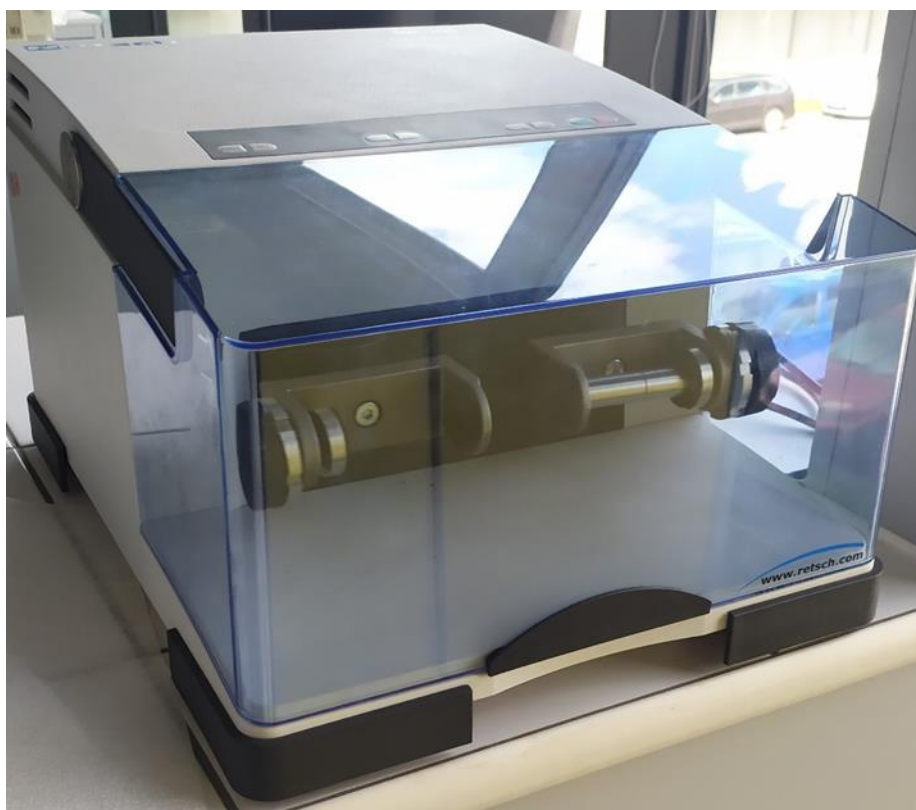
Tobolky s přidavkem alginátu sodného			Tobolky s přidavkem citrusového pektinu		
	Alginát sodný (%)	Affinisol TM (%)		Citrusový pektin (%)	Affinisol TM (%)
Tobolka A1	5	95	Tobolka P1	5	95
Tobolka A2	10	90	Tobolka P2	10	90

Tobolky (Obr. 33) byly plněny 50 mg kofeinu (modelové léčivo) a 250 mg laktózy. Celková hmotnost náplně v tobolce byla 300 mg. Ve slepém vzorku byla účinná látka nahrazena laktózou.



Obrázek 33: Tobolky s přidavkem citrusového pektinu (5 %)

Všechny látky byly naváženy na analytických vahách. Vzniklá směs byla homogenizována v homogenizátoru (Obr. 34) po dobu 3 min. (1 min. s intenzitou kmitání 10 kmitů/s, 1 min. s intenzitou kmitání 13 kmitů/s a 1 min. s intenzitou kmitání 15 kmitů/s). Poté byla směs opatrně nasypána do připravených tobolek. Odolnost tobolek vůči médiu simulujícímu prostředí žaludku a tlustého střeva byla studována metodou disolučního testu se změnou pH.



Obrázek 34: Homogenizátor RETSCH MM200

2.2.4. Příprava disolučních médií

Pro provedení disoluční zkoušky byla připravena 2 disoluční média. Disoluční médium o pH = 1,2, které simuluje prostředí žaludku a disoluční médium o pH = 6,8, simulující prostředí tlustého střeva. Obě média byla připravena podle Českého lékopisu [45].

2.2.4.1. Disoluční médium o pH 1,2

Žaludeční médium o pH 1,2 bylo připraveno smícháním 500 ml 0,2 M roztoku NaCl, 850 ml 0,2 M roztoku HCl a doplněno redestilovanou vodou na objem 2000 ml.

0,2 M roztok NaCl byl připraven z 23,38 g NaCl rozpuštěného v redestilované vodě a doplněním stejným rozpouštědlem na objem 2000 ml. 0,2 M roztok HCl byl připraven z

35,3 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a roztok byl doplněn redestilovanou vodou na objem 2000 ml.

2.2.4.2. Disoluční médium o pH 6,8

Disoluční médium o pH 6,8 bylo připraveno smícháním 500 ml 0,2 M roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného s 224 ml 0,2 M hydroxidu sodného a doplněno redestilovanou vodou na objem 2000 ml.

0,2 M roztok KH_2PO_4 byl připraven rozpuštěním 54,4 g KH_2PO_4 v redestilované vodě a poté byl doplněn stejným rozpouštědlem do 500 ml. Na přípravu 500 ml 0,2 M NaOH byly rozpuštěny 4 g NaOH v redestilované vodě a roztok byl doplněn stejným rozpouštědlem na příslušný objem.

2.2.5. Disoluční test

Provedené disoluční testy probíhaly dle Českého lékopisu [45] košíčkovou metodou v disoluční aparatuře SOTAX AT7 Smart (Obr. 35). Celkem byly provedeny 4 disoluční testy, vždy se 3 tobolkami s účinnou látkou a 1 tobolkou bez modelového léčiva (blank).

Při disolučních testech bylo vždy odměřeno čtyřikrát 900 ml žaludečního média do prvních 4 nádob, a třikrát 900 ml fosforečnanového média do dalších 3 nádob v disoluční aparatuře. Disoluce probíhala nejdříve 2 h v žaludečním médiu (pH 1,2), poté byly tobolky i s košíčkem přehozeny do disolučních nádob s fosforečnanovým médiem (pH 6,8). Blank tobolka zůstala v původní disoluční nádobě, pouze bylo vyměněno žaludeční médium za fosforečnanový pufr pH 6,8. Celková doba jednoho disolučního testu byla 15 h a 30 min.

Teplota disoluční lázně byla po celou dobu $37 \pm 0,5$ °C. Rychlost otáček košíčků byla 50 otáček/min. Odběry vzorků o objemu 3 ml probíhaly automaticky, první 2 vzorky byly odebrány po 60 minutách z žaludečního média. Po 2 h došlo k přehození tobolek do fosforečnanového média a vzorky byly poté odebrány po 30 minutách. Z média o pH 6,8 bylo celkem odebráno 27 vzorků. V odebraných vzorcích bylo stanovováno množství uvolněného modelového léčiva pomocí UV/VIS spektrometrie.



Obrázek 35: Disoluční aparatura SOTAX AT7 Smart

2.2.6. UV/VIS spektrometrie

Uvolněné množství kofeinu (modelové léčivo) bylo stanovováno pomocí UV/VIS spektrometrie. Absorbance vzorků při obou hodnotách pH byla měřena při vlnové délce 273 nm, Korekce pozadí pro kyselé médium byla nastavena v rozmezí vlnových délek 245-365 nm, pro fosforečnanový pufr v rozmezí 245-361 nm. Vzorek, který obsahoval účinnou látku, byl měřen proti slepému vzorku (blank). Pro přepočítání absorbance na koncentraci byla použita metoda kalibrační křivky.

2.2.7. Kalibrační křivky

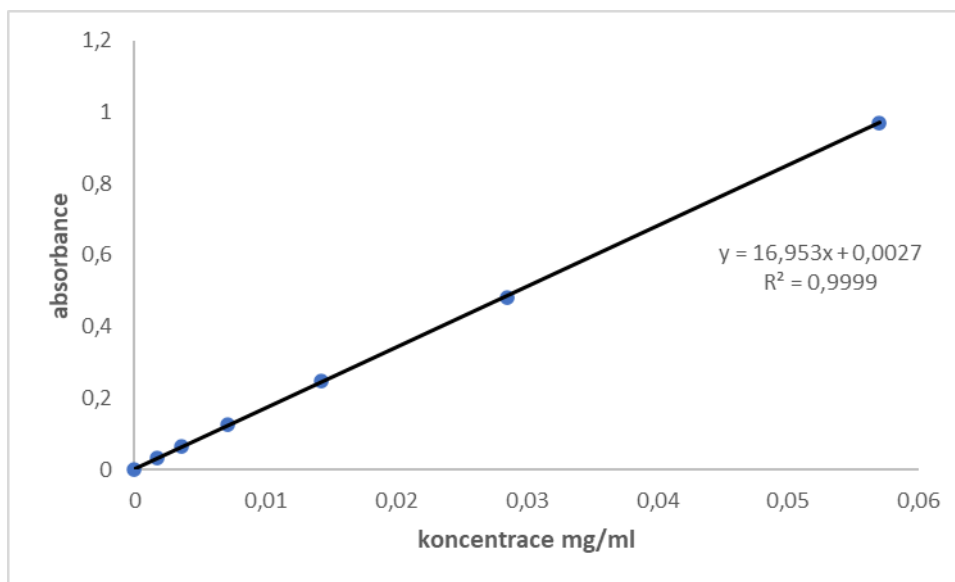
Byly připraveny dva zásobní roztoky kofeinu, jeden s disolučním médiem pH 1,2 o koncentraci 5,7 mg kofeinu/100 ml. Druhý s disolučním médiem pH 6,8 o koncentraci 5,56 mg kofeinu/100ml. Pomocí dvojkového ředění byla připravena kalibrační řada. Roztoky byly proměřeny na UV/VIS spektrometru, a poté byly ze získaných hodnot sestaveny kalibrační přímky – závislost absorbance na koncentraci kofeinu.

2.2.7.1. Kalibrační přímka pro kofein v pH 1,2

Bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku kofeinu s koncentrací 5,7 mg/100 ml s médiem o pH 1,2, dvojkovým ředěním byly dále připraveny roztoky o koncentraci 2,85, 1,43, 0,71, 0,3 a 0,18 mg kofeinu/100 ml. Vzorky byly proměřeny pomocí UV/VIS spektrometrie při vlnové délce 273 nm a ze získaných hodnot byla sestavena kalibrační přímka (Obr. 36). Z grafu

byla získána rovnice lineární regrese (1), která byla použita pro výpočet uvolněného množství modelového léčiva (x).

$$A = 16,953x + 0,0027 \quad (1)$$

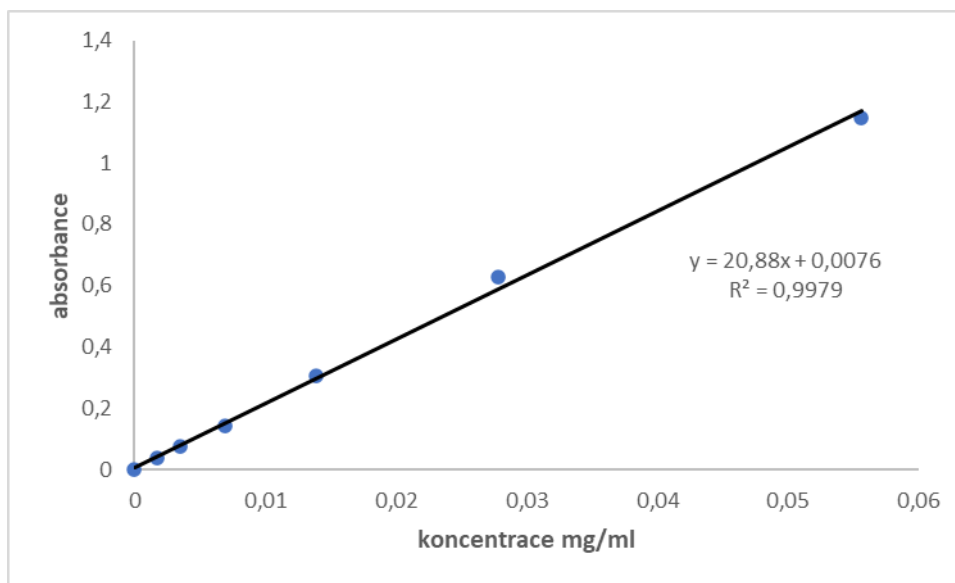


Obrázek 36: Kalibrační přímka pro kofein v médiu o pH 1,2 - závislost absorbance na koncentraci kofeinu

2.2.7.2. Kalibrační přímka pro kofein v pH 6,8

Bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku kofeinu o koncentraci 5,56 mg/100 ml s fosforečnanovým médiem, dvojkovým ředěním byly dále připraveny roztoky o koncentraci 2,78, 1,39, 0,69, 0,35 a 0,17 mg kofeinu/100 ml. Vzorky byly proměřeny pomocí UV/VIS spektrometrie při vlnové délce 273 nm a ze získaných hodnot byla sestavena kalibrační přímka (Obr. 37). Z grafu byla získána rovnice lineární regrese (2), která byla použita pro výpočet uvolněného množství.

$$A = 20,88x + 0,0076 \quad (2)$$



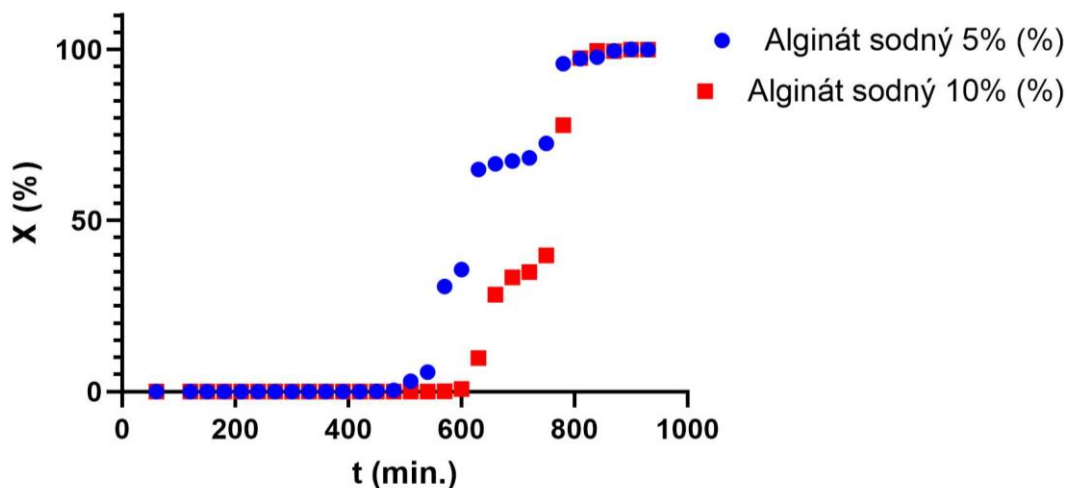
Obrázek 37: Kalibrační přímka pro kofein v médiu o pH 6,8 - závislost absorbance na koncentraci kofeinu

2.2.8. Výsledky

Pro každou řadu tobolek z různých polymerů byly naměřeny absorbance modelového léčiva (kofein), ty byly následně přepočítány na koncentrace. Z těchto údajů byly získány disoluční profily.

2.2.8.1. Tobolky s přídavkem alginátu sodného

Metodou FDM 3D tisku byly připraveny dva typy tobolek na bázi Affinisolu™ s přídavkem alginátu sodného 5 a 10 %, které byly studovány metodou disolučního testu. Získané disoluční profily jsou uvedeny na Obr. 38.



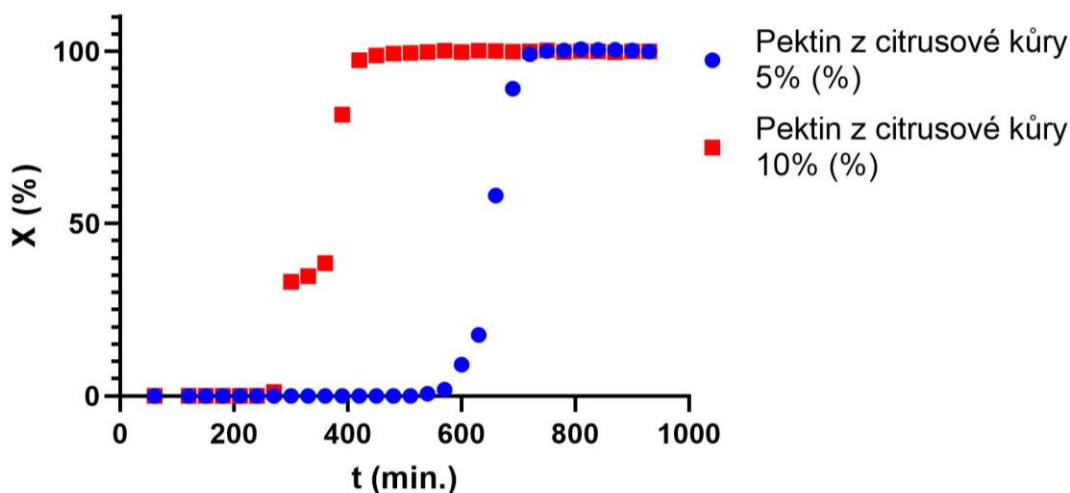
Obrázek 38: Disoluční profily tobolek s přidavkem alginátu sodného

Z Obrázku 38 je zřejmé, že u obou typů tobolek se modelové léčivo v prostředí žaludečního média neuvolňuje. U tobolek s obsahem alginátu 5 % (Obr. 38 – modrá křivka) se kofein začíná postupně uvolňovat až v médiu o pH 6,8, tedy zhruba po 8 h a 30 minutách od začátku disolučního testu. Ke kompletní degradaci tobolek a uvolnění celé dávky modelového léčiva dochází teprve po 12 h od počátku testu.

Disoluční profil tobolek s obsahem alginátu sodného 10 % (Obr. 38 – červená křivka) má podobný průběh, kofein se začíná uvolňovat až v médiu o pH 6,8, tedy po 10 h disoluce. Veškeré modelové léčivo se uvolnilo také po 12 h od počátku testu.

2.2.8.2. Tobolky s přidavkem citrusového pektinu

Dále byly metodou 3D tisku připraveny dva typy tobolek na bázi Affinisolu™ s přidavkem citrusového pektinu. Tobolky byly studovány metodou disolučního testu. Získané disoluční profily jsou uvedeny na Obr. 39. Jeden typ tobolek byl připraven s 5% obsahem citrusového pektinu (modrá křivka na Obr. 39) a druhý s 10% obsahem citrusového pektinu (červená křivka na Obr. 39).



Obrázek 39: Disoluční profily tobolek s přidavkem citrusového pektinu

U tobolek s obsahem citrusového pektinu 5 % (modrá křivka na Obr. 39) se kofein neuvolňuje v pH 1,2 a začíná se postupně uvolňovat až v médiu o pH 6,8, tedy zhruba po 10 h disolučního testu. Ke kompletní degradaci tobolek a uvolnění celé dávky modelového léčiva dochází teprve po 12 h od počátku testu.

Disoluční chování tobolek s obsahem citrusového pektinu 10 % je odlišné od tobolek s obsahem 5 % citrusového pektinu. Kofein se také neuvolňuje v pH 1,2, ale začíná se uvolňovat v médiu o pH 6,8 již po 5 h od počátku disoluce. Veškeré modelové léčivo se uvolnilo po 7 h od počátku disoluce.

3. Závěr

Tato diplomová práce se zabývá možnostmi acidorezistentní úpravy léků. Je zaměřena na použití různých polymerních materiálů pro přípravu enterosolventních tobolek pomocí FDM 3D tisku. Cílem práce bylo prostudovat vliv použitých polymerních materiálů na proces 3D tisku a následně sledovat profil uvolňování léčiva z připravených tobolek.

Pomocí optického mikroskopu byly studovány materiály použité pro přípravu tobolek (prášek, vlákna) a samotné tobolky z Affinisolu™ s přídavkem alginátu sodného, chitosanu, citrusového pektinu, nebo jablečného pektinu. Z analýzy optickým mikroskopem je patrné, že se u všech vláken vytvořily připečeniny černé, hnědé a nažloutlé barvy, v některých případech ve velkém množství. Tyto připečeniny měly potom špatný vliv na nanášení vlákna pomocí 3D tisku a docházelo ke vzniku deformací. Na odtržených vrstvách tobolek jsou zase patrné vzduchové bublinky.

V druhé části byla provedena disoluční studie připravených tobolek naplněných modelovým léčivem v disolučních médiích, které simulovaly průchod GIT. Nejprve v prostředí žaludku pH 1,2, a poté v prostředí tlustého střeva pH 6,8. Disoluční studie probíhala 15 h a 30 minut. Množství uvolněného modelového léčiva bylo stanoveno pomocí UV/VIS spektrometrie. Byly porovnávány tobolky na bázi Affinisolu™ s přídavkem alginátu sodného nebo citrusového pektinu.

Disoluční profily byly vyhodnoceny pomocí programu Graph Pad Prism 7.05. U tobolek s obsahem alginátu 5 % se kofein začínal postupně uvolňovat teprve v médiu o pH 6,8, tedy zhruba po 8 h a 30 minutách. Po 12 h se již uvolnilo veškeré modelové léčivo. Disoluce s tobolkami s obsahem alginátu sodného 10 % měla podobný průběh, kofein se začínal uvolňovat v médiu o pH 6,8, tedy po 10 h disolučního testu. Veškeré modelové léčivo se uvolnilo také po 12 h.

U tobolek obsahujících citrusový pektin byl již vidět větší rozdíl v disolučním chování v závislosti na obsahu pektinu. U tobolek s obsahem citrusového pektinu 5 % se kofein začíná postupně uvolňovat v médiu o pH 6,8 zhruba po 10 h. Po 12 h se již uvolnilo veškeré modelové léčivo. Disoluční chování tobolek s obsahem citrusového pektinu 10 % je odlišné od tobolek s obsahem 5 % citrusového pektinu. Modelové léčivo se začíná uvolňovat v médiu o pH 6,8 již po 5 h disoluce. Veškeré modelové léčivo se uvolnilo po 7 h.

Český lékopis [45] požaduje pro splnění acidorezistence tobolek odolnost LF v prostředí žaludku bez jakéhokoliv narušení, kdy je tobolka v tomto prostředí po dobu 2 h, a poté rozpuštění a uvolnění léčiva při průchodu střevem. Z žádného typu studovaných tobolek se modelové léčivo neuvolňovalo v prostředí žaludku (rozpuštění po dobu 2 h), u všech studovaných tobolek byla tedy prokázána acidorezistence. Z provedených disolučních zkoušek vyplývá, že je vhodné použití tobolek z AffinisoluTM s přídavkem alginátu sodného nebo citrusového pektinu pro cílení léčiv do kolonu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LUKÁŠ, Karel a ŽÁK, Aleš. Gastroenterologie a hepatologie: učebnice. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1787-6.
- [2] NAŇKA, Ondřej a Miloslava ELIŠKOVÁ. Přehled anatomie. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Karolinum, c2009. ISBN 978-80-7262-612-0.
- [3] NGUYEN, M.N.U., TRAN, P.H.L., TRAN, T.T.D. A single-layer film coating for colon-targeted oral delivery. *Int. J. Pharm* [online]. 2019, **559**, 402-409 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.066.
- [4] DVOŘÁČKOVÁ, K., A. FRANC a M. KEJDUŠOVÁ. Směrování léčiv do tlustého střeva. *Chem. Listy* [online]. 2013, **107**(7), 522-529 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/645>.
- [5] PHILIP, A. K., PHILIP B. Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. *Oman Med J* [online]. 2010, **25**(2), 79-87 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: DOI: 10.5001/omj.2010.24.
- [6] JANOVSÁ, L., VETCHÝ, D. a RABIŠKOVÁ, M. Nové systémy pro targeting léčiv do tlustého střeva. *Česká a Slovenská farmacie* [online]. 2006, **55**(5), 203-209 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2006-5/nove-systemy-pro-targeting-leciv-do-tlusteho-streva-3262>
- [7] KUMAR P, MISHRA B. Colon targeted drug delivery systems—an overview. *Curr Drug Deliv.* [online]. 2008;**5**(3):186–98 [cit. 2022-12-15]. Dostupné z: DOI: 10.2174/156720108784911712.
- [8] TOVEY, G. D. Pharmaceutical formulation: The science and technology of dosage forms. *The Royal society of chem* [online]. 2018, 21-48 [cit. 2022-12-11]. ISBN: 978-1-78262-040-2.
- [9] ZBOŘIL, Vladimír. Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0584-2.
- [10] MADERUELO, Cristina, LANAJOSE M. a ZARZUELO Aránzazu. Enteric coating of oral solid dosage forms as a tool to improve drug bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, **2019**(138), 1-12 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: DOI:10.1016/j.ejps.2019.105019.

- [11] SINGH, D. H., ROYCHOWDHURY, S., VERMA, P., BHANDARI, V. A review on recent advances of enteric coating. *IOSR Journal of Pharmacy* [online]. 2013, **2013**(2), 5-10 [cit. 2023-01-21]. Dostupné z: https://www.iosrphr.org/papers/v2i6/Part_1/B0260511.pdf
- [12] CZARNOCKA, Justyna K., ALHNAN, Mohamed A. Gastro-resistant characteristics of GRAS-grade enteric coatings for pharmaceutical and nutraceutical products. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **486**(1-2) 167–174 [cit. 2023-01-21]. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.03.039.
- [13] SAUMIL, Patel, ADARSH Bhadoria, Dr. PRAGNESH Patani. Colon targeted drug delivery systems: Based on Polymers. *Journal of Pharmaceutical Negative Results* [online]. 2022, **3**(13), 1980-1988 [cit. 2023-01-21]. Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S03.295>.
- [14] RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2006, **31**(7), 603-632 [cit. 2023-02-03]. ISSN 0079-6700 Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- [15] VAVŘÍKOVÁ, E., VINŠOVÁ J. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy* [online]. 2009, **103**(1), 56-65 [cit. 2023-02-03]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2882>.
- [16] GARCÍA, Jorge, LEHOCKÝ, Marian, HUMPOLÍČEK, Petr, SAHA, Petr. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of functional biomaterials* [online]. 2014, **5**, 43-57 [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: DOI: 10.3390/jfb5020043.
- [17] FARHAJ, S., AGBOTUI, T.L., NIRWAN, J.S., MAHMOOD, Q., YOUSAF A.M., HUSSAIN, T., SHAHZAD, Y., KHAN, N., CONWAY, B.R., GHORI, M.U. Carbohydrate Polymer-Based Targeted Pharmaceutical Formulations for Colorectal Cancer: Systematic Review of the Literature. *Polysaccharides* [online]. 2022, **3**(4), 692-714 [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3040040>
- [18] ZAINAB, A., AL-MOUSAWY, Dhefah H., BADRI, Z.H., AIUBE, J.K., AL-KAJAJI, H. Preparation and characterization of maleate, tartarate, and

- phthalate modified pectin. *J. Food Industries & Nutr. Sci*[online]. 2012, **2**, 57-64 [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/326070580_Preparation_and_Characterization_of_Maleate_Tartarateand_Phthalate_Modified_Pectin.
- [19] SHELKE, Namdev B., Rajaram NAGARALE a Sangamesh G. KUMBAR. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Burlington: Elsevier [online]. 2014 [cit. 2023-02-13]. ISBN 978-0-12-396983-5 Dostupné z: DOI:10.1016/B978-0-12-396983-5.00007-7.
- [20] SKAUGRUD, O., HAGEN, A., BORGERSEN, B. a DORNISH, M. Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan. *Biotechnol Genet Eng Rev* [online]. 1999, **16**(1), 23-40 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: DOI:10.1080/02648725.1999.10647970.
- [21] FOROUGH, Javad, MIRABEDINI, Azadeh, WARREN, Holly. 'Hydrogels Fibers'. *Hydrogels*. IntechOpen [online], 2018 [cit. 2023-02-13]. ISBN 978-1-83881-355-0. Dostupné z: DOI:10.5772/intechopen.74188.
- [22] WANG, Q.W., LIU, X.Y., LIU, L., FENG, J., LI, Y.H., GUO, Z.J., MEI, Q.B. Synthesis and evaluation of the 5-fluorouracil-pectin conjugate targeted at the colon. *Med. Chem. Res* [online]. 2007, **16**(7), 370–379 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: DOI:10.1007/s00044-007-9049-0.
- [23] WEI, H., QING, D., DE-YING, C., BAI, X., LI-FANG, F. In-vitro and in-vivo studies of pectin/ethylcellulose-film-coated pellets of 5-fluorouracil for colonic targeting. *J. Pharm Pharmacol* [online]. 2008, **60**(1), 35–44 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: DOI: 10.1211/jpp.60.1.0005.
- [24] ELBL, J., MUSELIK, J., FRANC, A. Využití 3D tisku při přípravě a výrobě léků. *Chem. Listy* [online]. 2019, **113**(5), 301-306 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3355>.
- [25] AL-DULIMI, Z., WALLIS, M., TAN, D.K., MANIRUZZAMAN, M., NOKHODCHI, A. 3D printing technology as innovative solutions for biomedical applications. *Drug Discovery Today* [online]. 2021, **26**(2), 360–383 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.drudis.2020.11.013.
- [26] TSINTAVI, E., REKKAS, D.M., BETTINI, R. Partial tablet coating by 3D printing. *Int J Pharm* [online]. 2020, **581**, 119298 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119298.

- [27] VENTOLA, C.L. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *Pharmacy and Therapeutics* [online]. 2014, **39**(10), 704-711 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4189697/>.
- [28] CHARBE, N.B., MCCARRON, P.A., LANE, M.E., TAMB UWALA, M.M. Application of three-dimensional printing for colon targeted drug delivery systems. *Int J Pharm Investig* [online]. 2017, **7**(2), 47-59 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: DOI:10.4103/jphi.JPHI_32_17.
- [29] ZIAEE, Mohsen, CRANE, Nathan B. Binder Jetting: A Review of Process, Materials, and Methods. *Additive Manufacturing* [online]. 2019, **28**, 781-801 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: DOI:10.1016/j.addma.2019.05.031.
- [30] GAISFORD, S. '3D printed pharmaceutical products'. *3D Printing in Medicine*. Duxford: Woodhead Publishing. 2017, 155–166. ISBN 9780081007174. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100717-4.00007-7>.
- [31] FINA, F., GOYANES, A., GAISFORD, S., BASIT, A.B. Selective laser sintering (SLS) 3D printing of medicines. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **529**(1-2), 285–293 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.082.
- [32] AZAD, M.A., OLAWUNI, D., KIMBELL, G., BADRUDDOZA, A.Z.M., HOSSAIN, M.S., SULTANA, T. Polymers for Extrusion-Based 3D Printing of Pharmaceuticals: A Holistic Materials-Process Perspective. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(2), 124 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: DOI:10.3390/pharmaceutics12020124.
- [33] SOO, W.T., BRYANT, R.V., COSTELLO, S.P. Faecal microbiota transplantation: indications, evidence and safety. *Aust Prescr* [online]. 2020, **43**(2), 36-38 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: DOI:10.18773/austprescr.2020.014.
- [34] VARGA, A., KOCSIS, B., SIPOS, D., KÁSA, P., VIGVÁRI, S., PÁL, S., DEMBROVSZKY, F., FARKAS, K., PÉTERFI, Z. How to Apply FMT More Effectively, Conveniently and Flexible – A Comparison of FMT Methods. *Front. Cell. Infect. Microbiol* [online]. 2021, **11**:657320 [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: DOI: 10.3389/fcimb.2021.657320.
- [35] CAMMAROTA, G., IANIRO, G. a GASBARRINI, A. Fecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile infection. *Journal of*

- Clinical Gastroenterology* [online]. 2014, **48**(8), 693-702 [cit. 2023-04-22].
Dostupné z: DOI: 10.1097/MCG.0000000000000046.
- [36] SOKOL, H., GALPERINE, T., KAPEL, N., et al. Faecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection: Recommendations from the French Group of Faecal microbiota Transplantation. *Dig Liver Dis* [online]. 2016, **48**(3), 242-247 [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: DOI:10.1016/j.dld.2015.08.017.
- [37] ŠTURDÍK, I., HLA VATÝ, T. a PAYER, J. Fekálna mikrobiálna terapia. *Vnitřní Lékařství* [online]. 2016, **62**(2), 147-151 [cit. 2023-04-22]. ISSN 1803-6597. Dostupné z: https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-201602-0011_fecal-microbiota-transplantation.php.
- [38] CAMMAROTA, G., IANIRO, G., TILG, H., KUMP, P. et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* [online]. 2017, **66**(4), 569-580 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313017.
- [39] EISEMAN, B., SILEN, W., BASCOM, G.S. et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*. 1958, **44**(5), 854–859.
- [40] DAVIDSON, M. W., ABRAMOVITZ, M. Optical Microscopy. *John Wiley & sons* [online]. 2002 [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: DOI:10.1002/0471443395.img074.
- [41] MCNAMARA, George, DIFILIPPANTONIO, Michael, RIED, Thomas, BIEBER, Frederick R. Microscopy and Image Analysis. *Current Protocols in Human Genetics* [online]. 2017, **94**, 4.4.1–4.4.89 [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: DOI: 10.1002/cphg.42.
- [42] HOŠEK, Jan. Přehled klasických a moderních mikroskopických metod [online]. [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/15163908-Prehled-klasickyh-a-modernich-mikroskopickyh-metod.html>
- [43] ABRAMOWITZ, Mortimer. Microscope basics and beyond. *Olympus America Inc* [online]. 2003, **26**(4). 204-206 [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: DOI:10.1002/sca.4950260407.
- [44] MIKŠ, Antonín. Zobrazovací metody v optické mikroskopii [online]. [cit. 2023-04-22]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/21527806-Zobrazovaci-metody-v-opticke-mikroskopii.html>

- [45] Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Český lékopis 2017. Praha: *Grada Publishing* [online]. 2017 [cit. 2023-04-23]. ISBN 978-80-271-0500-7. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/farmaceuticky-prumysl/cesky-lekopis>.
- [46] VETCHÝ, D.; RABIŠKOVÁ, M.; ŠVARCOVÁ, M.; SÝKORA, T.; Haring, A. Porovnání vybraných perorálních originálních a generických léků používaných v kardiologii na základě disoluční studie. *Klin Farmakol Farm* [online]. 2005, **19**(2), 84-88 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/far-200502-0002_Porovnaní_vybranych_peroralnich_originalnich_a_generickykh_leku_pouzivanych_v_kardiologii_na_zaklad.php.
- [47] DVOŘÁČKOVÁ, K.; BAUTZOVÁ, T.; RABIŠKOVÁ, M. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chem, Listy* [online]. 2011, 105, 50–54 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_01_50-54.pdf.
- [48] MUSELÍK, J., KOMERSOVÁ, A., LOCHAŘ, V., KUBOVÁ, K. Regresní analýza disolučního profilu léčiva a odhad mechanismu uvolňování léčiva. *Chem. Listy* [online]. 2019, **113**(5), 328–336 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3359>.
- [49] Particle sciences. In Vitro Dissolution Testing for Solid Oral Dosage Forms. *Technical Brief* [online]. 2010, **5** [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://pdf4pro.com/cdn/in-vitro-dissolution-testing-for-solid-oral-dosage-23032e.pdf>.
- [50] WANG, Qingxi, FOTAKI, Nikoletta, MAO, Yun. Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development. *Dissolution Technologies* [online]. 2009, **16**(3), 6-12 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: DOI:10.14227/DT160309P6.
- [51] CHEN, W., CHANG, S.Y., KIANG S., et al. Modeling of pan coating processes: Prediction of tablet content uniformity and determination of critical process parameters. *J Pharm Sci* [online]. 2010, **99**(7), 3213-3225 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: DOI:10.1002/jps.22044
- [52] ŠIBANC, Rok, TURK, Magdalena, DREU, Rok. An analysis of the mini-tablet fluidized bed coating process. *Chemical Engineering Research and*

Design [online]. 2018, 134 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: DOI:10.1016/j.cherd.2018.03.020.

[53] PATIL, H., TIWARI, R.V., REPKA, M.A. Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2016, **17**(1), 20-42 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: DOI:10.1208/s12249-015-0360-7.

[54] WANG, Z., SHMEIS, R.A. Dissolution controlled drug delivery systems. In: LI, X. (Ed.), *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*. 2005.