

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

Vliv PAMAM dendrimerů na rozpustnost a kožní
permeaci diklofenaku sodného
*Effect of PAMAM dendrimers to the solubility and the skin
permeation of diclofenac sodium*
Diplomová práce

Adéla Lorenčíková
V Hradci Králové 2025

Vedoucí práce: doc. Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

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

V Hradci Králové 2025

Adéla Lorenčíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli doc. Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D za odborné vedení, vstřícné jednání a za všestrannou pomoc při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat celé katedře farmaceutické technologie. Za podporu a zázemí děkuji i své rodině a přátelům.

Děkuji také za finanční podporu Karlově Univerzitě (GAUK 1156120, SVV 260 661) a Grantové agentuře České republiky (22-20839K).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: doc. Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Autor: Adéla Lorenčíková

Název diplomové práce: Vliv PAMAM dendrimerů na rozpustnost a kožní permeaci diklofenaku sodného

Diklofenak sodný (DIC) je léčivá látka patřící do kategorie nesteroidních antiflogistik (NSAID). Tato skupina léčiv je rozsáhle využívána díky pleiotropnímu účinku. Dokáže snižovat horečku, zánět a tišit bolest. Indikační škála je široká. Nevýhodou je však mnoho nežádoucích účinků. Některé z nich lze zmírnit nebo úplně eliminovat jednou z možných cest podání, a to transdermální aplikací. Dále může být ze zmíněných důvodů příznivá lokální aplikace.

Jednou z dominantních výzev při snaze dostat léčivou látku přes lidskou kůži nebo do ní je vyhovět kritériím, která jsou kůží definována. Jedná se o vyvážení hydrofilních a lipofilních vlastností. Léčivo musí být schopno penetrovat přes hydrofilní část a zároveň dokázat prostupovat lipofilní lamelární lipidovou multivrstvou, nacházející se v epidermis. Pro zlepšení rozpustnosti DIC ve vodě bylo využito příhodných vlastností poly(amidoaminových) (PAMAM) dendrimerů.

PAMAM dendrimery jsou globulární makromolekuly s vysoce organizovanou strukturou. Fungují i jako akceleranty kožní permeace. Tato skupina pomocných látek přechodně snižuje propustnost kožní bariéry a usnadňuje transdermální podání léčiv. Dalšími výhodnými vlastnostmi jsou výborná rozpustnost ve vodě a velká vazebná kapacita molekul.

V této práci vyšlo najevo, že PAMAM dendrimery zvyšují rozpustnost DIC ve vodném prostředí způsobem závislým na koncentraci a generaci. Vliv PAMAM dendrimerů na zlepšení penetrace do kůže a permeaci kůží nebyl prokázán.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: doc. Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Author: Adéla Lorenčíková

Title of the thesis: Effect of PAMAM dendrimers to the solubility and the skin permeation of diclofenac sodium

Diclofenac sodium (DIC) is a drug belonging to the category of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). This group of drugs is widely used due to its pleiotropic effect. It can reduce fever, inflammation and relieve pain. The range of indications is wide. However, the disadvantage is the many side effects. Some of them can be alleviated or completely eliminated by one of the possible routes of administration, namely transdermal application. Furthermore, local application may be favorable for the aforementioned reasons.

One of the dominant challenges in trying to get a drug through or into human skin is to meet the criteria defined by the skin. This is a balance of hydrophilic and lipophilic properties. The drug must be able to penetrate through the hydrophilic part and at the same time be able to penetrate the lipophilic lamellar lipid multilayer found in the epidermis. To improve the solubility of DIC in water, the convenient properties of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers were used.

PAMAM dendrimers are globular macromolecules with a highly organized structure. They also function as skin permeation accelerators. This group of excipients temporarily reduces the permeability of the skin barrier and facilitates transdermal drug delivery. Other advantageous properties are excellent water solubility and high molecular binding capacity.

In this work, it was revealed that PAMAM dendrimers increase the solubility of DIC in aqueous media in a concentration- and generation-dependent manner. The effect of PAMAM dendrimers on improving skin penetration and permeation has not been demonstrated.

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
1. Seznam zkratk.....	8
2. Úvod a cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1. Lidská kůže.....	10
3.1.1. Epidermis.....	10
3.1.2. Dermis.....	13
3.1.3. Hypodermis.....	14
3.2. Přestup látek přes lidskou kůži.....	14
3.3. Akceleranty kožní permeace.....	17
3.3.1. Společná kritéria akceleračních kožní permeace.....	17
3.3.2. Mechanismus účinku zesilovačů kožní permeace.....	18
3.3.3. Dendritické molekuly.....	18
3.3.3.1. Charakteristika.....	18
3.3.3.2. Příprava.....	20
3.3.3.3. Využití dendrimerů.....	21
3.4. PAMAM dendrimery.....	22
3.5. Diklofenak.....	25
4. Experimentální část.....	29
4.1. Chemikálie, materiál a přístroje.....	29
4.2. Příprava vzorků DIC ve vodě pro měření rozpustnosti.....	30
4.2.1. Příprava nasycených vodných roztoků s DIC.....	30
4.2.2. Příprava vodných roztoků PAMAM dendrimerů.....	30
4.2.3. Příprava nasycených vodných roztoků DIC s PAMAM dendrimery.....	31
4.3. První permeace.....	32
4.3.1. Příprava vzorků pro donorovou fázi.....	32
4.3.1.1. Detaily přípravy.....	32
4.3.2. Příprava Franzových cel a nanosení donorové fáze.....	33
4.3.2.1. Sestavení Franzových cel.....	33
4.3.2.2. Nanosení donorové fáze.....	34
4.3.2.3. Odebrání akceptorové fáze pro HPLC a měření permeace DIC kůží.....	34

4.3.2.4.	Příprava vzorku kůže pro zjištění retence DIC v kůži pomocí HPLC	34
4.4.	Druhá permeace	35
4.4.1.	Příprava vzorků pro donorovou fázi	35
4.4.2.	Příprava Franzových cel a nanesení donorové fáze	35
5.	Výsledky a diskuze	36
5.1.	Rozpustnost DIC	36
5.2.	Kožní permeace	38
5.2.1.	Prostup DIC do kůže	38
5.2.1.1.	1. zkouška penetrace	38
5.2.1.2.	2. zkouška penetrace	40
5.2.2.	Prostup DIC do akceptorové fáze	41
5.2.2.1.	1. zkouška permeace	41
5.2.2.2.	2. zkouška permeace	42
6.	Závěr	45
7.	Reference	46

1. Seznam zkratek

API	Aktivní farmaceutická látka
Chol	Cholesterol
COX	Cyklooxygenáza
DIC	Sodná sůl diklofenaku
EDA	Ethylendiamin
G1	první generace
G2	druhá generace
G3	třetí generace
G4	čtvrtá generace
NSAID	Nesteroidní antiflogistikum
PAMAM	Poly(amidoaminové)
PEG	Polyethylenglykol
SC	Stratum corneum

2. Úvod a cíl práce

Při dermálním/transdermálním podání léčiva je léčivá látka aplikována na kůži se zamýšleným účinkem v kůži, či systémovým efektem. Tyto aplikační způsoby jsou výhodné zejména kvůli redukci nežádoucích účinků plynoucích z podání perorálního.

Kůže je složena ze tří hlavních vrstev: *epidermis*, *dermis* a *hypodermis*. *Epidermis*, jakožto nejsvrchnější vrstva kůže, představuje nejvýznamnější překážku pro exogenní látky. Zamezuje jejich vstupu do těla a je mu tak účinnou ochrannou bariérou. Možnosti vstupu jednotlivých typů *xenobiotik* do kůže jsou determinovány vlastnostmi *epidermis*. Cílem je tedy nalezení takových pomocných látek, které by průnik *xenobiotik* (léčiv) do kůže usnadnily, zároveň ale její strukturu nenarušily ireverzibilně a samy nebyly pro organismus toxické.

PAMAM dendrimery jsou kategorií pomocných látek, které se řadí mezi kožní enhancery. Jejich přednostmi jsou dobrá rozpustnost ve vodě, jež umožní lepší rozpouštění špatně rozpustných látek, a také schopnost usnadnit prostup léčiva kůží. Fungují totiž jako akceleranty kožní permeace.

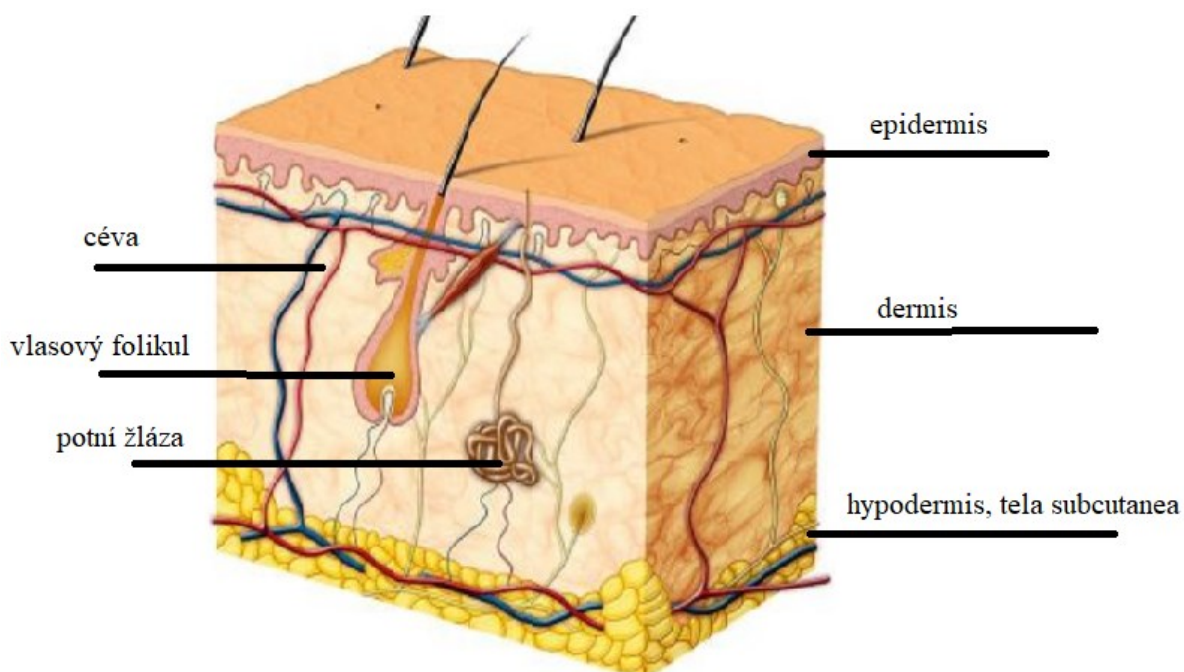
Cílem této práce bylo dosáhnout zvýšené rozpustnosti ve vodě špatně rozpustného DIC pomocí PAMAM dendrimerů a usnadnit trans(dermální) přestup DIC přes kůži a dosáhnout tím protizánětlivého a analgetického účinku v organismu.

3. Teoretická část

3.1. Lidská kůže

Lidská kůže tvoří ochrannou vrstvu na povrchu těla složenou z rozličných druhů buněk. Je to největší orgán v našem organismu. U dospělého člověka se její povrch pohybuje zhruba mezi 1,6 – 1,8 m². Tvoří okolo 15 % naší hmotnosti. Je tedy zároveň i orgánem nejtěžším. V místech, kde je kůže vystavována menšímu tlaku, jako jsou například oční víčka, je mnohonásobně tenčí než tam, kde musí odolávat extrémní námaze (chodidla). U tělních otvorů volně přechází ve sliznice.[1]

Kůže zastává řadu různorodých funkcí. Vytváří pomyslnou bariéru od okolního světa. Zabraňuje úniku vody z těla, a naopak pro organismus škodlivých látek vstupu dovnitř. Je propustná pro plyny a látky rozpustné v tucích. Kůže je složena ze tří hlavních vrstev: pokožky (*epidermis*), škůry (*dermis*) a podkožního vaziva (*tela subcutanea*)[1], [2].



Obrázek 1: Struktura lidské kůže [3]

3.1.1. Epidermis

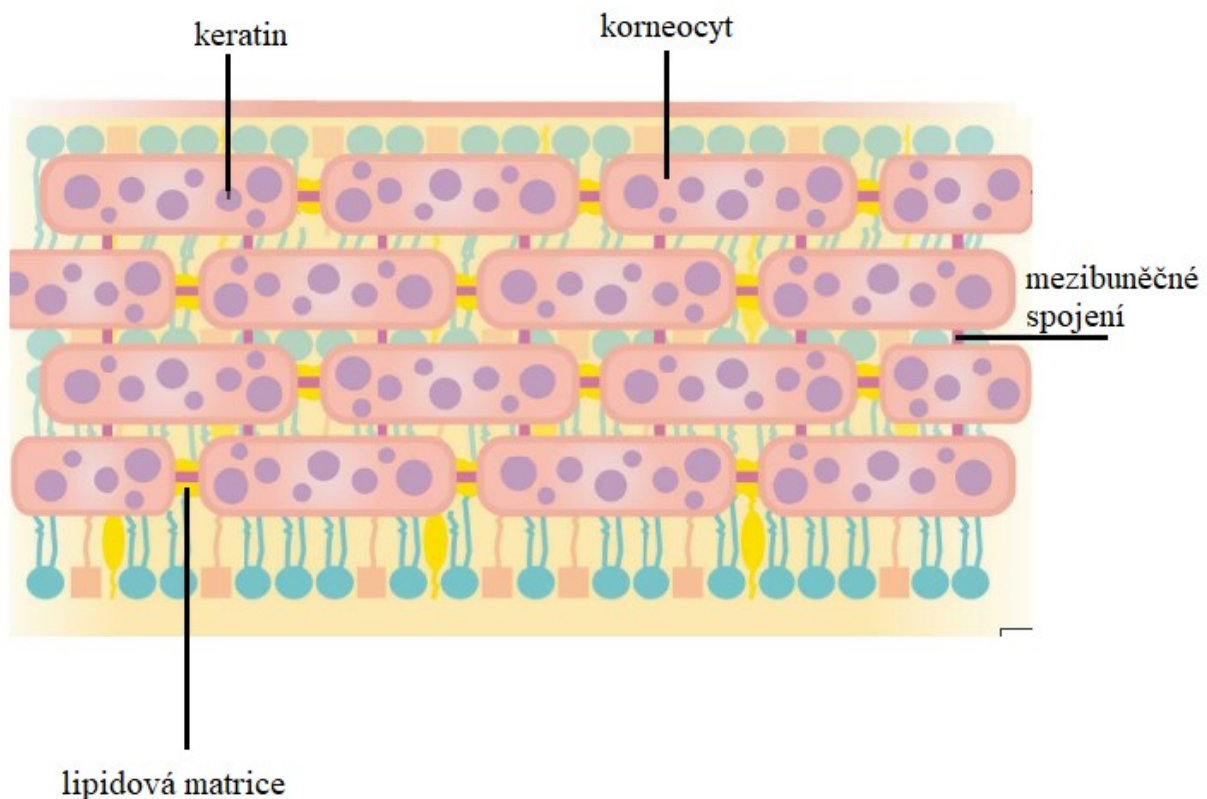
Nejvrchnější a nejtenčí vrstvou je pokožka. Má ektodermální původ a tvoří vrstevnatý dlaždicový (její svrchnější vrstvy) *epitel* rohovějící. Jako ostatní *epitely* má minimum mezibuněčné hmoty a je bezcévná. Je tudíž vyživována z hlubších vrstev difuzí.[2] V hlubších vrstvách se tvoří nové buňky, které vytlačují ty starší směrem k povrchu, kde se vzdalují zdroji živin a tudíž degenerují. Tyto buňky se naplňují rohovinou a odumírají. Časem se odloupnou.

Veškerá pokožka se obmění asi za tři týdny.[4] V pokožce jsou zastoupeny čtyři druhy buněk: *keratinocyty*, *melanocyty* (pigmentové buňky), *Langerhansovy buňky* a *Merkelovy buňky*. Rozlišujeme pět vrstev pokožky s různým zastoupením těchto typů buněk.[2], [4]

- **Stratum corneum**

První vrstva směrem od povrchu se nazývá *stratum corneum* (SC). Skládá se z plochých odumřelých buněk bez jader, organel a naplněných keratinem. Těmto keratinocytickým buňkám se říká *korneocyty*. Existuje jich okolo sedmnácti vrstev. Vytváří jakýsi ochranný krunýř, chrání před infekcí (nejen díky kyselému pH), dehydratací a mechanickým namáháním. U dětí jsou *korneocyty* menší, což je jedním z faktorů způsobujících snazší prostup látek (tento fakt má význam při transdermální aplikaci léčiv) přes SC. V kůži seniorů je tomu naopak.[5]

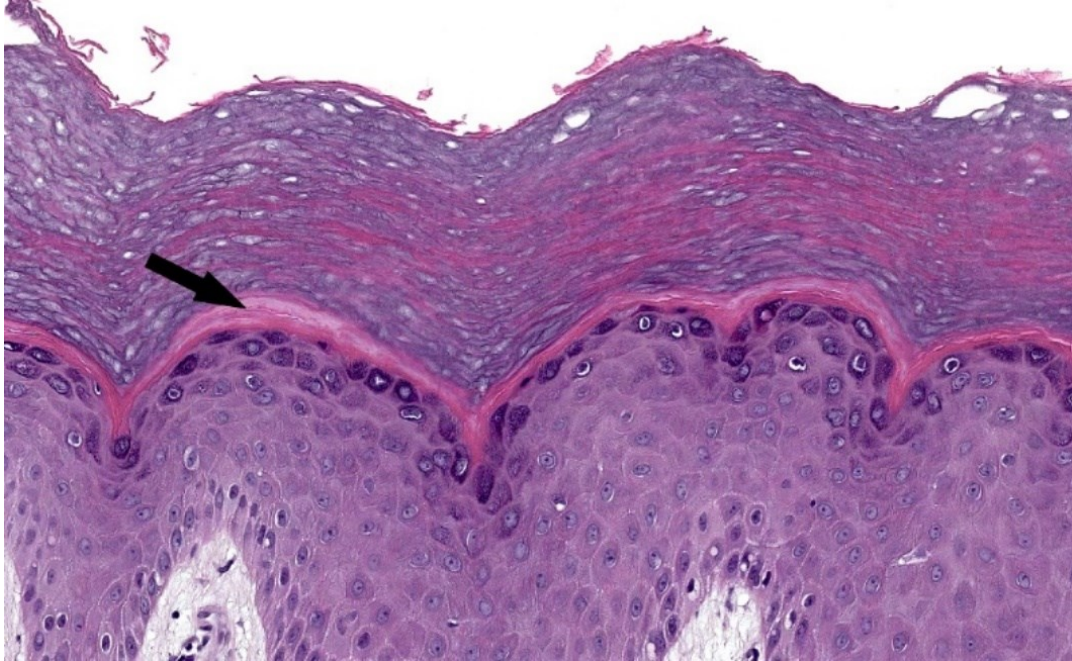
Korneocyty jsou uloženy v lipidové matici složené z *ceramidů*, *cholesterolu* (Chol) a mastných kyselin. Odchytky ve struktuře (například nedostatek lipidů) nebo rychlosti *deskvamace* (odlupování mrtvých buněk) se projevují jako různá kožní onemocnění (atopický ekzém, psoriáza).[4],[6]



Obrázek 2: Struktura SC [6]

- **Stratum lucidum**

Tato vrstva epidermis je tvořena pouze 2-3 vrstvami buněk. Její keratinocyty jsou ploché odumřelé (jádra nejsou barvitelná).[2] (Viz Obrázek 3)



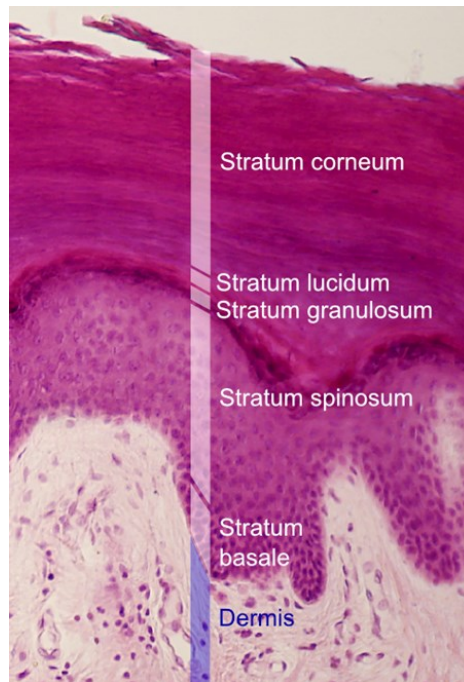
Obrázek 3: Vrstvy epidermis, stratum lucidum [7]

- **Stratum granulosum**

Stratum granulosum je také tenká vrstva buněk. Pro její keratinocyty je typické, že obsahují bazofilně se barvící zrna (*granula*), obsahující *keratohyalin*, jež je meziproduktem rohovatění.[2], [8]

- **Stratum spinosum**

Další vrstvou je *stratum spinosum*. Zde leží polygonální buňky spojené pomocí desmosomů. V mezibuněčných prostorech nalezneme tkáňový mok. (Obrázek 4) [1]



Obrázek 4: Vrstvy epidermis [9]

- **Stratum basale**

Nejspodnější vrstva epidermis se nazývá *stratum basale*. Je tvořena palisádově uspořádanými kubicko-cylindrickými buňkami. Většina buněk jsou *keratinocyty*. Nad svým jádrem mají čepičku zrn *melaninu* (kožní pigment). *Melanin* je tvořen pouze v *melanocytech*, zastoupených ve *stratum basale* z 5 %.[10] *Melanocyty* posílají zásobují *keratinocyty* tímto barvivem skrze výběžky. Propojení *keratinocytů* navzájem zajišťují *desmozomy*. V místě bazální membrány *hemidesmozomy*. [1], [2], [10]

V pokožce, napříč všemi vrstvami, nalezneme i tzv. *Langerhansovy buňky*. Tyto dendritické buňky prezentují antigen *lymfocytům*. Jejich počet stoupá při zánětech a naopak klesá vlivem UV záření. Vznikají v kostní dřeni. [11], [12]

Zajímavým typem buněk jsou *Merkelovy buňky*. Mají oválná jádra, granula a nachází se v pochvě vlasového folikulu i *stratum basale*. Slouží jako mechanoreceptory. [12], [13]

3.1.2. Dermis

Dermis neboli *corium*, česky škára, je silná vrstva kůže nacházející se pod pokožkou. [12] Má *mezenchymální* původ a dodává kůži pružnost a mechanickou odolnost. Skládá se ze tří hlavních typů buněk: *fibroblastů*, *makrofágů* a žírných buněk. Mezibuněčnou hmotu tvoří kolagenní a elastická vlákna. [12]

Dále zde nalezneme lymfatické a krevní cévy, nervy, vlasové folikuly a mazové či potní žlázy. Cévy v dermis jednak vyživují ji samotnou, jednak také umožňují dermis vyživovat bezcévnou epidermis. Ve škáře hrají důležitou roli pro lidské smyslové vnímání nervová zakončení. [13]Můžeme je rozdělit na volná a opouzdřená. Mezi opouzdřená nervová zakončení patří *Meissnerova tělíska*, která rozpoznávají jemný dotek. Nejvíce se jich nachází na konečcích prstů a rtech. Dále *Ruffiniho tělíska* reagující na tlak, tah a napětí. Diskutuje se i o jejich možné vnímání teploty. Chlad dokáží vnímat *Krauseho tělíska*. Dermis je s epidermis spojena přes bazální membránu.[13], [14], [15]

Škára se skládá ze dvou vrstev. Svrchní, tenčí vrstvu nazýváme papilární (*stratum papilare*). Svými výběžky zasahuje do epidermis a vytváří tzv. dermální papily. *Stratum papilare* obsahuje jemnou síť elastických a kolagenních vláken. Druhou vrstvou je retikulární vrstva (*stratum reticulare*). Obsahuje více elastických vláken než papilární. Navíc, svůj název získala díky velmi husté neuspořádané síti kolagenních vláken.[12]

3.1.3. Hypodermis

Nejhlubší vrstva kůže se nazývá *hypodermis*, česky podkožní vazivo. Tato vrstva také obsahuje elastická a kolagenní vlákna. Navíc jsou zde tukové buňky. Hypodermis je největší zásobárnou tuku v těle. Dále zde nalezneme cévy a nervy.[16] V podkožním vazivu se nachází nejsložitější ze všech tělísek kůže pro čítí a to *Vaterovo-Paciniho*. Tělísko je velké až 2 mm. *Hypodermis* připojuje kůži k hlubším strukturám, kostem a svalům. V neposlední řadě mechanicky chrání vnitřní orgány a je součástí termoregulace. Na různých místech těla je tloušťka podkožního vaziva různá.[12], [16]

3.2. Přestup látek přes lidskou kůži

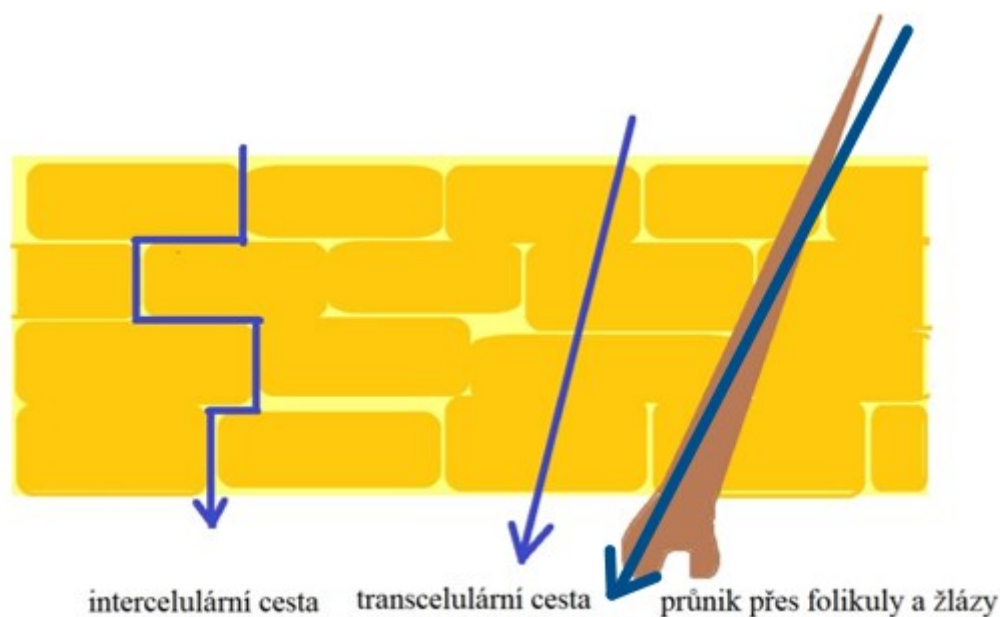
Jedním ze způsobů, jak lze podat léčivo a dosáhnout systémového účinku, je transdermální podání.[17] Při této cestě aplikujeme *xenobiotikum* na kůži. Jeho následnému prostupu skrz se říká *permeace* (průchod). Je třeba odlišit podání dermální. U tohoto typu podání je cílem léčiva kůže sama, *xenobiotikum* tedy pouze *penetruje* (vstupuje) do jejích vrstev. Nedochází k *resorpci* (příjmu) léčiva vaskulárním systémem. [17], [18]

Ne každé léčivo je vhodné pro transdermální podání.[19] Existují určitá kritéria, která musí látka splňovat (fyzikálně-chemické vlastnosti a s tím související vlastnosti farmakokinetické), aby mohla prostupovat volnou difuzí, jež je hlavním mechanismem *permeace* léčiva kůži. Jedná se o následující:

- **Molekulová hmotnost do zhruba 500 Da**
- **Nízký bod tání**
- **Rozpustnost jak ve vodě, tak v olejích.** Amfifilita je důležitá pro vytvoření dostatečné difuzní síly na kůži vlivem koncentračního gradientu
- **Vhodný rozdělovací koeficient.** Léčivo musí při vstupu do organismu překonat membrány buněk, proto je třeba jeho vhodná lipofilita. Protože všechny tkáně těla obsahují také vysoké procento vody (cca 70 %), a nelze opomenout ani tělní tekutiny, je pro pohyb léčiva v organismu důležitá i určitá rozpustnost ve vodě. Poměr celkové koncentrace látky rozpuštěné v lipidech k celkové koncentraci látky rozpuštěné ve vodné fázi vyjadřuje již zmíněný rozdělovací koeficient.[18] Pokud by byl rozdělovací koeficient příliš nízký, léčivo bude dobře rozpustné ve vodě, ale jeho prostup biologickými membránami bude nedostatečný.[17] Naopak látka s příliš vysokým rozdělovacím koeficientem by se hromadila v kůži (tukové tkáni).[17], [18]

Existuje několik cest, kudy může léčivo přes kůži proniknout (viz Obrázek 5). První tři z nich jsou zřídka využívány. U velmi hydrofilních léčiv je možný prostup přes potní žlázu. Varianta zdánlivě snadná, avšak hydrofilních léčiv je málo. V neposlední řadě i v tomto případě musí být vytvořen znatelný koncentrační spád. Další nepopulární možností je prostup mazovou žlázou. Toto je reálné pro velmi lipofilní léčiva. Lipofilní léčivo se ale po průchodu bude hromadit v okolní tukové tkáni a do organismu se ho dostane málo. Některé látky jsou schopny pronikat *transfolikulárně*. [18], [19], [20]

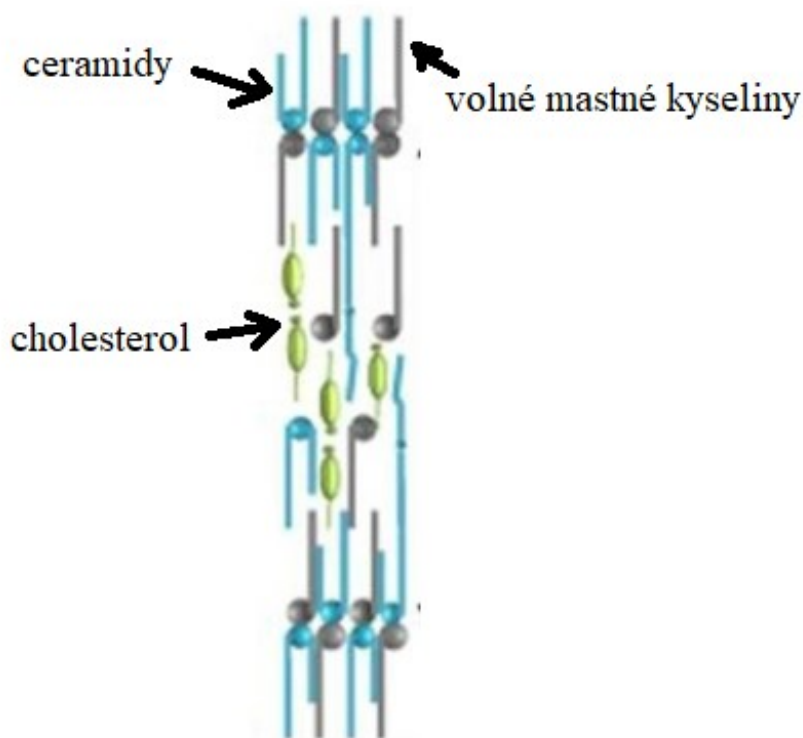
Další variantou je průchod *transcelulární* (skrz buňky, korneocyty) nebo *intercelulární* (mezibuněčnými prostory, lipidovou maticí). [20]



Obrázek 5: Cesty průniku léčiva přes SC [20]

Průchod léčiva skrz korneocyty není jednoduchý. Lze ho usnadnit zvýšením množství vody ve SC. Keratin v korneocytech totiž obsahuje hydrofilní skupiny, které když naváží vodu, buňky zbytní a navážou vodu do intercelulárního prostoru. Naruší se tak soudržnost lipidových lamel.[19], [20]

Nejhojněji využívanou cestou prostupu látky do organismu je *intercelulární* cesta. Tímto způsobem léčivo prochází lamelární lipidovou multivrstvou (Obrázek 6) mezi korneocyty. Cesty je využíváno díky dobré znalosti chemického složení lamel.[21] To umožňuje syntetizovat nebo vybrat látky, které umožní nebo i urychlí prostup léčiva. Těmto látkám říkáme akceleranty kožní permeace.[22] Mechanismus účinku a další je popsáno níže.[21], [22]



Obrázek 6: lamelární lipidová multivrstva [23]

3.3. Akceleranty kožní permeace

Jak již bylo zmíněno, lidská kůže je efektivní bariéra zabraňující vstupu cizích látek do těla a prostupu látek vlastních ven. Nejproblematictější bariéru z hlediska snahy dostat léčivo skrz představuje SC.[19], [22] SC je vrstvou s vysoce uspořádanou strukturou a právě na ni cílí většina zesilovačů kožní permeace. Konkrétně mezibuněčné lamelární lipidy jsou strukturou, do níž je snaha zasáhnout a jejíž vlastnosti je potřeba pomocí akceleračtů kožní permeace nejčastěji ovlivnit. Dnes je na trhu široký výběr zesilovačů kožní permeace, pomocí kterých lze umožnit a urychlit prostup léčiva, s rozličnými mechanismy účinku. Existují však vlastnosti, které musí mít každá z těchto farmaceutických pomocných látek.[19], [20], [22], [23] (Viz níže)

3.3.1. Společná kritéria akceleračtů kožní permeace

Zesilovače permeace jsou farmaceutické pomocné látky. Z toho vyplývá požadavek na jejich nulovou vlastní farmakologickou aktivitu. Dále je naprosto zásadní, aby nebyly toxické, dráždivé nebo nezpůsobovaly alergie. Musí mít definovanou dobu účinku a známou rychlost nástupu účinku. Jejich účinek by měl být jednosměrný. Látky by měl akceleračt do těla

propouštět, ale bariérové vlastnosti kůže musí být následně obnoveny. Důležitá je také kompatibilita s látkami, které budeme pomocí akceleraantu přenášet, ale i s ostatními pomocnými látkami v přípravku.[22]

3.3.2. Mechanismus účinku zesilovačů kožní permeace

Jak již bylo naznačeno, akceleranty nesespecificky interagují se strukturami ve SC, a to s polárními nebo lipoidními strukturami. Z chemického hlediska jsou zesilovače velmi různorodou skupinou, avšak určité strukturální podobnosti mají.[24]

Jsou jimi například funkční skupiny, kdy často nalezneme fragment X-CO-N=, kde X je -CH₂, -NH₂ nebo -NH-. Další strukturální podobností u akceleraantů je, že obsahují alkylový nebo alkylenový řetězec, rozvětvený či nerozvětvený. Řetězec by měl být dlouhý osm až dvacet uhlíků. Výše zmíněné struktury se fyziologicky nachází v kožní bariéře.[25]

Vlastnosti zesilovačů permeace je předurčují k několika mechanismům účinku, které nejsou zcela objasněny, ale jsou silně předpokládány.

První možností, již může akceleraant zlepšovat permeaci léčiva, je dezintegrace lipidové vrstvy lamel. Tímto mechanismem působí nejvíce zesilovačů. V uspořádané struktuře intercelulárních lipidů vznikne více prostoru pro difuzi léčiva, čímž se zvýší difuzní koeficient. Další možností je interakce zesilovače s intracelulárními proteiny. *Keratin*, který se nachází v *korneocytech*, je tím rozvolněn a buňky se stanou propustnějšími. Posledním způsobem zlepšení permeace léčiva je ovlivnění rozdělovacího koeficientu mezi aplikovaným přípravkem a kůží.[20], [21], [22], [23]

Mezi akceleranty kožní permeace patří například voda, ethanol, propylenglykol, močovina, alkylsulfoxidy, azony atd. Oblíbenými akceleraanty jsou také dendritické molekuly, kterým je věnována následující kapitola.[24], [26]

3.3.3. Dendritické molekuly

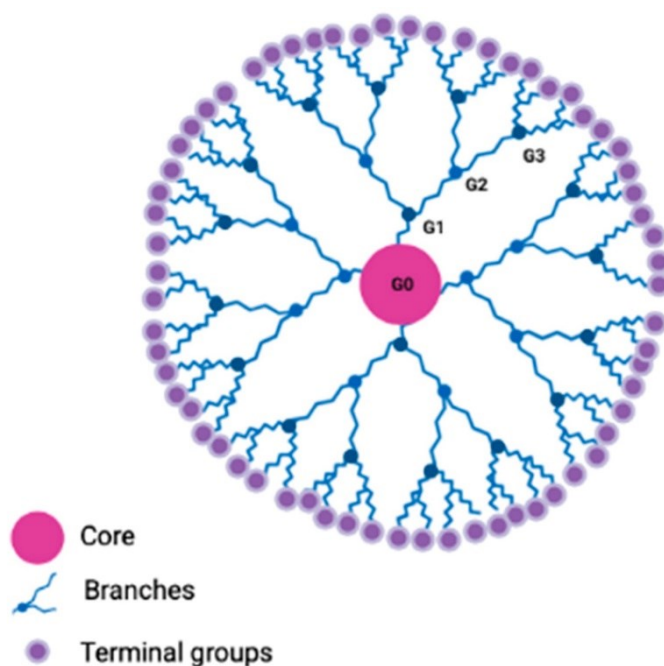
3.3.3.1. Charakteristika

Dendrimery jsou vysoce uspořádané syntetické polymerní molekuly. Mají v roztoku sférický tvar a svůj název získaly díky větvené struktuře. Vyznačují se *monodisperzitou*. [26] Dendrimery se liší svými molárními hmotnostmi, jejich rozměry se pohybují obvykle mezi 1 až 10 nm. Strukturálně u nich můžeme rozlišit jádro, ze kterého vycházejí opakující se (větvicí se) monomery. Jádro je buď tvořeno jedním atomem, nejčastěji dusíkem či uhlíkem, nebo může být složeno z více atomů. Na povrchu globulární molekuly, vnějších monomerech, se nachází

funkční skupiny, které spolu s ostatními parametry dendrimery determinují jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, farmakologické vlastnosti a toxicitu.[27] Dalším parametrem, na jehož základě se mezi sebou odlišují dendritické molekuly, je počet větvících se vrstev. Podle vrstev kategorizujeme dendrimery do generací. (Obecná struktura viz Obrázek 7)[26], [27]

První dendrimery připravil Fritz Vögtle v roce 1978. Poté již ostatní vědci pokračovali ve výzkumu a syntetizovali dendrimery také jinými způsoby.[28]

Dendrimery mají oproti konvenčně využívaným akcelarantům mnoho výhod. Vysoká biologická dostupnost a schopnost penetrovat skrz biologické membrány je jednou z nich. Dále je možné dendritické molekuly navrhnout tak, aby vyhovovaly svému účelu. Mají tedy kontrolovatelnou molekulární hmotnost. Toho je dosahováno například větvením, zvyšujícím vazebnou kapacitu, ale i dalšími parametry.[26], [27], [28]



Obrázek 7: Struktura dendrimerů [29]

Pomocí dendritických molekul lze dosáhnout cílené distribuce léčiv do různých tkání právě díky možnosti vytvoření jedinečného a specifického dendrimery.[29] Cílená distribuce umožňuje snížení toxicity léčiva i podávaného množství. Některé dendrimery však mají i vlastní farmakologickou aktivitu.[28] Způsobů, pomocí kterých lze dosáhnout interakce aktivní farmaceutické látky (API) se strukturou dendritické makromolekuly, je několik. Léčivo může být specificky vázáno kovalentními vazbami na povrchových funkčních skupinách nebo

nespecificky inkorporováno v dutině dendrimeru. Další možností je kombinace obou výše zmíněných.[28], [29]

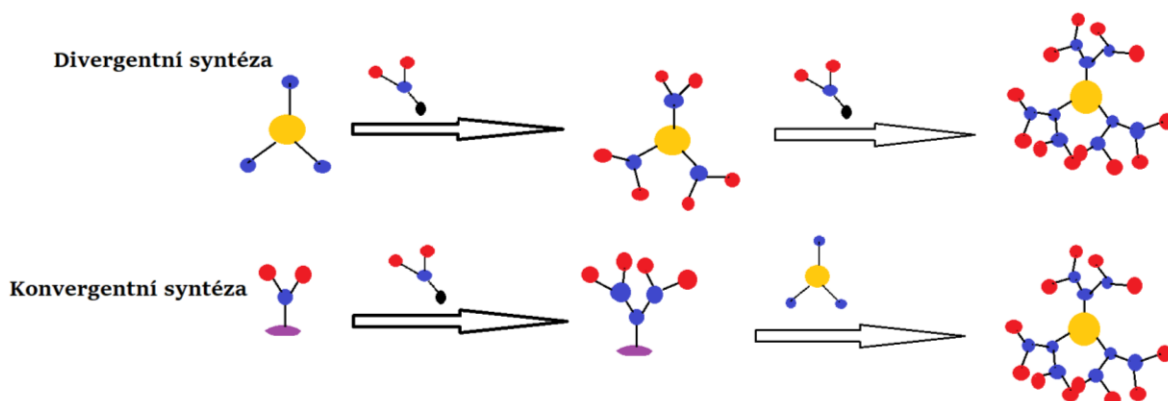
Jak už bylo zmíněno, struktura dendrimeru ovlivňuje jak jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, tak farmakologický a toxikologický profil dané substance. Charakter povrchu jednotlivých dendrimerů tedy ovlivňuje výslednou farmakokinetiku, specifitu vůči cíli a také neopomenutelnou toxicitu.[30] Toxicita dendritické makromolekuly roste s rostoucí generací, tedy s větvením. Dále, co se náboje na povrchu týče, jsou pro biologické struktury škodlivější funkční skupiny s kladným nábojem. Stejně je tomu u nepolárních částí. Ty dokáží hydrofóbně interagovat s plazmatickými membránami.[28], [30] Do určité míry je toxicita řešitelný problém. Povrchový náboj dendrimerů lze pozměnit tzv. PEGylací. PEGylací se rozumí navázání polyethylenglykolu (PEG), který poté funguje jako „čepička“ například na aminových skupinách, a zamezuje tak cytotoxicitě kationtu. Některé studie však naznačují, že by PEGylace mohla zpomalit uvolňování léčiva z dendrimeru a prodloužit cirkulaci v organismu. Toxicita je přísně hlídaným parametrem dendrimerů.[28], [30], [31]

3.3.3.2. Příprava

Jak již bylo zmíněno, dendrimery jsou vysoce organizované polymerní molekuly. Z tohoto důvodu jejich syntéza vyžaduje řízený a po částech jdoucí postup. Valnou většinu syntéz dendrimerů tvoří dva hlavní postupy (viz Obrázek 8). Divergentní a konvergentní způsob. V 70. letech 20. století Fritz Vögtle provedl první syntézu dendrimeru divergentní cestou. Následně v letech 90. byla popsána syntéza konvergentní vědci Craig Hawker a Jean Fréchet.[26], [28], [32]

Divergentní metoda probíhá navazováním monomerů na iniciační jádro. Dendrimer je tedy postupně větven od středu k periférii. Nevýhodou této metody je častý vznik chyb, nechtěných odchylek ve struktuře. K tomuto dochází, když na některé z větví reakce proběhne neúplně. Problému lze z části předcházet vhodným použitím činidel. I tak je ale dosažení čistoty u této metody velmi obtížné, protože odchylky ve struktuře bývají jen malé. Výhodou metody je možnost vytvoření dendrimerů vyšších generací. Divergentní metoda je často využívaným typem syntézy. Přípravují se jí například PAMAM dendrimery.[32]

Konvergentní metoda spočívá ve vytváření kratších větví, které se posléze navazují na iniciační jádro. Dochází tedy k syntéze směrem od periferie. Výhodou je snadnější zajištění čistoty makromolekul. Nevýhodou může být nemožnost syntézy větších dendrimerů.[33]



Obrázek 8: Metody syntézy dendrimerů [32], [33]

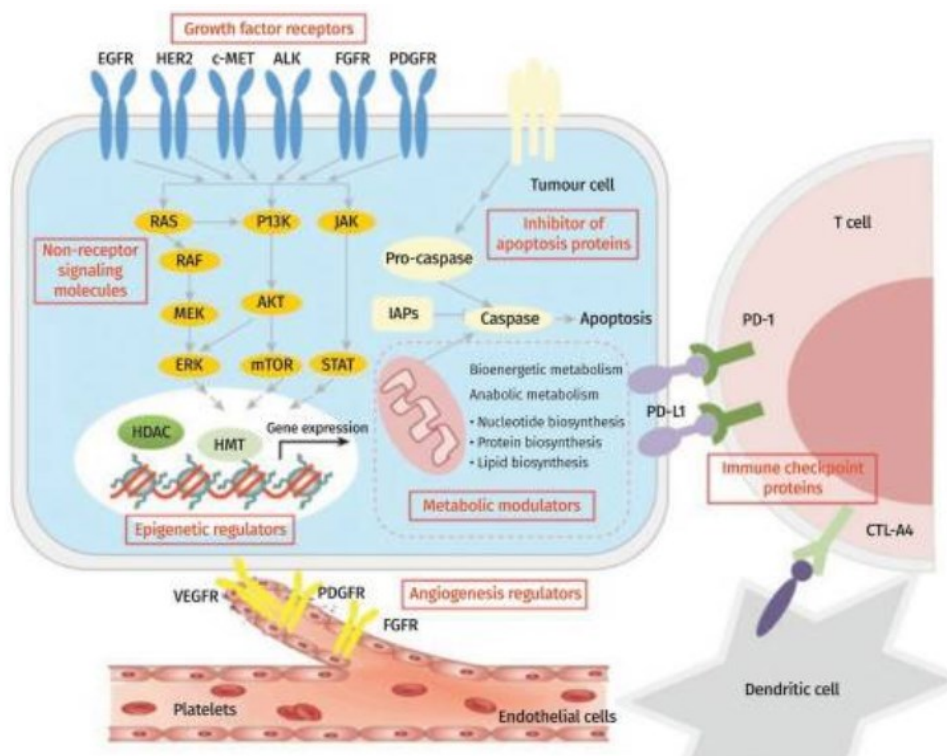
3.3.3.3. Využití dendrimerů

Dendrimery se těší v medicíně i farmacii velké oblibě díky svému potenciálu pro široké využití. Jejich strukturu je možné nasynetizovat tak, aby uspokojivě prostupovaly biologickými bariérami a dosahovaly svého cíle, byly co nejméně toxické a nebyly imunogenní.[32], [34]

Dendrimery mohou navázat léčivo a tím ho dopravit na požadované místo, současně jsou schopny zvyšovat rozpustnost API. Zvýšení rozpustnosti léčiva umožní lepší absorpci a vyšší biodostupnost. Většina léčiv je špatně rozpustná ve vodě. Dendritické molekuly s hydrofobními jádry a hydrofilními periferiemi mohou do svých struktur navázat léčivo podobně jako micely. Dendrimery však mohou navázat i jiné sloučeniny, čímž zafungují jako radioligandy, detekční látky nebo kontrastní látky.[28], [32], [34]

Součástí skvělého potenciálu je i vícevaznost těchto molekul.[35] Jedna molekula dendrimeru disponuje desítkami až stovkami míst, kam lze navázat přenášené substance. [34], [35]

V poslední době je dendrimerů hojně využíváno v *antineoplastické* terapii.[36] U konvenční chemoterapie je problémem silná toxicita pro zdravé buňky. Klasická cytostatika cílí na buňky rychle se dělící. Díky dendrimerům je možné léčivo dopravit přímo k nádorové buňce. (Obrázek 9). Pro nádorové buňky je příznačná například zvýšená míra exprese folátových receptorů. Při navázání kyseliny listové na dendrimer nesoucí chemoterapeutikum je docíleno zvýšení koncentrace léčiva u nádoru, a naopak snížení jeho toxicity na zdravých buňkách.[34], [36]



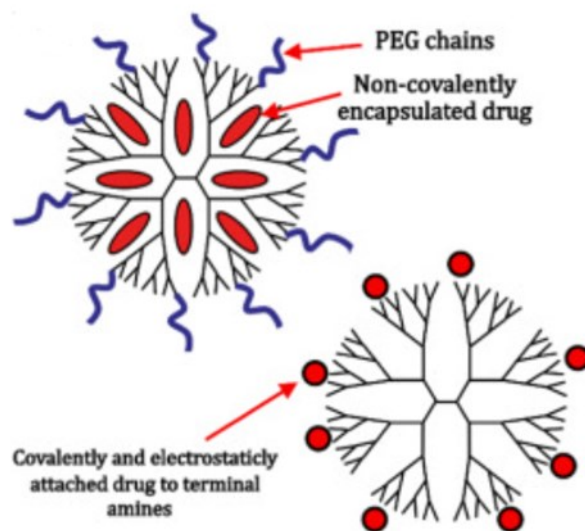
Obrázek 9: Cílená protinádorová terapie[37]

3.4. PAMAM dendrimery

PAMAM dendrimery jsou jako ostatní dendrimery sférické, vysoce uspořádané a rozvětvené molekuly. Jejich vlastnosti jsou podobné globulárním proteinům. Patří k rozsáhle používaným, hlavně díky rozmanitým možnostem využití.[38] Také relativně nízké náklady spolu s nepříliš složitou přípravou z nich činí, oproti podobně využívaným biologickým molekulám (protilátkám a proteinům), oblíbené struktury. Zaobíraly se jimi mnohé studie a staly se komerčními mezi prvními. Tato třída dendrimerů byla zkoumána, charakterizována a syntetizována poprvé v osmdesátých letech dvacátého století, když prof. Dr. Donald A. Tomalia popsal divergentní syntézu dendrimerů generací 1-7.[39], [40]

Tyto molekuly zlepšují biologickou dostupnost substancí cílících na rozličná místa organismu. Jsou schopny nést léčiva i geny.[41] Dále zvyšují rozpustnost a stabilitu ve vodě málo rozpustných léčiv. PAMAM dendrimery mají velkou vazebnou kapacitu. Přenášená substance může být inkorporována uvnitř molekuly PAMAM dendrimeru nebo navázána na funkční skupiny nacházející se na povrchu (Obrázek 10). Velikost PAMAM dendrimerů se pohybuje mezi hodnotami 1 až 14 nm, a to v závislosti na generaci. Vazebná schopnost s rostoucí generací klesá, zejména pak od G6, nejlepší vazebné schopnosti vykazují dendrimery

do čtvrté generace. [38], [39], [40], [41], [42] Obecně je ale jejich vazebná kapacita velmi vysoká, díky relativně malé molekulové hmotnosti vůči povrchu.

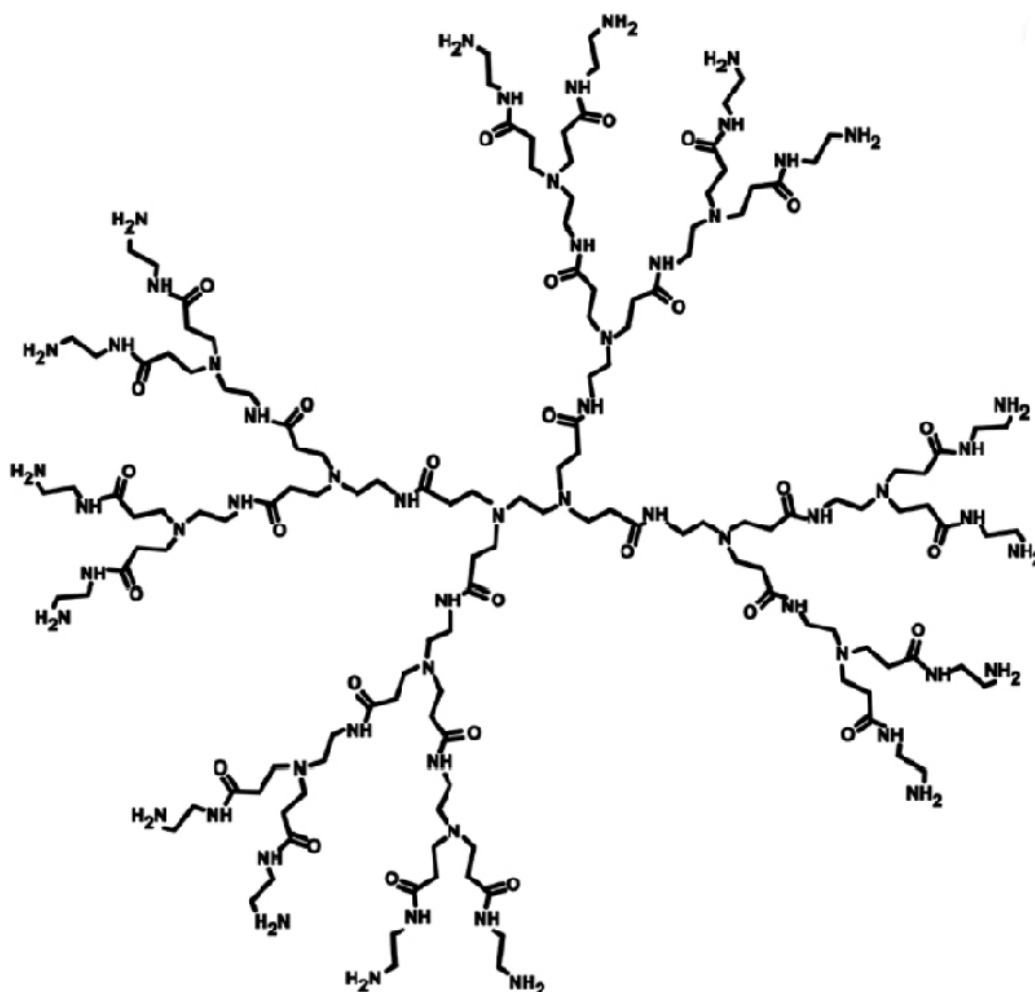


Obrázek 10: PAMAM dendrimery s navázanou substancí [43]

Iničiační jádro bývá tvořeno zejména ethylendiaminem (EDA), dále cystaminem, nebo amoniakem (NH_3). Jednotlivé větve dendrimerů jsou tvořeny postupným navazováním N-(2-aminoethyl)akrylamidu pomocí dvoustupňového procesu (Obrázek 11).[38], [39]

V prvním stupni probíhá adice methylakrylátu k aminoskupině iničiačního jádra. Poté, ve druhém kroku, nastává amidace vzniklých esterů EDA. Každá další generací dendrimerů je větší o 1 nm.[43] Molekulová hmotnost je s každou další generací dvojnásobná. Oproti jiným třídám dendrimerů disponují PAMAM dendrimery vyšší biokompatibilitou, možná díky kombinaci aminových a amidových skupin. Tyto funkční skupiny se přirozeně vyskytují v organismu.[39], [41], [43]

Koncové aminové skupiny mohou být upravené nejčastěji pomocí hydroxylové (-OH) skupiny, karboxylové (-COOH) skupiny, konjugované s uhlovodíkovými řetězci nebo pegylované (Obrázek 10). Úprava aminových skupin je využívána za účelem snížení toxicity,[30] jelikož bylo dokázáno, že s rostoucí generací a koncentrací dendrimeru roste i jejich toxicita.



Obrázek 11: Struktura PAMAM dendrimeru [40]

Toxicita je také ovlivněna nábojem na povrchu molekul. Kladně nabitě či neutrální funkční skupiny na povrchu jako (-NH₂) a (-OH) způsobují lepší prostupnost membránami, destabilizují je, a jsou tak více toxické vlivem lýzy a smrti buňky. Bylo zjištěno, že primární aminoskupiny jsou více toxické než sekundární a terciální. Záporný náboj na povrchu (-COOH) je méně toxický. V porovnání s jinými třídami jsou, dle mnohých studií, PAMAM dendrimery méně toxické. Toto platí, co se průměrné toxicity na organismus týče, protože vůči některým tkáním naopak vykazují toxicitu vyšší.[30], [31], [42]

draselné soli má DIC mírně pomalejší nástup účinku. Biologický poločas DIC je krátký, mezi 1-2 h. Jeho terapeutický účinek je však o mnoho delší, protože se hromadí v synoviální tekutině. Toho je v praxi využíváno.[48] DIC bývá součástí přípravků s indikací na bolest kloubů. Jak topických (například Olfen gel), tak perorálních. Své uplatnění ale nachází i v terapii dysmenorrhey nebo migrény.[48], [49]

Nežádoucí účinky DIC nevyhnutelně souvisí s mechanismem účinku. Bylo prokázáno, že jejich výskyt stoupá s dávkou.[45] Blokadí COX-1 dochází k snížené obnově žaludeční mukózy a hrozí eroze sliznice žaludku, ulcerace či perforace, jež se mohou vyskytnout i bez varovných příznaků. Oproti indometacinu, patřícímu do stejné strukturální skupiny, je však DIC k žaludeční sliznici šetrnější. Opatrní by při užívání měli být pacienti s problémy s játry, protože DIC je přeměňován na neaktivní metabolity v játrech. Dochází zde k oxidativním přeměnám pomocí enzymů CYP2C9, CYP2C8, CYP3A4 atd. Z tohoto důvodu se dlouhodobé užívání nedoporučuje u nikoho.[45], [50]

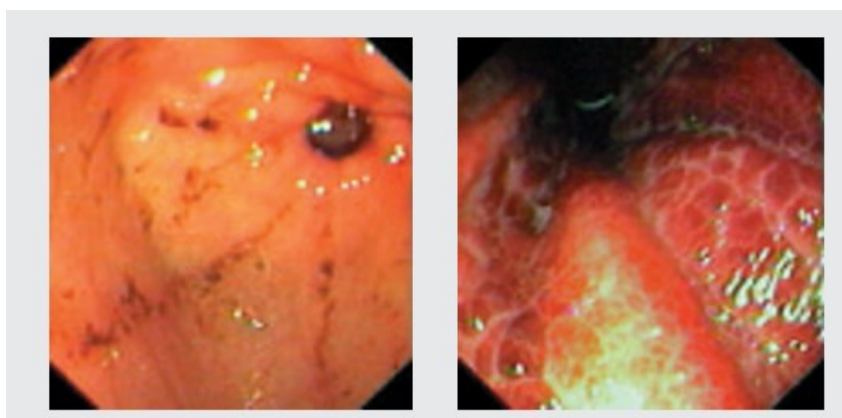
Dalším orgánem spojeným s nežádoucími účinky jsou ledviny. Snížením produkce ledvinných prostaglandinů dochází k snížení exkrece sodíku, čímž se zvyšuje zadržování vody organismem. Následují otoky, zvýšení tlaku atd. Pacienti s ledvinným nebo srdečním selháním či hypertonici by se měli NSAID vyhnout.[51] Obecně, při rozsáhlých studiích bylo potvrzeno zvýšení kardiovaskulárního rizika při užívání DIC. Toto riziko bylo srovnatelné s koxiby, ibuprofenem a naproxenem. Byly pozorovány alergické reakce (Obrázek 13), vzácně i anafylaktická, z toho důvodu není vhodné užívání DIC u astmatiků. Všechna NSAIDs jsou do určité míry fototoxická, vyhýbat se slunečnímu záření je na místě. Někdy se může vyskytnout kopřivka.



Obrázek 13: Kůže pacienta užívajícího NSAID po expozici slunečnímu záření [52]

U topických přípravků je toto riziko vyšší než u podání systémového. Při dlouhodobém užívání NSAID mohou nastat bolesti hlavy, které by neměly být řešeny navýšením dávky.[50], [51]

Vlivem blokace COX-1 krevních destiček má DIC protisrážlivý účinek. Ke komplikacím (krvácení) může dojít, pokud pacient současně užívá léky na ředění krve nebo jiná NSAIDs.[53] DIC může maskovat projevy infekčních onemocnění, proto je třeba dbát opatrnosti. Z důvodu hepatotoxicity a gastrotoxicity je krajně nevhodné při léčbě požívat alkohol.[54] U starších pacientů je potřeba pečlivě zvážit dávky. Ty by měly být co nejnižší, protože u geriatrické populace je častější výskyt nežádoucích účinků, zejména gastrointestinálního krvácení (Obrázek 14). Důvodem může být jednak snížené prokrvení sliznice trávicího traktu, a tedy zpomalení její reparační, jednak vyšší pravděpodobnost současného užívání dalších gastrotoxických léčiv (SSSR, kortikosteroidů, ASA). V případě užívání gastrotoxických léčiv je třeba zvážit užívání protektivních látek, jako inhibitorů protonové pumpy. [53], [54]



Obrázek 14: Gastropatie při užívání NSAID [55]

Je nutná obezřetnost u pacientů s poruchou funkce ledvin nebo jater. Jelikož byly v souvislosti s NSAIDs hlášeny případy retence tekutin a edémů, nedoporučuje se užívat DIC pacientům s vážnější hypertenzí nebo srdečním selháváním.[54]

DIC je kontraindikován u těhotných z důvodu možných malformací plodu nebo uzavření ductus arteriosus v pozdější fázi (třetím trimestru) těhotenství. Vlivem inhibice tvorby prostaglandinů dochází k snížení děložních kontrakcí a možnému oddálení porodu či prodloužení jeho průběhu. Antiagregační účinek zase může způsobit komplikace s porodním krvácením. Stejně jako jiná NSAIDs i DIC prostupuje do mateřského mléka. Z důvodu

vyloučení možných nežádoucích účinků na kojence je záhodno se užívání při kojení vyhnout.[56]

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie, materiál a přístroje

Pro experimentální část diplomové práce byly použity čtyři generace PAMAM dendrimerů s aminoskupinami na jejich periferii. Konkrétněji byly použity 20 w% roztok první generace (G1) dendrimeru v methanolu ($M_w=1429,85$ g/mol, hustota=0,82 g/ml, CAS Number: 142986-44-5), 20 w% roztok druhé generace (G2) dendrimeru v methanolu ($M_w=3256,18$ g/mol, hustota=0,86 g/ml, CAS Number: 93376-66-0), 20 w% roztok třetí generace (G3) dendrimeru v methanolu ($M_w=6908,84$ g/mol, hustota=0,863 g/ml, CAS Number: 153891-46-4), a 10 w% roztok čtvrté generace (G4) dendrimeru v methanolu ($M_w=14214,17$ g/mol, hustota=0,813 g/ml, CAS Number 163442-67-9) zakoupené od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

K přípravě všech vodných roztoků byla použita ultra čištěná voda. Pro čištění byl využit Milli-Q RG water purification system (Millipore, Burlington, USA). Jako modelová léčivá látka pro permeační pokusy byl zvolen DIC s 98 % čistotou (Tokyo chemical industry, Tokyo, Japonsko). Gemtamicin, hydratované i nehydratované anorganické soli, použité pro přípravu izotonického fosfátového pufru, a rozpouštědla pro HPLC (methanol, voda, kyselina octová) byla, kromě methanolu (Altium International s.r.o., Ženeva, Švýcarsko), zakoupena od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Lidská kůže, použitá v tomto experimentu, pocházela z plastické chirurgie Sanus v Hradci Králové. Byla odebrána při plastické operaci ženám, následně zbavena podkožního tuku, omyta a uchovávána zmražená při teplotě -20 °C.

Pro filtraci vzorků posloužily nylonové filtry s velikostí pórů $0,45$ μm značky GVS z italské Boloně.

Vialky s roztokem dendrimerů v methanolu byly sušeny (bylo odpařováno rozpouštědlo) po dostatečně dlouhou dobu v proudu dusíku. Následně byly vzorky dosoušeny ve vakuové olejové pumpě 2 hodiny. Nakonec byly vzorky ponechány jednu hodinu v exikátoru s oxidem fosforečným. Exikátor byl připojený s membránovou vakuovou pumpu KNF Laboport (Freiburg im Breisgau, Německo). Permeace se uskutečnily ve vodní lázni WNB 29 (Memmert, Schwabach, Německo) s teplotou nastavenou na 32 °C. Ve vodní lázni byly umístěny Franzovy difúzní cely ruční výroby. Důkladné homogenizace vzorků bylo umožněno díky mini-třepačce nebo třepačce LT3 (Nedform, Valašské Meziříčí, ČR). Pro navažování surovin byla využívána analytická váha Ohaus Pioneer (Ohaus, Parsippany, NJ, USA).

Pro odebrání specifických objemů byly používány automatické mikropipety VWR (Randor, PA, USA). Vzorke byly centrifugovány pomocí centrifugátoru MPW-260R (MPW MED. Instruments, Varšava, Polsko) s 15 000 otáčkami za minutu, teplotou 21 °C po dobu 10 minut.

HPLC analýza DIC byla provedena přístrojem HPLC Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybaveným G1379B degasserem, G1310A pumpou, G1316A termostatem pro kolonu, G1329A autosampler a G1321B fluorescenčním detektorem.

Pro chromatografickou analýzu byla používána kolona LiChroCART 250-4 naplněná LiChrospher 100 RP-18 částicemi o velikosti 5 µm (Merck, Darmstadt, Germany). Mobilní fáze pro DIC byla směs MeOH:H₂O:CH₃COOH v poměru 80:20:0,5 (v/v). Průtok analýzy byl 1,35 ml/min (tlak okolo 22 MPa) a teplota kolony 25 °C. Objem vzorku nastříknutý na kolonu byl 20 µl. Detekční vlnová délka byla 275 nm a retenční čas 4 min (celková délka analýzy byla 6 min). Vždy bylo použito vialek kompatibilních s HPLC přístrojem (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.2. Příprava vzorků DIC ve vodě pro měření rozpustnosti

4.2.1. Příprava nasycených vodných roztoků s DIC

Pro přípravu nasycených vodných roztoků DIC bylo naváženo známé množství (okolo 12 mg) DIC do předem připravených vialek označených čísly 1 až 5. Poté bylo do vialek napipetováno po 400 µl ultračisté vody. Následně byly směsi promíchány na míchačce a vloženy na 24 h na třepačku k důkladné homogenizaci. Poté byla provedena centrifugace. Nakonec byl nasycený roztok z každé vialky obezřetně odebrán (zhruba 250 µl) a napipetován do předem připravených a označených vialek s insertem pro HPLC analýzu.

4.2.2. Příprava vodných roztoků PAMAM dendrimerů

Při přípravě vzorků vodných roztoků PAMAM dendrimerů bylo vytvořeno několik sérií. Každá série byla tvořena jinou generací dendrimerů. V této experimentální práci byly použity G1 až G4. V každé z generací byly připraveny tři různé koncentrace dendrimerů (0,5 mM, 1 mM a 2 mM). Od každé koncentrace bylo vytvořeno pět vzorků. Celkem tedy 60 vzorků vodných roztoků dendrimerů, jež byly na skle vialek náležitě označeny.

Pro přípravu určených koncentrací vzorků dendrimerů (viz výše) bylo třeba vypočítat objem jednotlivých generací, který bude ze zásobních roztoků dendrimerů v methanolu pipetován. Za pomoci automatické mikropipety bylo odebráno 67,13 µl PAMAM dendrimeru G1 a vloženo do předem zvážené vialky. PAMAM dendrimeru G2 bylo odebráno 145,77 µl

a také vloženo do předem zvážené vialky. Stejný postup byl aplikován u G3 a G4, u první zmiňované se jednalo o 308,22 μl a u druhé o 1346,23 μl .

Pro získání suchých dendrimerů bylo třeba odpařit methanol. To bylo provedeno v proudu dusíku na katedře organické a bioorganické chemie. Následovalo dvouhodinové sušení v olejové pumpě s vakuem. Poté byly vialky ponechány v exikátoru s vakuem za přítomnosti oxidu fosforečného 24 hodin. Tímto bylo odstraněno zbylé rozpouštědlo. Nakonec byly vialky zváženy pro srovnání reálné hmotnosti s teoretickou.

Do každé vialky s čistými PAMAM dendrimery bylo přidáno 3,85 ml ultračisté vody. Vznikly tak roztoky o koncentraci 2 mM. Vialky byly náležitě označeny a na třepačce jejich obsahy zhomogenizovány. Aby byly získány také roztoky o koncentraci 1 a 0,5 mM, bylo třeba provést ředění. Pro matematické zjednodušení byl nejprve odebrán 2 mM roztok o objemu 2,2 ml a přenesen automatickou mikropipetou do označené vialky. Pomocí automatické mikropipety bylo odebráno 1,1 ml roztoku o koncentraci 2 mM a přeneseno do patřičně označené vialky. Následně bylo přidáno 1,1 ml ultračištěné vody, čímž vznikl roztok PAMAM dendrimerů o koncentraci 1 mM. Pro vytvoření roztoku o koncentraci 0,5 mM PAMAM dendrimerů bylo z předchozího roztoku odebráno 0,55 ml, přeneseno do označené vialky a zředěno 1,65 ml ultračisté vody. Výše zmíněný postup byl proveden se všemi generacemi od methanolu vysušených a v ultračisté vodě rozpuštěných PAMAM dendrimerů. K homogenizaci všech roztoků byla opět využita míchačka.

Z roztoků daných koncentrací následně mohl být připraven požadovaný počet vzorků. Všechny byly na svých vialkách označeny dle generace PAMAM dendrimerů a koncentrace.

4.2.3. Příprava nasycených vodných roztoků DIC s PAMAM dendrimery

Pro přípravu nasycených vodných roztoků DIC s PAMAM dendrimery bylo třeba připravit si a popsat dostatek vialek. Vialky byly označeny jednak podle generace a koncentrace dendrimerů a také písmeny A až E. Písmena reprezentovala jednotlivé vzorky od jednoho koncentračního a generačního typu dendrimerů.

Následně byla do každé z připravených vialek navážena známá hmotnost DIC, okolo 14 mg. Pomocí automatické mikropipety bylo do každé z vialek přidáno 400 μl připraveného roztoku dendrimeru podle generace a koncentrace. Vialky byly ponechány v třepačce na 24 hodin. Další den byly suspenze vloženy do centrifugy a byla provedena centrifugace. Poté byly připraveny vialky s insertem vhodné pro HPLC analýzu a byly popsány stejným způsobem

vysvětleným výše. Do těchto vialek bylo opatrně (aby nedošlo k nasátí nerozpuštěné sedimenty pipetou) napipetováno 250 μ l odpovídajících roztoků připravených centrifugací. Vzniklé roztoky byly podrobeny metodě HPLC a následně byly použity při permeačních pokusech.

Před vlastní HPLC analýzou bylo třeba ještě několika kroků. Nastavená metoda HPLC byla kalibrována pro nižší koncentrace DIC. Proto bylo potřeba před vlastní analýzou vzorky ještě zředit. Nejprve byly vzorky zředěny 10 \times a poté ještě 100 \times . Následně byly ověřeny nastavené parametry HPLC metody pomocí vytvoření kalibrační křivky. Pro kalibrační křivku bylo připraveno několik roztoků DIC o známé koncentraci. Poté byly zhodnoceny nastavené parametry analýzy. Nakonec byly vzorky vloženy do HPLC a proběhla vlastní analýza.

4.3. První permeace

4.3.1. Příprava vzorků pro donorovou fázi

Pro potřeby zkoušky permeace této diplomové práce bylo nejprve připraveno pět vzorků. V prvním byl obsažen pouze vodný roztok DIC. Do zbylých čtyřech vialek bylo napipetováno potřebné množství vodných roztoků dendrimerů generací 1 až 4 (viz níže) pro vytvoření roztoku DIC s koncentrací dendrimerů 0,5 mM. Koncentrace DIC ve všech vzorcích byla 15 mg/ml.

4.3.1.1. Detaily přípravy

Do první vialky bylo na analytických vahách naváženo 12,0 mg DIC. Následně byla přidána ultra čistěná voda do výsledného objemu 0,8 ml (výsledná koncentrace kontrolního vodného roztoku byla 15 mg/ml). Do vialek 1 až 4 byl napipetován vypočtený potřebný objem methanického roztoku dendrimerů generací 1 až 4 (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Objemy roztoků jednotlivých generací

Generace dendrimerů	Mw (g/mol)	Potřebná koncentrace (mM)	Pipetovaný objem (μL)
G1	1429,85	0,5	4,36
G2	3256,18	0,5	9,47
G3	6908,84	0,5	20,01
G4	14214,14	0,5	87,42

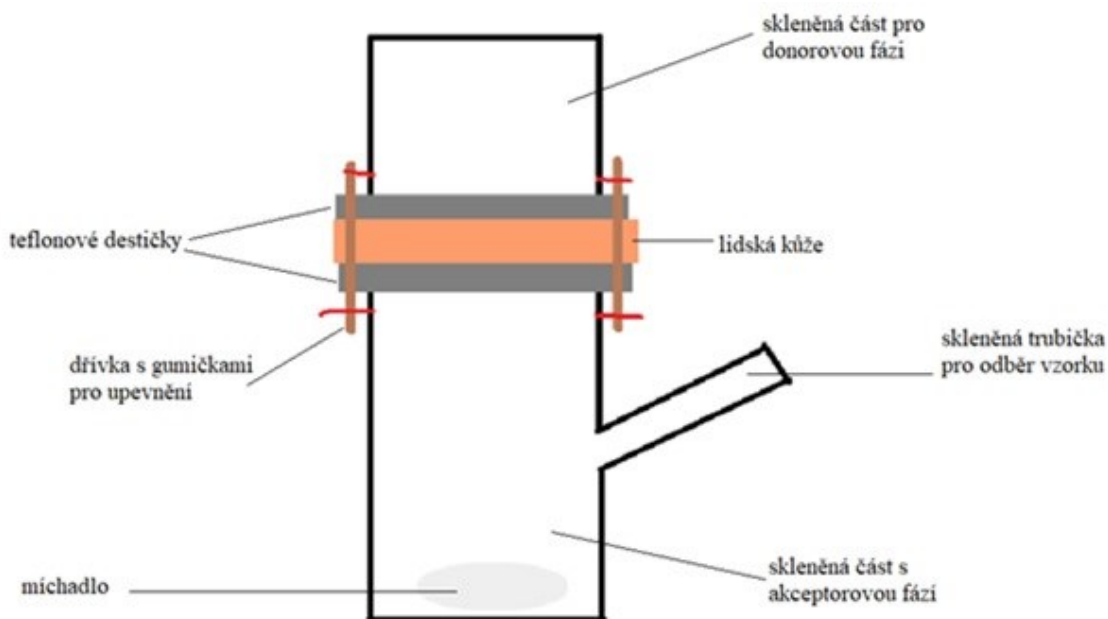
Methanol bylo třeba nechat pár hodin odpařovat v proudu dusíku. Následně byly vialky umístěny na dvě hodiny do vysokovakuové olejové pumpy. Nakonec na jednu hodinu do exsikátoru s přítomností oxidu fosforečného. Do každé z vialek 1–4 byl přidán 1 ml vody, aby byl získán 0,5 mM roztok každé generace. Do nové prázdné vialky bylo naváženo 12,4 mg DIC a přidáno 0,83 ml 0,5 mM roztoku G1 (výsledná koncentrace DIC je 15 mg/ml v 0,5 mM dendrimery G1). Podobným způsobem bylo do další prázdné vialky naváženo 12,1 mg DIC a přidáno 0,81 ml 0,5 mM roztoku G2 (výsledná koncentrace DIC je 15 mg/ml v 0,5 mM dendrimery G2), do další prázdné vialky bylo naváženo 12,0 mg DIC a přidáno 0,80 ml 0,5 mM roztoku G3 (výsledná koncentrace DIC je 15 mg/ml v 0,5 mM dendrimery G3) a do další prázdné lahvičky bylo naváženo 13,0 mg DIC a přidáno 0,87 ml 0,5 mM roztoku G4 (výsledná koncentrace DIC je 15 mg/ml v 0,5 mM dendrimery G4).

Následně byly vzorky umístěny na třepačku po dobu 24 hodin. Nakonec z každého roztoku vzorku bylo připraveno šest vzorků po sto mikrolitrech. Těchto třicet vzorků sloužilo jako donorová fáze pro Franzovy cely (viz níže).

4.3.2. Příprava Franzových cel a nanesení donorové fáze

4.3.2.1. Sestavení Franzových cel

Pro zkoušku permeace ex vivo byly ručně sestaveny Franzovy difuzní cely (viz Obrázek 15) s lidskou kůží.



Obrázek 15: Franzova difuzní cela [57]

Franzova cela byla složena ze dvou skleněných částí (trubicovitého tvaru) a dvou teflonových destiček, mezi kterými byla umístěna lidská kůže. Kůže byla předem rozmrazena, následně skalpelem nařezána na části, plochou zhruba odpovídající teflonovým destičkám. Poté znovu omyta a očištěna vatovou tyčinkou. Teflonové destičky, s plochou zhruba 2 cm² a otvorem uprostřed o ploše 1 cm², byly potřeny silikonem pro lepší přilnutí ke skleněným částem. Kůže mezi ně byla umístěna tak, že epidermální strana směřovala vzhůru.

Skleněná část pro akceptorovou fázi byla naplněna 10 mM PBS o pH 7,4. Bylo třeba znát přesný objem PBS ve Franzově cele, čehož bylo dosaženo pomocí injekční stříkačky a odměrného válce. Pro všechny cely bylo třeba připravit celkem 1000 ml pufru. Bylo naváženo 314,5 mg NaH₂PO₄·2 H₂O, 2,874 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 207,9 mg KCl a 7,989 g NaCl. Navážky byly rozpuštěny ve zhruba půl litru ultra čištěné vody a roztok posléze doplněn na 1000 ml. Následně byl roztok krátce zahříván a bylo přidáno 50,8 mg gentamicinu. Na závěr bylo překontrolováno pH a PBS přefiltrován přes filtrační papír.

4.3.2.2. Nanesení donorové fáze

Nejprve bylo třeba připravit vodní lázeň, vytemperovat ji na 32 °C a nechat ustálit 12 hodin. Posléze do ní byly umístěny Franzovy difuzní cely. Od každého vzorku se aplikovalo po 100 µL do šesti cel (skleněné části pro akceptorovou fázi – kůži). Průběžně byla doplňována odpařená voda z lázně i odpařený PBS z akceptorové části cel.

4.3.2.3. Odebrání akceptorové fáze pro HPLC a měření permeace DIC kůží

Po 24 hodinách od nanesení donorových vzorků byly odebrány vzorky z akceptorové fáze. Z každé cely 1 ml. Tyto vzorky byly následně přefiltrovány pomocí poloautomatické pipety přes špičku s vatou do vialek určených k HPLC analýze.

4.3.2.4. Příprava vzorku kůže pro zjištění retence DIC v kůži pomocí HPLC

Po odebrání vzorků z akceptorové fáze byly Franzovy cely demontovány a následovalo omytí kůže stříčkou. Finální dočištění naneseného vzorku z kůže bylo provedeno pomocí vatové tyčinky. Poté se skalpelem vyřízla pouze část, na kterou bylo aplikováno. Tato kůže byla vložena do předem zvážených vialek a následně byly vialky zváženy i s kůží. Vše bylo pečlivě zaznamenáno. Následně bylo do každé vialky přidáno extrakční činidlo stejného složení jako mobilní fáze, tedy methanol, ultračištěná voda a kyselina octová v poměru

800:200:0,5. Vialky byly připevněny na třepačku. Po dobu 24 hodin byl nechán extrahovat DIC z kůže.

Jakmile uplynula potřebná doba třepání pro extrakci, byly extrakty přefiltrovány za pomoci poloautomatické pipety s vatou ve špičce do vialek určených k HPLC analýze. Pomocí HPLC analýzy bylo zjištěno množství DIC zadržného kůží.

4.4. Druhá permeace

4.4.1. Příprava vzorků pro donorovou fázi

Pro druhou permeaci byly použity pouze dvě generace PAMAM dendrimerů (G2 a G4) ve dvou různých koncentracích (1 a 2 mM). Koncentrace DIC v každé formulaci byla 15 mg/ml a byly připraveny obdobným způsobem, jaký byl popsán dříve při první permeaci.

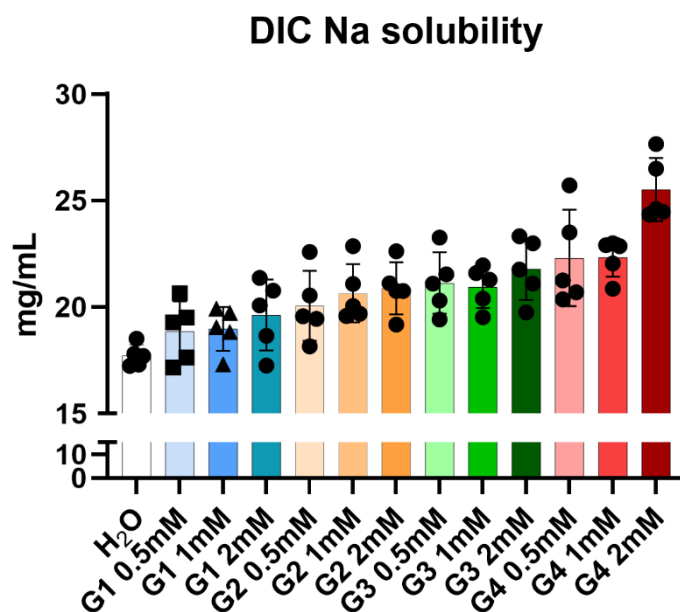
4.4.2. Příprava Franzových cel a nanesení donorové fáze

Příprava Franzových difuzních cel a objemy aplikovaných nových vodných roztoků DIC v různých koncentracích PAMAM dendrimerů pro druhou permeaci byly podobné jako ty dříve popsané u první permeace.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Rozpustnost DIC

Jak již bylo popsáno, DIC je sůl, která je pouze mírně rozpustná ve vodě. V této diplomové práci byl zkoumán vliv PAMAM dendrimerů na rozpustnost DIC ve vodném prostředí. Byl hodnocen význam koncentrací i generací. Byly zvoleny čtyři generace dendrimerů (G1-G4) a u každé z nich testovány koncentrace 0,5, 1,0 a 2,0 mM. Posuzován byl tedy jak vliv velikosti molekuly dendrimeru, tak koncentrace dendrimeru na rozpustnost DIC. Z dostupných literárních zdrojů vyplývá, že PAMAM dendrimery by mohly díky svým výhodným vlastnostem zlepšovat rozpustnost léčiv špatně rozpustných ve vodě, a pomáhat tak s řešením tohoto technologického problému v praxi. [41], [58] Výsledek tohoto pokusu je znázorněn v následujícím grafu (Obrázek 16).



Obrázek 16: Přehled výsledků rozpustnosti DIC

Pokusy demonstrovaly, že koncentrace nasyceného vodného roztoku DIC je v průměru $17,70 \pm 0,51$ mg/ml, což úzce koreluje s dříve publikovanými údaji ($20,23 \pm 0,12$ mg/mL). [59]

Přidáním PAMAM dendrimerů do média došlo k zvýšení rozpustnosti. U G1 došlo k zvýšení rozpustnosti DIC o 6,4 %, 7,11 % a 10,78 %, když byly koncentrace dendrimerů 0,5, 1 a 2 mM v tomto pořadí. U G2 se rozpustnost DIC zvýšila o 13,2 %, 16, 59 % a 17,89 %, 16, 59 % a 17,89 %, 16, 59 % a 17,89 %, 16, 59 % a 17,89 %.

také při koncentracích 0,5, 1 a 2 mM v tomto pořadí. Při použití ostatních generací byl trend obdobný (Tabulka 2).

Tabulka 2 Koncentrace DIC v roztocích s PAMAM dendrimery

Typ roztoku	Rozpustnost DIC (mg/ml)
Vodný roztok	17,72 ± 0,51
G1 0,5 mM	18,85 ± 1,43
G1 1 mM	18,98 ± 1,03
G1 2 mM	19,63 ± 1,67
G2 0,5 mM	20,06 ± 1,65
G2 1 mM	20,66 ± 1,37
G2 2 mM	20,89 ± 1,23
G3 0,5 mM	21,13 ± 1,44
G3 1 mM	20,95 ± 0,98
G3 2 mM	21,79 ± 1,45
G4 0,5 mM	22,31 ± 2,26
G4 1 mM	22,33 ± 0,91
G4 2 mM	25,51 ± 1,48

Z výsledků je patrné, že přítomnost PAMAM dendrimerů ve vodném médiu dokáže zvyšovat rozpustnost DIC v závislosti na koncentraci i generaci. Avšak neexistuje korelace mezi koncentrací dendrimeru a zvýšením rozpustnosti. Při zdvojnásobení koncentrace dendrimeru nedošlo u žádné z generací ke dvojnásobnému zlepšení rozpustnosti. U první generace můžeme pozorovat zlepšenou rozpustnost zhruba o 1 % při použití koncentrace 1 mM místo 0,5 mM. Při zdvojnásobení koncentrace PAMAM dendrimeru v médiu až na koncentraci 2 mM pozorujeme zlepšení rozpustnosti pouze o další 3 %. U čtvrté generace činí rozdíl v rozpustnosti DIC mezi koncentracemi 0,5 a 1 mM PAMAM dendrimerů pouhých 0,12 %. Ovšem při použití koncentrace 2 mM PAMAM dendrimerů už byl rozdíl markantní, a to 17,94 %. Obecný trend tak byl platný i u této generace.

Nízká rozpustnost DIC ve vodě je jednou z limitací pro dosažení uspokojivé biologické dostupnosti. Vyšší rozpustnost by umožnila aplikovat nižší dávky léčiva a zároveň lépe předvídat distribuci i efekt. Došlo by tak k snížení výskytu nežádoucích účinků, které plynou z podávání vysokých dávek NSAIDs. [60]

5.2. Kožní permeace

Zkouška kožní permeace byla prováděna *in vitro* ve Franzových difúzních celách, jež jsou považované za nejvhodnější pro tyto účely a jsou běžně využívány. [57], [61]

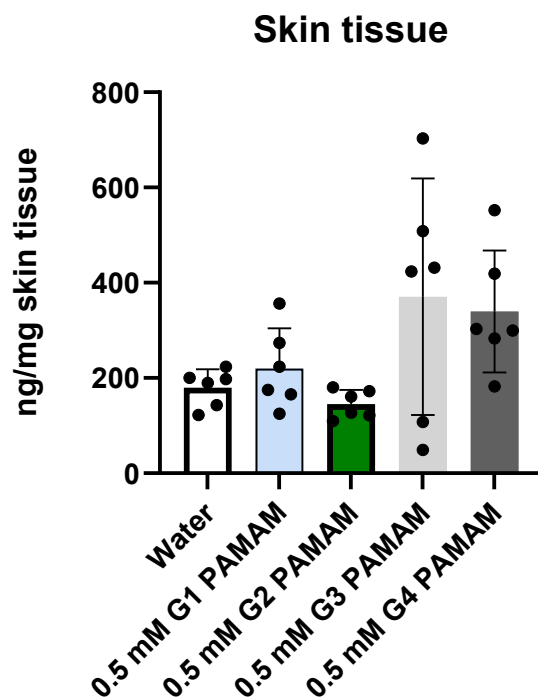
Pro účely této diplomové práce byly provedeny dva permeační pokusy. Po provedení předchozích pokusů na možnosti zlepšení rozpustnosti DIC pomocí PAMAM dendrimerů byly vybrány specifické koncentrace PAMAM dendrimerů: 0,5, 1 a 2 mM. V první permeační zkoušce byla zvolena koncentrace 0,5 mM, jelikož tato koncentrace dendrimerů vykazuje pouze zanedbatelnou toxicitu vůči buňkám. [62] Ve druhém permeačním pokusu byly testovány i koncentrace 1 mM a 2 mM PAMAM dendrimerů. Vzorky s DIC obsahovaly sůl v koncentraci 15 mg/ml.

Za akceptorovou fázi byl zvolen roztok PBS, protože je izotonický vůči prostředí v hlubších vrstvách kůže a systémovém oběhu. [63]

5.2.1. Prostup DIC do kůže

5.2.1.1. 1. zkouška penetrace

Vliv PAMAM dendrimerů na penetrované množství DIC do kůže je znázorněn v následujícím grafu (Obrázek 17).



Obrázek 17: Vliv PAMAM dendrimerů na penetrované množství DIC do kůže u první permeace

Pro tento penetrační pokus byla zvolena koncentrace dendrimerů 0,5 mM a byly testovány G1-G4. Kontrolním roztokem byla voda s koncentrací DIC 15 mg/ml.

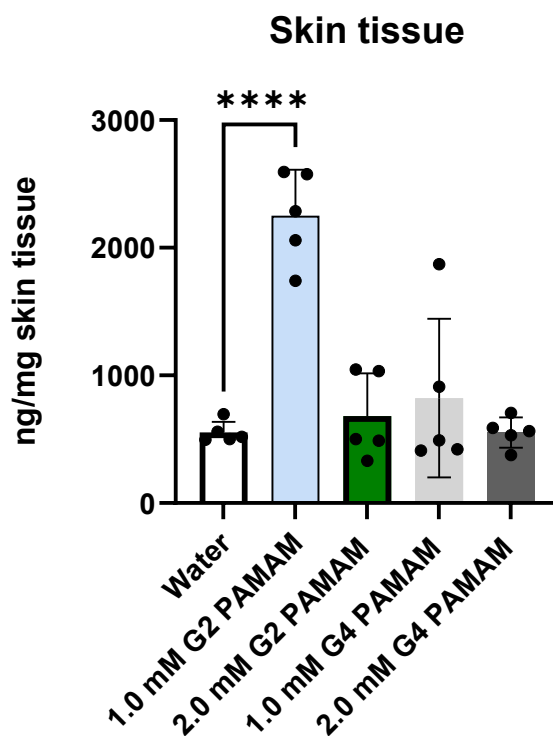
U všech vzorků s použitými generacemi PAMAM dendrimerů bylo analyzováno velmi podobné množství DIC v kůži ve srovnání se vzorkem kontrolním. Například u G1 bylo analyzováno $219,93 \pm 84,21$ ng/mg kůže sledované soli. Hodnota u kontrolního vzorku byla $179,48 \pm 38,6$ ng/mg kůže. U vzorku s G2 bylo analyzováno dokonce pouze $145,27 \pm 29,48$ ng/mg kůže. Podrobné výsledky jsou zpracovány v tab. 3. Nebyl prokázán žádný statisticky významný vliv PAMAM dendrimerů v koncentraci 0,5 mM na zlepšení prostupu DIC do lidské kůže. Všechny výsledky retence DIC v kůži z první permeace jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 3 Množství DIC naměřené v kůži během první permeace

Typ roztoku	Množství DIC (ng) v 1 mg kůže
15 mg/ml DIC ve vodě	$179,48 \pm 38,60$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G1	$219,93 \pm 84,21$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G2	$145,27 \pm 29,48$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G3	$370,51 \pm 248,42$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G4	$339,68 \pm 128,31$

5.2.1.2. 2. zkouška penetrace

Vliv PAMAM dendrimerů na penetrované množství DIC do kůže je znázorněn v následujícím grafu (Obrázek 18).



Obrázek 18: Vliv PAMAM dendrimerů na penetrované množství DIC do kůže u druhé permeace

Pro tento penetrační pokus byla zvolena koncentrace dendrimerů 1 mM a 2 mM a byly testovány G2 a G4. Kontrolním roztokem byla voda s koncentrací DIC 15 mg/ml.

Také u druhé penetrační zkoušky bylo u vzorků s použitými generacemi PAMAM dendrimerů analyzováno velmi podobné množství DIC v kůži ve srovnání se vzorkem kontrolním (viz Tabulka 4). V tabulce můžeme vidět, že s přihlédnutím k směrodatným odchylkám neprokazují výsledné hodnoty ve většině zlepšený přístup DIC do kůže. Pouze u G2 v koncentraci 1 mM došlo k více než čtyřnásobnému zlepšení prostupu DIC do vrstev kůže. U kontrolního vzorku bylo v kůži analyzováno $554,08 \pm 83,09$ ng/mg kůže. Statistický význam pro zlepšení penetrace DIC do kůže měl vzorek 1 mM G2 PAMAM, kde bylo detekováno $2251,32 \pm 361,08$ ng/mg kůže.

Tabulka 4 Množství DIC naměřené v kůži během druhé permeace

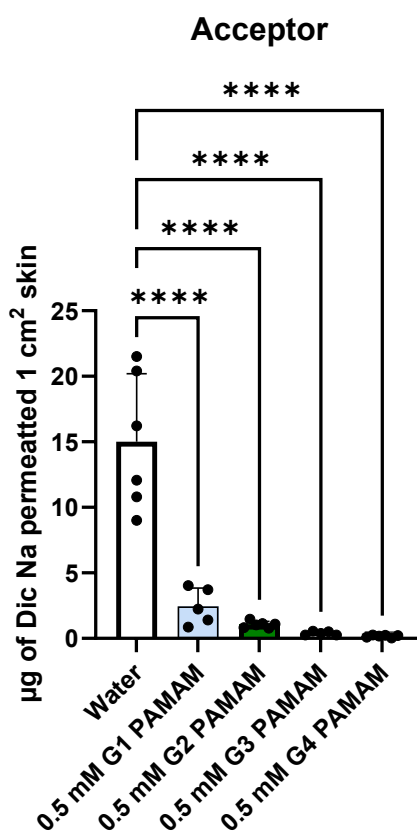
Typ roztoku	Množství DIC (ng) v 1 mg kůže
15 mg/ml DIC ve vodě	554,08 ± 83,09
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G1	2251,32 ± 361,08
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G2	680,40 ± 335,97
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G3	821,95 ± 621,91
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G4	553,23 ± 118,47

Lze tedy shrnout, že pokud by bylo cílem formulace s obsahem DIC proniknout do kůže, bylo by vhodné využít G2 PAMAM dendrimery v koncentraci 1 mM. Tehdy by PAMAM dendrimer zafungoval jako kožní enhancer a usnadnil penetraci léčiva do kůže.

5.2.2. Prostup DIC do akceptorové fáze

5.2.2.1. 1. zkouška permeace

Vliv PAMAM dendrimerů na permeaci DIC kůží je znázorněn v následujícím grafu (Obrázek 19).



Obrázek 19: Vliv PAMAM dendrimerů na permeované množství DIC do akceptorové fáze během první permeace

Pro tento permeační pokus byla zvolena koncentrace dendrimerů 0,5 mM a byly testovány G1-G4. Kontrolním roztokem byla voda s koncentrací DIC 15 mg/ml.

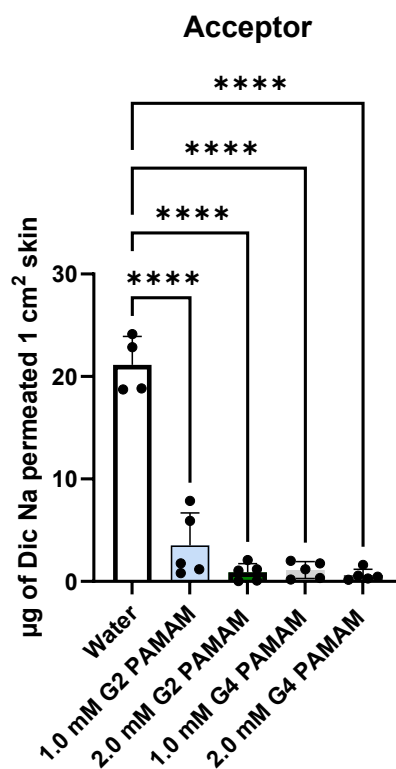
Hodnoty naměřené při první permeační zkoušce nenaznačují, že by PAMAM dendrimery G1 až G4 o koncentraci 0,5 mM fungovaly jako kožní enhancery pro permeaci. Naopak s rostoucí generací dendrimeru množství DIC v akceptorové fázi klesalo. Z kontrolního vzorku permeovalo do akceptorové fáze $15,0 \pm 5,20$ μg na 1 cm^2 kůže. U vzorku s G1 bylo detekováno $2,45 \pm 1,4$ μg na 1 cm^2 kůže. Ostatní hodnoty jsou podrobně rozepsány v tab. 5. níže.

Tabulka 5 Naměřené množství DIC v akceptorové fázi během první permeace

Typ roztoku	Množství DIC (μg) v akceptorové fázi
15 mg/ml DIC ve vodě	$15,00 \pm 5,20$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G1	$2,45 \pm 1,40$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G2	$1,06 \pm 0,24$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G3	$0,40 \pm 0,13$
15 mg/ml DIC v 0,5 mM G4	$0,17 \pm 0,09$

5.2.2.2. 2. zkouška permeace

Vliv PAMAM dendrimerů na permeaci DIC kůži je znázorněn v následujícím grafu (Obrázek 20)



Obrázek 20: Vliv PAMAM dendrimerů na permeované množství DIC do akceptorové fáze během druhé permeace

Pro tento permeační pokus byla zvolena koncentrace dendrimerů 1 a 2 mM a byly testovány G2 a G4. Kontrolním roztokem byla voda s koncentrací DIC 15 mg/ml.

U kontrolního vzorku bylo v akceptorové fázi detekováno $21,15 \pm 2,78$ µg na 1cm^2 kůže. To je zhruba 6krát více než nejvyšší z hodnot naměřených při použití roztoku s PAMAM dendrimery. Tedy, u G2 v koncentraci 1 mM bylo v akceptorové fázi naměřeno $3,51 \pm 3,18$ µg na 1cm^2 kůže. U vyšších koncentrací i generací byly hodnoty ještě o něco nižší. Ostatní výsledky jsou podrobně rozepsány v následující tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6 Naměřené množství DIC v akceptorové fázi během druhé permeace

Typ roztoku	Množství DIC (µg) v akceptorové fázi
15 mg/ml DIC ve vodě	$21,15 \pm 2,78$
15 mg/ml DIC v 1 mM G2	$3,51 \pm 3,18$
15 mg/ml DIC v 2 mM G2	$0,89 \pm 0,85$
15 mg/ml DIC v 1 mM G4	$1,11 \pm 0,82$
15 mg/ml DIC v 2 mM G4	$0,62 \pm 0,58$

Z výsledků obou permeačních zkoušek vyplývá, že PAMAM dendrimery neměly vliv na zlepšení prostupu DIC kůží a neprokázaly svou funkci kožních enhancerů.

Lze tedy konstatovat, že nebyl prokázán významný vliv PAMAM dendrimerů jako kožních enhancerů usnadňujících permeaci a penetraci. Pokud by byla připravována formulace s cílem distribuovat DIC do vrstev kůže, může být využito PAMAM dendrimerů G2 v koncentraci 1 mM. Tehdy by dendrimery zafungovaly jako kožní enhancery. Umožnilo by to lokální aplikaci DIC, a tím snížení podávaného množství léčiva, jehož vyšší dávky jsou nezbytné při podání perorálním. Vyšší dávky NSAIDs jsou spojeny s četnými nežádoucími účinky. [64], [65] Některé zdroje poukazují na významný vliv PAMAM dendrimerů při snaze zlepšit prostup léčiva do kůže. [66]

Toho lze využít při přípravě topických lékových forem s léčivou látkou působící proti bolesti a zánětu v muskuloskeletárním aparátu. To, že v pokusech této diplomové práce bylo prokázáno býti výhodným použít spíše nižší generaci i koncentraci (G2 v koncentraci 1 mM) z hlediska účinku, má své výhody i z hlediska toxicity. Mnohé publikace naznačují, že toxicita dendrimerů roste s generací i koncentrací. [67], [68]

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zvýšit rozpustnost ve vodě špatně rozpustného DIC pomocí PAMAM dendrimerů. Byl předpokládán vliv příhodných vlastností těchto pomocných látek pro zvýšení solubility DIC. Předpoklad byl ověřen, a bylo prokázáno, že rozpustnost DIC výrazně roste s použitou generací i koncentrací PAMAM dendrimerů.

Připravené formulace s obsahem DIC a PAMAM dendrimerů ve vodném médiu byly aplikovány na lidskou kůži s cílem prokázat vliv dendrimerů jako kožních enhancerů. Vliv PAMAM dendrimerů na zlepšení prostupu DIC přes SC nebyl zcela prokázán.

V akceptorové fázi, která složením a vlastnostmi představovala lidskou krev, bylo detekováno menší množství DIC v případě využití PAMAM než ve vzorcích bez dendrimerů. Ve vrstvách kůže nebyla detekována taková množství DIC, která by potvrzovala obecný statisticky významný efekt PAMAM dendrimerů jako kožních enhancerů. Vliv PAMAM dendrimerů na penetraci DIC do kůže a jejich vlastnosti kožních enhancerů zlepšujících přístup léčiva přes SC byl potvrzen pouze v případě použití G2 o koncentraci 1 mM.

Závěrem lze konstatovat, že ne všechny předpokládané vlastnosti a efekty PAMAM dendrimerů byly touto diplomovou prací potvrzeny. Pokud by mělo být navázáno na tento experiment a bylo snahou blíže prozkoumat efekt G2 PAMAM dendrimerů, jež se ukázaly být účinnými enhancery kožní permeace, bylo by záhodno ověřit podrobně ještě jejich toxicitu. Dále by bylo vhodné experimenty provedené v této diplomové práci zopakovat ještě s jinými aplikačními formami, jako jsou například gely, krémy a masti, protože roztoky jsou pro klinickou praxi formulací značně nepraktickou.

7. Reference

- [1] K. Langer, „On the anatomy and physiology of the skin", *Br J Plast Surg*, roč. 31, č. 1, s. 3–8, led. 1978, doi: 10.1016/0007-1226(78)90003-6.
- [2] J. Fenner a R. A. F. Clark, „Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin", in *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, 2016, s. 1–17. doi: 10.1016/B978-0-12-801654-1.00001-2.
- [3] „<https://festovnicei.cz/blog/pece-o-kozene-boty/>".
- [4] C. Has, „Peeling Skin Disorders: A Paradigm for Skin Desquamation", *Journal of Investigative Dermatology*, roč. 138, č. 8, s. 1689–1691, srp. 2018, doi: 10.1016/j.jid.2018.05.020.
- [5] K. Bäsler, S. Bergmann, M. Heisig, A. Naegel, M. Zorn-Kruppa, a J. M. Brandner, „The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption", *Journal of Controlled Release*, roč. 242, s. 105–118, lis. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.08.007.
- [6] „<https://es.vecteezy.com/artes-vectorial/24128260-estructura-de-estrato-cornea-vector-en-blanco-antecedentes-ladrillos-y-mortero-estructura-intercelular-estrato-cornea-fisiologico-lipidos-piel-cuidado-concepto-ilustracion>".
- [7] J. Khavkin a D. A. F. Ellis, „Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology", *Facial Plast Surg Clin North Am*, roč. 19, č. 2, s. 229–234, kvě. 2011, doi: 10.1016/j.fsc.2011.04.003.
- [8] T. Matsui, A. Hirabayashi, M. Sato, K. Toyooka, a M. Amagai, „187 Three distinct ultrastructural stages of SG1 cells during corneoptosis in the stratum granulosum of the epidermis in vivo", *Journal of Investigative Dermatology*, roč. 144, č. 12, s. S260, pro. 2024, doi: 10.1016/j.jid.2024.10.194.
- [9] „https://en.wikipedia.org/wiki/Stratum_basale".
- [10] W. Montagna a K. Carlisle, „The architecture of black and white facial skin", *J Am Acad Dermatol*, roč. 24, č. 6, s. 929–937, čer. 1991, doi: 10.1016/0190-9622(91)70148-U.
- [11] P. A. Wu *et al.*, „Epidermal spongiotic Langerhans cell collections, but not eosinophils, are a clue to the diagnosis of allergic contact dermatitis: A series of 170 clinically- and patch test-confirmed cases", *J Am Acad Dermatol*, pro. 2024, doi: 10.1016/j.jaad.2024.11.062.
- [12] F. I. Hassan, „Skin", in *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, 2024, s. 555–559. doi: 10.1016/B978-0-12-824315-2.00135-4.
- [13] F. Iheanacho a A. R. Vellipuram, *Physiology, Mechanoreceptors*. 2025.
- [14] H.-M. Na, K.-Y. Chun, S. Seo, a C.-S. Han, „Artificial Ruffini sensor using CNT/ecoflex composite for human movement monitoring", *Sens Actuators A Phys*, roč. 378, s. 115843, lis. 2024, doi: 10.1016/j.sna.2024.115843.
- [15] P. Cuendias *et al.*, „Differences between finger and toe Meissner corpuscles: Searching for the optimal place to analyze meissner corpuscles in cutaneous biopsy", *Translational Research in Anatomy*, roč. 30, s. 100234, bře. 2023, doi: 10.1016/j.tria.2023.100234.

- [16] S. Gibbs, J. Jager, a J. Koning, „177 Reconstructed Human Skin with Hypodermis Shows Essential Role of Adipose Tissue in Skin Metabolism and Homeostasis", *Journal of Investigative Dermatology*, roč. 144, č. 12, s. S258, pro. 2024, doi: 10.1016/j.jid.2024.10.184.
- [17] „ALEXANDR HRABÁLEK a KATEŘINA VÁVROVÁ. Lze překonat kožní bariéru? Praktické lékárenství. nedatováno, 2005(1), 8–11. ".
- [18] N. Bibi, N. Ahmed, a G. M. Khan, „Nanostructures in transdermal drug delivery systems", in *Nanostructures for Drug Delivery*, Elsevier, 2017, s. 639–668. doi: 10.1016/B978-0-323-46143-6.00021-X.
- [19] „<https://www.pharmapproach.com/transdermal-route-of-drug-administration-advantages-and-disadvantages/>".
- [20] N. Akombaetwa, A. B. Ilangala, L. Thom, P. B. Memvanga, B. A. Witika, a A. B. Buya, „Current Advances in Lipid Nanosystems Intended for Topical and Transdermal Drug Delivery Applications", *Pharmaceutics*, roč. 15, č. 2, s. 656, úno. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15020656.
- [21] J. Lademann *et al.*, „Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, roč. 66, č. 2, s. 159–164, kvě. 2007, doi: 10.1016/j.ejpb.2006.10.019.
- [22] Y. S. Sim, L. C. Wong, S. C. Yeoh, A. Almashhadani, B. H. Alrimawi, a C. F. Goh, „Skin penetration enhancers: Mechanistic understanding and their selection for formulation and design", *Drug Deliv Transl Res*, úno. 2025, doi: 10.1007/s13346-025-01809-9.
- [23] T. Uchino *et al.*, „Evaluation of molecular interaction between intercellular lipid organization in human stratum corneum and terpenes using time-resolved synchrotron X-ray diffraction", *Chem Phys Lipids*, roč. 265, s. 105435, lis. 2024, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2024.105435.
- [24] A. Kováčik, M. Kopečná, a K. Vávrová, „Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations", *Expert Opin Drug Deliv*, roč. 17, č. 2, s. 145–155, úno. 2020, doi: 10.1080/17425247.2020.1713087.
- [25] „ALEXANDR HRABÁLEK, PAVEL DOLEŽAL, ZDEŇKA ŠKLUBALOVÁ, OLDŘICH FARSA, a ALEŠ KREBS. Akceleranty transdermální aplikace. *Chemické listy*. nedatováno, 1999(93), 107–119. ".
- [26] E. Abbasi *et al.*, „Dendrimers: synthesis, applications, and properties", *Nanoscale Res Lett*, roč. 9, č. 1, s. 247, pro. 2014, doi: 10.1186/1556-276X-9-247.
- [27] C. Vasile, „Polymeric Nanomaterials", in *Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics*, Elsevier, 2019, s. 1–66. doi: 10.1016/B978-0-12-813932-5.00001-7.
- [28] A. A. Chis *et al.*, „Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine", *Molecules*, roč. 25, č. 17, s. 3982, zář. 2020, doi: 10.3390/molecules25173982.
- [29] M. D. Pérez-Carrión a I. Posadas, „Dendrimers in Neurodegenerative Diseases", *Processes*, roč. 11, č. 2, s. 319, led. 2023, doi: 10.3390/pr11020319.
- [30] A. Janaszewska, J. Lazniewska, P. Trzepiński, M. Marcinkowska, a B. Klajnert-Maculewicz, „Cytotoxicity of Dendrimers.", *Biomolecules*, roč. 9, č. 8, srp. 2019, doi: 10.3390/biom9080330.

- [31] S. A. Kumbhar, B. Gorain, H. Choudhury, a P. Kesharwani, „Safety and toxicity issues of dendrimers", in *Dendrimer-Based Nanotherapeutics*, Elsevier, 2021, s. 143–162. doi: 10.1016/B978-0-12-821250-9.00018-4.
- [32] C. Gorman, „Dendrimers: Polymerization and Properties", in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier, 2001, s. 2042–2052. doi: 10.1016/B0-08-043152-6/00372-7.
- [33] Z. Lyu, L. Ding, A. Y.-T. Huang, C.-L. Kao, a L. Peng, „Poly(amidoamine) dendrimers: covalent and supramolecular synthesis", *Mater Today Chem*, roč. 13, s. 34–48, zář. 2019, doi: 10.1016/j.mtchem.2019.04.004.
- [34] Z. Zhao, A. Ukidve, J. Kim, a S. Mitragotri, „Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery", *Cell*, roč. 181, č. 1, s. 151–167, dub. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.001.
- [35] I. Franiak-Pietryga, B. Ziemia, B. Messmer, a D. Skowronska-Krawczyk, „Dendrimers as Drug Nanocarriers: The Future of Gene Therapy and Targeted Therapies in Cancer", in *Dendrimers - Fundamentals and Applications*, InTech, 2018. doi: 10.5772/intechopen.75774.
- [36] J. R. Baker, „Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy", *Hematology*, roč. 2009, č. 1, s. 708–719, led. 2009, doi: 10.1182/asheducation-2009.1.708.
- [37] S. L. Shuel, „Targeted cancer therapies", *Canadian Family Physician*, roč. 68, č. 7, s. 515–518, čvc. 2022, doi: 10.46747/cfp.6807515.
- [38] I. Hussain *et al.*, „A review on structural aspects and applications of PAMAM dendrimers in analytical chemistry: Frontiers from separation sciences to chemical sensor technologies", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 157, s. 116810, pro. 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116810.
- [39] V. Gawande, H. Choudhury, a P. Kesharwani, „Dendrimer nomenclature and synthesis methods", in *Dendrimer-Based Nanotherapeutics*, Elsevier, 2021, s. 75–94. doi: 10.1016/B978-0-12-821250-9.00009-3.
- [40] „<https://www.dendritech.com/pamam.html>".
- [41] J. Pan, S. A. Attia, N. Filipczak, a V. P. Torchilin, „Dendrimers for drug delivery purposes", in *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*, Elsevier, 2020, s. 201–242. doi: 10.1016/B978-0-08-102985-5.00010-3.
- [42] K. Jain, N. K. Jain, a P. Kesharwani, „Types of dendrimers", in *Dendrimer-Based Nanotherapeutics*, Elsevier, 2021, s. 95–123. doi: 10.1016/B978-0-12-821250-9.00007-X.
- [43] L. J. Fox, R. M. Richardson, a W. H. Briscoe, „PAMAM dendrimer - cell membrane interactions", *Adv Colloid Interface Sci*, roč. 257, s. 1–18, čvc. 2018, doi: 10.1016/j.cis.2018.06.005.
- [44] „Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):4-15."
- [45] „<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac-sodium>".
- [46] „<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.25309.html>".

- [47] „Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin.* 2010 Jul;26(7):1715-31.".
- [48] „Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Sep;33(3):184-213.".
- [49] „Standing JF, Savage I, Pritchard D, Waddington M. Diclofenac for acute pain in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Oct 07;(4):CD005538.".
- [50] M. Arfeen, A. Srivastava, N. Srivastava, R. A. Khan, S. A. Almahmoud, a H. A. Mohammed, „Design, classification, and adverse effects of NSAIDs: A review on recent advancements", *Bioorg Med Chem*, roč. 112, s. 117899, řij. 2024, doi: 10.1016/j.bmc.2024.117899.
- [51] C.-L. Liu *et al.*, „Predicting NSAID-associated cardiac mortality: A deep learning approach to 12-lead ECG analysis", *Biomed Signal Process Control*, roč. 105, s. 107621, čvc. 2025, doi: 10.1016/j.bspc.2025.107621.
- [52] „<https://www.dasmini.cz/zivot-s-alergii/koprivka-urtikarie-proc-tato-neprijemna-kozni-reakce-vznika-a-jak-se-ji-zbavit/>".
- [53] D. Manocha, M. Singh, N. Mehta, a U. K. Murthy, „Bleeding Risk after Invasive Procedures in Aspirin/NSAID Users: Polypectomy Study in Veterans", *Am J Med*, roč. 125, č. 12, s. 1222–1227, pro. 2012, doi: 10.1016/j.amjmed.2012.05.030.
- [54] G. Kumar, D. Hota, U. Nahar Saikia, a P. Pandhi, „Evaluation of analgesic efficacy, gastrototoxicity and nephrotoxicity of fixed-dose combinations of nonselective, preferential and selective cyclooxygenase inhibitors with paracetamol in rats", *Experimental and Toxicologic Pathology*, roč. 62, č. 6, s. 653–662, lis. 2010, doi: 10.1016/j.etp.2009.08.011.
- [55] „<https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/05/07.pdf>".
- [56] F. Karam *et al.*, „NSAIDs exposure during late pregnancy: Trends in prescriptions and reporting fetal adverse effects", *Neurotoxicol Teratol*, roč. 98, s. 107224, čvc. 2023, doi: 10.1016/j.ntt.2023.107224.
- [57] C. H. Salamanca, A. Barrera-Ocampo, J. C. Lasso, N. Camacho, a C. J. Yarcce, „Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms.", *Pharmaceutics*, roč. 10, č. 3, zář. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030148.
- [58] L. F. Žilnik, A. Jazbinšek, A. Hvala, F. Vrečer, a A. Klamt, „Solubility of sodium diclofenac in different solvents", *Fluid Phase Equilib*, roč. 261, č. 1–2, s. 140–145, pro. 2007, doi: 10.1016/j.fluid.2007.07.020.
- [59] „<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.12.139>".
- [60] M. Arfeen, A. Srivastava, N. Srivastava, R. A. Khan, S. A. Almahmoud, a H. A. Mohammed, „Design, classification, and adverse effects of NSAIDs: A review on recent advancements", *Bioorg Med Chem*, roč. 112, s. 117899, řij. 2024, doi: 10.1016/j.bmc.2024.117899.
- [61] „<https://permegear.com/franz-cells/>".
- [62] K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta, a N. K. Jain, „Dendrimer toxicity: Let’s meet the challenge", *Int J Pharm*, roč. 394, č. 1–2, s. 122–142, čvc. 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.04.027.

- [63] E. Makuch *et al.*, „Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of eugenol by the esterification of eugenol to new derivatives.“, *AMB Express*, roč. 10, č. 1, s. 187, říj. 2020, doi: 10.1186/s13568-020-01122-3.
- [64] N. M. Davies a K. E. Anderson, „Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls.“, *Clin Pharmacokinet*, roč. 33, č. 3, s. 184–213, zář. 1997, doi: 10.2165/00003088-199733030-00003.
- [65] „<https://www.angis.cz/topicky-vyuzivana-nesteroidni-antiflogistika/>“.
- [66] A. Gupta, S. Dubey, a M. Mishra, „Unique Structures, Properties and Applications of Dendrimers“, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, roč. 8, č. 6-s, s. 328–339, pro. 2018, doi: 10.22270/jddt.v8i6-s.2083.
- [67] A. Janaszewska, J. Lazniewska, P. Trzepiński, M. Marcinkowska, a B. Klajnert-Maculewicz, „Cytotoxicity of Dendrimers“, *Biomolecules*, roč. 9, č. 8, s. 330, srp. 2019, doi: 10.3390/biom9080330.
- [68] S. A. Kumbhar, B. Gorain, H. Choudhury, a P. Kesharwani, „Safety and toxicity issues of dendrimers“, in *Dendrimer-Based Nanotherapeutics*, Elsevier, 2021, s. 143–162. doi: 10.1016/B978-0-12-821250-9.00018-4.